

ANTAGONISTA DE ACCIÓN PROLONGADA DEL RECEPTOR DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO Y USO DEL MISMO

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un compuesto que es un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento, que comprende una variante de la hormona del crecimiento y un resto de unión a albúmina, los métodos para preparar dicho compuesto, y el uso de dicho compuesto en la medicina.

10 ANTECEDENTES

La hormona del crecimiento (GH) es un polipéptido secretado por la adenohipófisis en los mamíferos. En dependencia de la especie, la hormona del crecimiento es una proteína compuesta de aproximadamente 190 residuos de aminoácidos, que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 22 kDa. La hormona del crecimiento humana (hGH) se compone de 191
15 aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. La hormona del crecimiento se une a y señala a través de receptores de la superficie celular, los receptores de la hormona del crecimiento (GHR). La hormona del crecimiento desempeña un papel clave en la promoción del crecimiento, mantener la composición corporal normal, el anabolismo y el metabolismo de lípidos. Cuando el cuerpo excreta cantidades excesivas de GH, los niveles plasmáticos del factor de crecimiento similar a la
20 insulina 1 (IGF-1) se elevan, lo que provoca que el tejido corporal y los huesos crezcan más rápidamente, lo que da lugar a enfermedades tales como la acromegalia.

La acromegalia suele diagnosticarse en adultos de 30-50 años de edad y la causa subyacente es, en la mayoría de los casos, debida a un adenoma hipofisario de crecimiento lento. La primera línea de tratamiento es la cirugía. Sin embargo, si la cirugía no es posible o no logra un control adecuado de
25 los niveles de la hGH y del IGF-1, el siguiente nivel de tratamiento es el tratamiento médico con análogos de la somatostatina o antagonistas recombinantes del receptor de la hGH.

El pegvisomant se describió por primera vez en el documento WO1997/011178 y es una versión pegilada del potente antagonista del receptor de la GH B2036 (SEQ ID NO: 5) y se ha comercializado como Somavert® durante más de 20 años para el tratamiento de la acromegalia. El pegvisomant es
30 un antagonista competitivo de la hGH que consiste en una cadena principal peptídica, B2036, con una variación de 4-6 cadenas de PEG y una variación en las posiciones de la pegilación a través de las lisinas en las posiciones F1, K145, K140, K38, K158, K120, K70 (Pradhananga y otros, J Mol

Endo (2002), 29, 11-14; documento US5,849,535). Sin embargo, se asocia con varias deficiencias tales como reacciones en el sitio de inyección, inmunogenicidad, inyecciones dolorosas y, el hecho de que es un producto heterogéneo, hace que su aislamiento sea complicado. Además, el pegvisomant se obtiene como un sólido que se reconstituye en un tampón antes de la inyección, y se conoce que se agrega parcialmente cuando se reconstituye y, debido a la alta viscosidad del producto reconstituido, existe la necesidad de usar una aguja grande (27 ½G) para la inyección subcutánea, lo que causa incomodidad a los pacientes. Para obtener una reducción sostenible del IGF-1, el pegvisomant se administra una vez al día. Sin embargo, si se usa en combinación con un análogo de la somatostatina, la frecuencia de administración puede reducirse a 2-3 administraciones por semana.

Se han hecho varios intentos por superar estas deficiencias. Por ejemplo, alternativamente, se han descrito antagonistas del receptor de la hormona del crecimiento pegilados en, por ejemplo, los documentos CN103087182B y US10,874,717, y se han descrito estrategias alternativas para mejorar la semivida y/o proporcionar sustituciones de la cadena principal de los antagonistas del receptor de la hormona del crecimiento en, por ejemplo, el documento US2020/03999340 mediante el uso de fusiones de alfa-1 antitripsina, el documento WO2019/211842 mediante el uso de conjugados peptídicos en el extremo carboxilo y J. Biol. Chem. 2021, 296, 100588 que sugiere sustituciones específicas de la cadena principal.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de proporcionar antagonistas del receptor de la hormona del crecimiento con mejores propiedades, tales como, por ejemplo, mejor afinidad de unión y/o semivida prolongada. La presente invención proporciona un nuevo antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento con mejores propiedades farmacológicas y farmacocinéticas, así como también proporciona una mejor conveniencia para el paciente.

RESUMEN

La invención se refiere a un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento (LA-GHRA) que comprende una variante de la hormona del crecimiento y un resto de unión a albúmina. En algunos aspectos, la variante de la hormona del crecimiento es un polipéptido derivado de la hormona del crecimiento humana (hGH) y comprende las sustituciones de aminoácidos H18D, H21N, L101C, G120R/G120K, R167N, D171S, E174S, I179T, en comparación con la hGH (SEQ ID NO: 1). En una modalidad, el resto de unión a albúmina se une a la variante de la hormona del crecimiento a través del azufre en la cadena lateral de la cisteína en la posición 101 del polipéptido.

En un aspecto, se proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento que comprende:

a. una variante de la hormona del crecimiento que comprende al menos las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la hormona del crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1): L101C, G120R/G120K, y en donde la variante de la hormona del crecimiento tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1; y

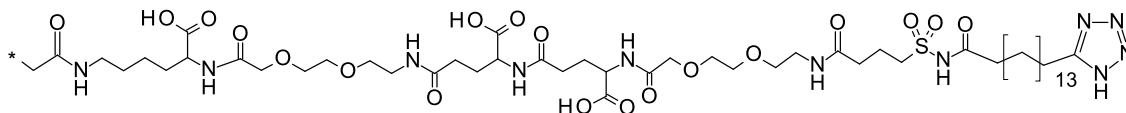
b. un resto de unión a albúmina configurado para unirse a la albúmina, por ejemplo, unirse a la albúmina con una constante de disociación (K_d) de menos de 1 μ M, en donde el resto de unión a albúmina tiene un peso molecular de 3 kDa o menos y se une covalentemente a la variante de la hormona del crecimiento a través del residuo de azufre de la cadena lateral de la cisteína en la posición 101 de la variante de la hormona del crecimiento;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, se proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento que comprende:

a. una variante de la hormona del crecimiento que comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la hormona del crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1): H18D, H21N, L101C, G120R/G120K, R167N, D171S, E174S, I179T, y

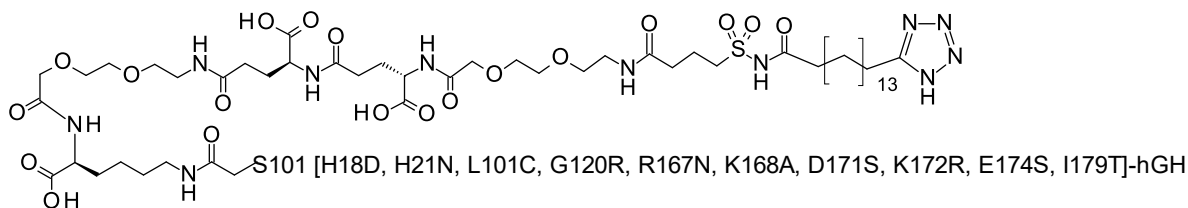
b. un resto de unión a albúmina definido por la sustancia química 2



(sustancia química 2)

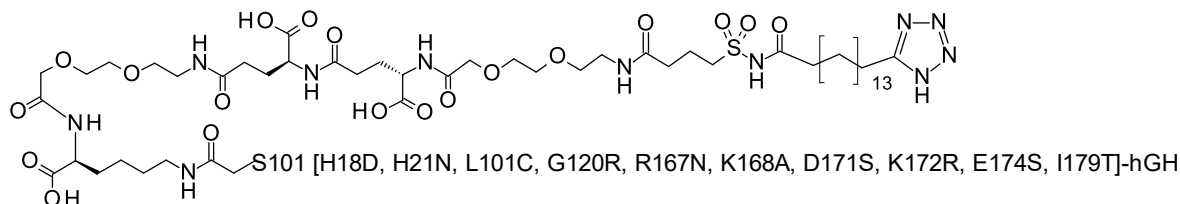
en donde * denota el punto de acoplamiento del resto de unión a albúmina a la variante de la hormona del crecimiento a través del residuo de azufre de la cadena lateral de la cisteína en la posición 101 de la variante de la hormona del crecimiento; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, se proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento de compuesto 1a:



(compuesto 1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene opcionalmente uno o dos puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y/o Cys182-Cys189.

En un aspecto, se proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento de compuesto 1a:



(compuesto 1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende dicho LA-GHRA y excipientes farmacéuticamente aceptables, el uso médico de dicho antagonista, así como también un ácido nucleico que codifica la cadena principal polipeptídica, un vector que comprende dicho ácido nucleico y una célula huésped que comprende dicho vector.

En un aspecto, se proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento como se define en la presente descripción para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por niveles excesivos de la hormona del crecimiento humana y/o del IGF-1, tales como acromegalia o gigantismo.

En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos en comparación con la hGH:

- i) H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T (GHv-1);
- ii) H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T (GHv-2); o
- iii) H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, D171S, E174S, I179T (GHv-3).

En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos en comparación con la hGH:

H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T.

En un aspecto, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende la siguiente modificación de aminoácido en comparación con la hGH:

- i) H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T (GHv-1);
- ii) H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T (GHv-2); o
- iii) H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, D171S, E174S, I179T (GHv-3).

5 En un aspecto, la invención proporciona un LA-GHRA que se une al hGHR con mejor afinidad de unión en comparación con el pegvisomant.

Además, o alternativamente, en un segundo aspecto, la invención proporciona un LA-GHRA que es un antagonista en el hGHR, por tanto, inhibe o reduce la respuesta natural que la hGH ejerce sobre el hGHR y muestra una mejor potencia antagonista en comparación con el pegvisomant.

10 Además, o alternativamente, en un tercer aspecto, la invención proporciona un LA-GHRA que muestra mejores propiedades farmacocinéticas. En un aspecto, la presente descripción proporciona un LA-GHRA que posee todos los efectos descritos anteriormente.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un proceso para preparar una variante de la hormona del crecimiento humana como se describe en la presente descripción, que comprende

15 cultivar una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la presente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los perfiles de concentración plasmática frente al tiempo del Compuesto 1a después de la administración i.v. y s.c.

20

Descripción

Definiciones

En lo adelante, las letras del alfabeto griego pueden representarse por su símbolo o por el correspondiente nombre escrito, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = épsilon; γ = gamma; ω = omega; etc. Además, la letra del alfabeto griego de μ puede representarse por "u", por ejemplo, en μl =ul o en μM =uM.

25

Debe interpretarse que los términos “un” y “una” y “el/la” y los referentes similares como se usan en el contexto de la descripción de la invención, cubren tanto el singular como el plural (es decir, uno o más), a menos que se indique de otra forma en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente.

30

En la presente descripción también se describen antagonistas del receptor de la hormona del crecimiento, composiciones farmacéuticas y usos de las mismas, en las que los términos abiertos como “comprende” y “que comprende” se reemplazan por términos cerrados tales como “consiste en”, “que consiste de” y similares.

- 5 La invención se refiere a un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento (LA-GHRA) que comprende una variante de la hormona del crecimiento y un resto de unión a albúmina.

El término “hGH” se refiere a la hormona del crecimiento humana, que es un polipéptido de 191 aminoácidos con la secuencia:

- 10 FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPSPN
REETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTL
MGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRS
VEGSCGF (SEQ ID NO: 1), que es el ligando natural para el receptor de la hormona del crecimiento humana o “hGHR”. La SEQ ID NO: 1 es además la secuencia de la hormona del crecimiento humana
15 recombinante, también conocida como somatropina.

- Un antagonista del receptor puede definirse como un compuesto que se une a un receptor y es capaz de inhibir o reducir una respuesta típica del ligando natural. Como se describe en la presente descripción, un “antagonista del receptor de la hormona del crecimiento” o “GHRA” se refiere a un compuesto capaz de unirse al receptor de la hormona del crecimiento humana sin activar el receptor
20 de la hormona del crecimiento o que reduce la activación en comparación con la respuesta natural de la hGH.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento es una variante de la hormona del crecimiento. El término “variante de la hormona del crecimiento” (GHv) se refiere a un polipéptido de la hGH que comprende una o más sustituciones en comparación con la hGH.

- 25 Como se usa en la presente descripción, el término “antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento” o “LA-GHRA” se refiere a un antagonista del receptor de la hormona del crecimiento modificado químicamente, en el que un resto de unión a albúmina se ha unido covalentemente a la cadena principal polipeptídica. En una modalidad, LA-GHRA se refiere a una variante de la hormona del crecimiento modificada químicamente, en la que un resto de unión a
30 albúmina se ha unido covalentemente a la cadena principal polipeptídica. Como se usa en la presente descripción, un “resto de unión a albúmina” significa un resto o grupo químico que reemplaza a un átomo de hidrógeno.

Como se usa en la presente descripción, el término “identidad de secuencia” se refiere al grado de similitud entre dos secuencias polipeptídicas, expresado como porcentaje (%). La identidad de secuencia puede determinarse, por ejemplo, mediante alineamiento, por ejemplo, en base a un algoritmo Needleman-Wunsch. Este algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453, y el programa de alineamiento de Myers y W. Miller en "Optimal Alignments in Linear Space" CABIOS (computer applications in the biosciences) (1988) 4:11-17. El término “identidad de secuencia” se usa, por ejemplo, en algunas modalidades, para describir una variante de la hormona del crecimiento como parte de un LA-GHRA que tiene al menos 81 % de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, tal como al menos 82 %, tal como al menos 83 %, tal como al menos 84 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 86 %, tal como al menos 87 %, tal como al menos 88 %, tal como al menos 89 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 91 %, tal como al menos 92 %, tal como al menos 93 %, tal como al menos 94 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1.

Variantes de la hormona del crecimiento

A continuación, se describen modalidades de variantes de la hormona del crecimiento. En modalidades particulares, estas deben entenderse como descritas específicamente como parte de un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento.

En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende las sustituciones G120R/G120K y L101C, preferentemente G120R y L101C. En una modalidad adicional, la variante de la hormona del crecimiento comprende además una o más de las siguientes sustituciones en comparación con la hGH: H18D, H21N, R167N, D171S, E174S, e I179T. En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende las siguientes sustituciones en comparación con la hGH: H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, D171S, E174S, e I179T. En una modalidad particular, la variante de la hormona del crecimiento comprende las siguientes sustituciones en comparación con la hGH: H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T. En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende las sustituciones H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T, y 1-10 sustituciones adicionales en comparación con la hGH, tales como 1-5 sustituciones adicionales o 2-4 sustituciones adicionales. En una modalidad adicional, la variante de la hormona del crecimiento es:

FPTIPLSRLFDNAMLRLADRLNQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPTPSN

REETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSCVYGASDSNVYDLLKDLEERIQL
MGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFNADMSRVSTFLRTVQCRS
VEGSCGF (SEQ ID NO: 2), que también puede denominarse [H18D, H21N, L101C, G120R,
R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]-hGH o compuesto 2 o GHv-1. En una modalidad,
5 la SEQ ID NO: 2 comprende uno o más puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y/o Cys182-Cys189.
En una modalidad adicional, la variante de la hormona del crecimiento comprende las sustituciones
H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S e I179T, y
1-10 sustituciones adicionales en comparación con la hGH, tal como 1-5 sustituciones adicionales o
2-4 sustituciones adicionales. En una modalidad adicional, la variante de la hormona del crecimiento
10 es:

FPTIPLSRLFDNAMLRADRLNQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSN
REETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSCVYGASDSNVYDLLKDLEERIQL
MGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTSDHDDALLKNYGLLYCFNADMSRVSTFLRTVQCRS
VEGSCGF (SEQ ID NO: 3). (GHv-2).

15 En una modalidad adicional, la variante de la hormona del crecimiento comprende las sustituciones
H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, D171S, E174S e I179T, y 1-10
sustituciones adicionales en comparación con la hGH, tal como 1-5 sustituciones adicionales o 2-4
sustituciones adicionales. En una modalidad adicional, la variante de la hormona del crecimiento es:

FPTIPLSRLFDNAMLRADRLNQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSN
20 REETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSCVYGASDSNVYDLLKDLEERIQL
MGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTSDHDDALLKNYGLLYCFNKDMSKVSTFLRTVQCRS
VEGSCGF (SEQ ID NO: 4). (GHv-3).

En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento tiene al menos 81 % de identidad de
secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, tal como al menos 82 %, tal como al menos 83 %,
25 tal como al menos 84 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 86 %, tal como al menos 87
%, tal como al menos 88 %, tal como al menos 89 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos
91 %, tal como al menos 92 %, tal como al menos 93 %, tal como al menos 94 %, tal como al menos
95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos
99 % de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1.

30 En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende además una o más
mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: H18D, H21N, N149D, N152D, R167N,
K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T.

En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos en comparación con la hGH:

H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T (GHv-1);

H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T (GHv-2); o

H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, D171S, E174S, e I179T (GHv-3).

En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento, además de L101C, G120R/G120K, comprende 1-10 sustituciones de aminoácidos adicionales, tal como 2-8 o 3-5 sustituciones de aminoácidos adicionales.

10 En una modalidad, la sustitución en la posición 120 de la variante de la hormona del crecimiento es G120R.

En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento tiene una longitud de 191 aminoácidos.

En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento es un antagonista del receptor de la hormona del crecimiento. En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento es capaz de

15 unirse al receptor de la hormona del crecimiento.

Aglutinantes de albúmina

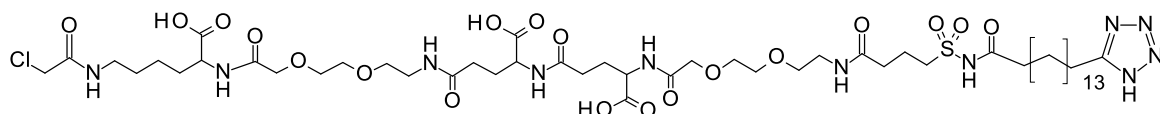
En un aspecto, el LA-GHRA comprende un resto de unión a albúmina unido covalentemente a la variante de la hormona del crecimiento a través de una cisteína, por ejemplo, a través de la cisteína en la posición 101. Los términos “aglutinante de albúmina” y “resto de unión a albúmina” se usan
20 indistintamente en la presente descripción. En un aspecto adicional, el resto de unión a albúmina puede formar conjugados no covalentes con las proteínas, por ejemplo, la albúmina, de esta manera promueve la circulación del LA-GHRA con el torrente sanguíneo, y también tiene el efecto de prolongar el tiempo de acción del LA-GHRA, debido al hecho de que el conjugado del LA-GHRA y albúmina solo se desintegra lentamente para liberar el ingrediente farmacéutico activo.

25 En una modalidad, el resto de unión a albúmina tiene un peso molecular de 2.8 kDa o menos, tal como 2.6 kDa o menos, tal como 2.4 kDa o menos, tal como 2.2 kDa o menos, tal como 2.0 kDa o menos, tal como 1.8 kDa o menos, tal como 1.6 kDa o menos, tal como 1.4 kDa o menos, tal como 1.2 kDa o menos, por ejemplo, 1.0 kDa o menos.

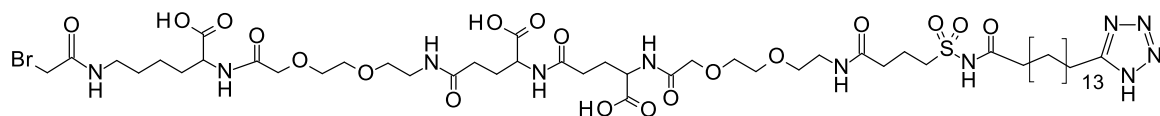
30 En una modalidad, el resto de unión a albúmina tiene un peso molecular de 0.3 kDa o más, por ejemplo, 1.8 kDa o menos, pero más de 0.3 kDa.

En un aspecto, el resto de unión a albúmina se une covalentemente a la variante de la hormona del crecimiento a través de un grupo sulfhidrilo en la cadena lateral de una cisteína de la cadena principal

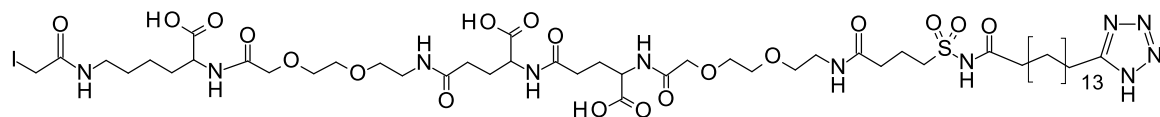
de la variante de la hormona del crecimiento. El resto de unión a albúmina puede unirse a la variante de la hormona del crecimiento mediante la reacción de la cadena lateral de cisteína reducida con un derivado activado del resto de unión a albúmina que comprende un grupo saliente, tal como una haloacetamida, como se describe en la página 77, líneas 5-19, sustancia química III, del documento WO2011/089255 o como sustancia química 4a o sustancia química 5a en el ejemplo 1 en la presente descripción. En una modalidad, la haloacetamida se selecciona de cloro-, bromo- y yodoacetamidas de la sustancia química 3, la sustancia química 4, y la sustancia química 5, respectivamente.



(sustancia química 3);



(sustancia química 4);

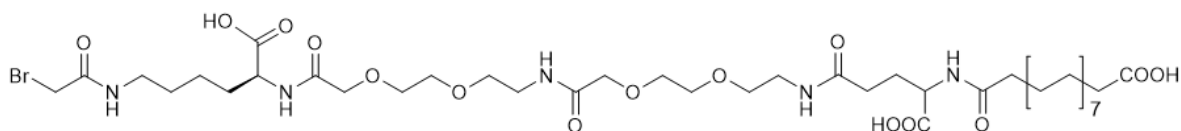


(sustancia química 5).

Las estructuras de los “aglutinantes de albúmina” o “restos de unión a albúmina” cuando se especifican como parte de los compuestos de la presente invención, son los productos de sustitución resultantes del desplazamiento del grupo saliente, por ejemplo, cloro-, bromo- o yodo- de las haloacetamidas representadas en la presente descripción, por el azufre de la posición 101 de las variantes de la hormona de crecimiento. La estructura del aglutinante de albúmina resultante puede deducirse fácilmente de la estructura final de los compuestos descritos en la presente descripción en vista de cómo se forman los compuestos, por ejemplo, mediante el desplazamiento de un grupo saliente de halógeno de las haloacetamidas representadas como se demuestra en los ejemplos, por ejemplo, el Ejemplo 1 y el Ejemplo 11.

En un aspecto adicional, el aglutinante de albúmina se selecciona de:

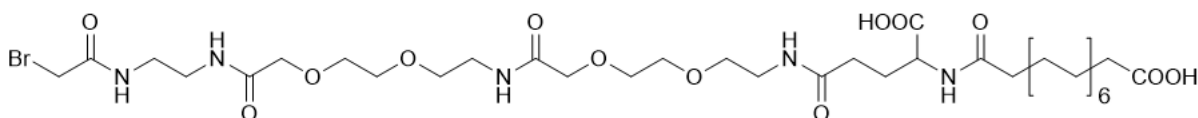
Br-sustancia química 6a:



Fórmula química: $C_{43}H_{76}BrN_5O_{15}$
Peso molecular: 983,01

;

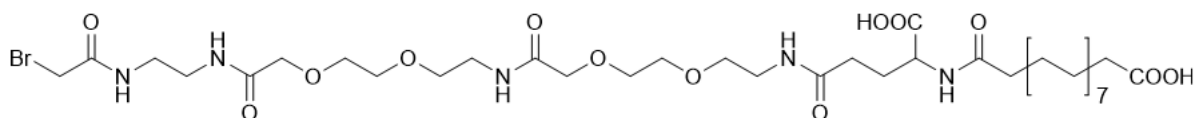
Br-sustancia química 7:



Fórmula química: $C_{37}H_{66}BrN_5O_{13}$
Peso molecular: 868,86

;

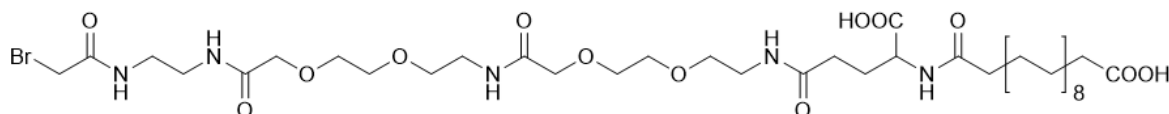
Br-sustancia química 8:



Fórmula química: $C_{39}H_{70}BrN_5O_{13}$
Peso molecular: 896,92

;

Br-sustancia química 9:

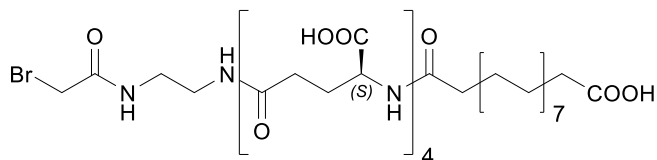


Fórmula química: $C_{41}H_{74}BrN_5O_{13}$
Peso molecular: 924,97

;

y

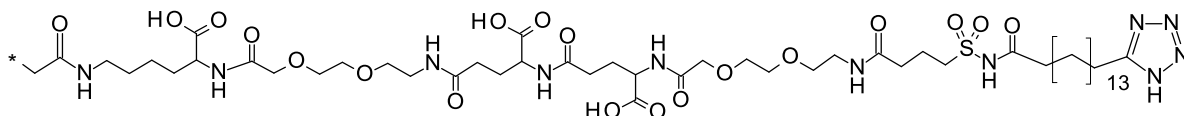
Br-sustancia química 10a:



10

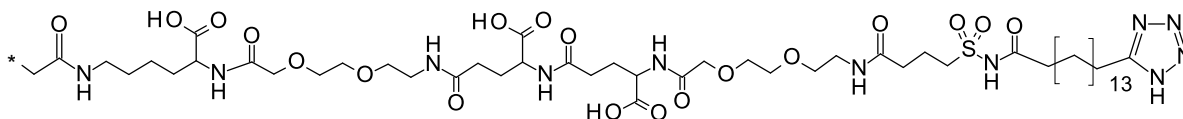
En las fórmulas anteriores para los aglutinantes de albúmina, los aminoácidos que forman parte de las fórmulas son L-aminoácidos si las fórmulas terminan con “a”.

En un aspecto, el resto de unión a albúmina es:

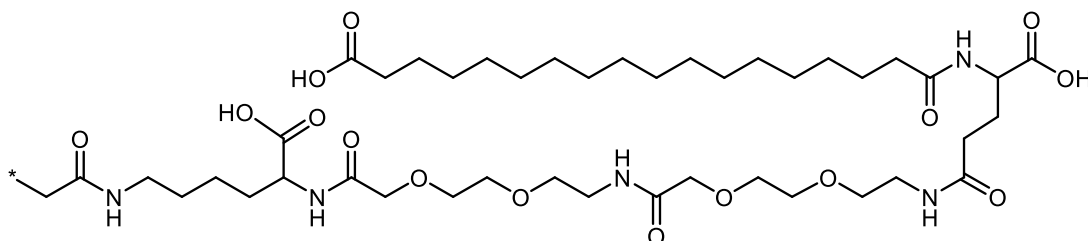


(sustancia química 2).

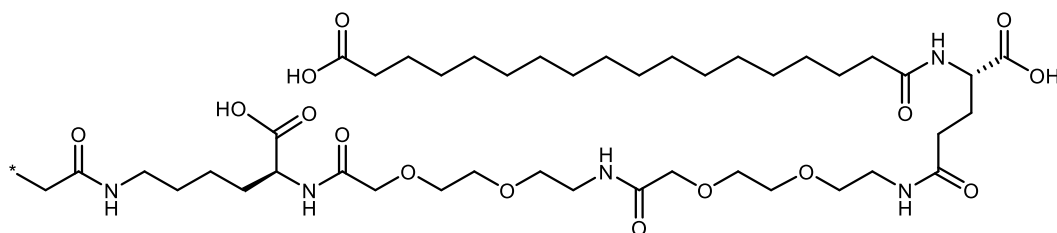
En una modalidad, se proporciona el antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento de la presente descripción, en donde el resto de unión a albúmina se define por una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:



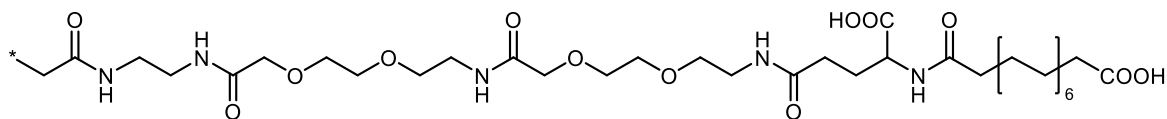
(sustancia química 2);



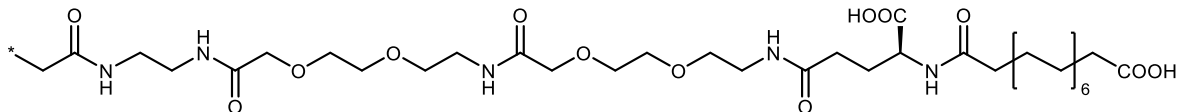
(sustancia química 6);



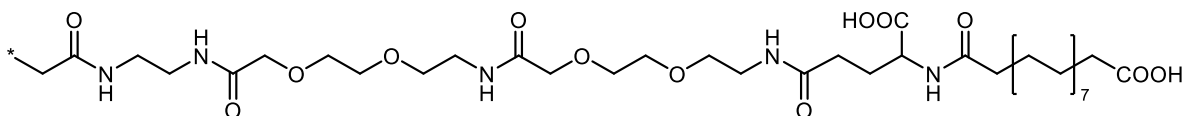
(sustancia química 6a);



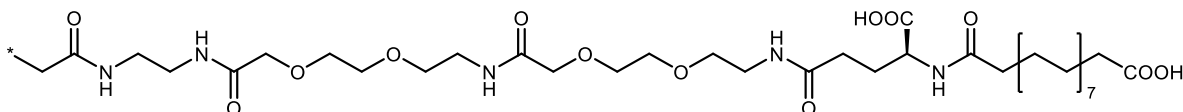
(sustancia química 7);



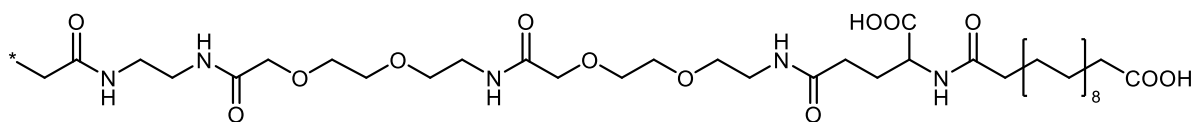
(sustancia química 7a);



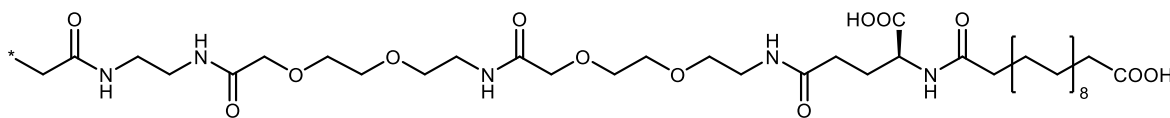
(sustancia química 8);



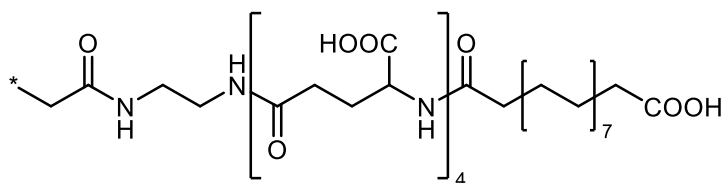
(sustancia química 8a);



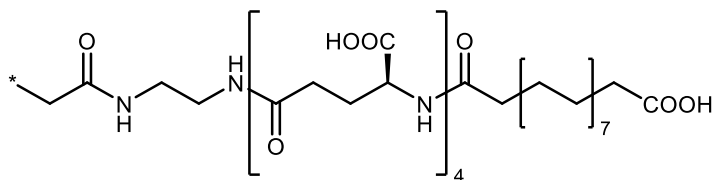
(sustancia química 9);



5 (sustancia química 9a);



(sustancia química 10), y



(sustancia química 10a);

- 10 en donde * denota el punto de acoplamiento del resto de unión a albúmina a la variante de la hormona del crecimiento a través del residuo de azufre de la cadena lateral de la cisteína en la posición 101 de la variante de la hormona del crecimiento.

Compuestos

- 15 En una modalidad, la presente descripción proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento que comprende:

- a. una variante de la hormona del crecimiento que comprende al menos las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la hormona del crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1): L101C, G120R/G120K, y en donde la variante de la hormona del crecimiento tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1; y
- 20 b. un resto de unión a albúmina configurado para unirse a la albúmina, por ejemplo, unirse a la albúmina con una constante de disociación (Kd) de menos de 1 μ M, en donde el resto de unión a albúmina tiene un peso molecular de 3 kDa o menos y se une covalentemente a la variante de la

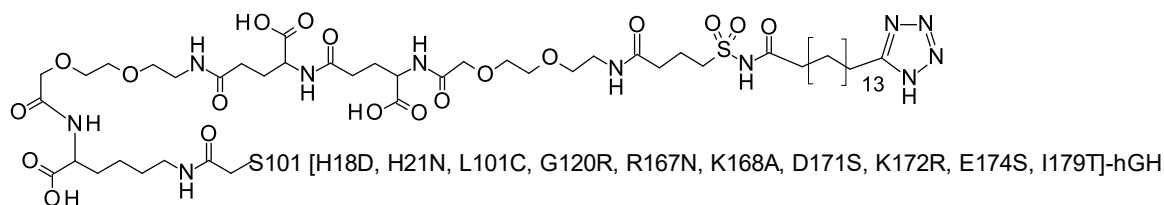
hormona del crecimiento a través del residuo de azufre de la cadena lateral de la cisteína en la posición 101 de la variante de la hormona del crecimiento;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento tiene al menos 81 % de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, tal como al menos 82 %, tal como al menos 83 %, tal como al menos 84 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 86 %, tal como al menos 87 %, tal como al menos 88 %, tal como al menos 89 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 91 %, tal como al menos 92 %, tal como al menos 93 %, tal como al menos 94 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1.

En una modalidad, el LA-GHRA de la presente invención se selecciona de un compuesto descrito específicamente en la presente descripción. A continuación, las fórmulas describen específicamente los compuestos 1-19, donde las mutaciones representadas entre corchetes se refieren a mutaciones específicas en comparación con la hormona del crecimiento humana, es decir, el polipéptido de SEQ ID NO: 1. Para ejemplificar, la notación “-S101[H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]” se refiere específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 (hormona del crecimiento humana), en donde cada una de las posiciones entre corchetes “[]” se han mutado como se especifica mediante el código de aminoácidos de una letra. La notación especifica además que el resto de unión a albúmina se une a la cisteína en la posición 101 cuando el resto de unión a albúmina se une covalentemente a S101.

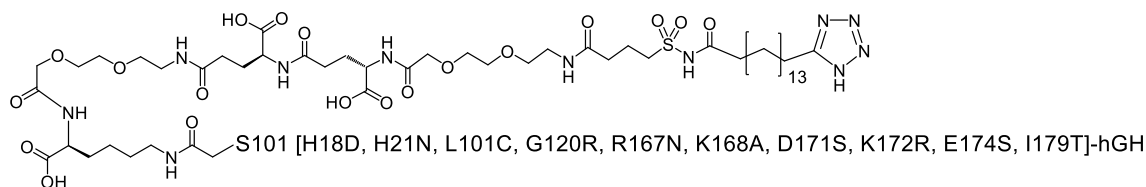
En una modalidad, el LA-GHRA se selecciona del grupo que consiste en:

Compuesto 1:

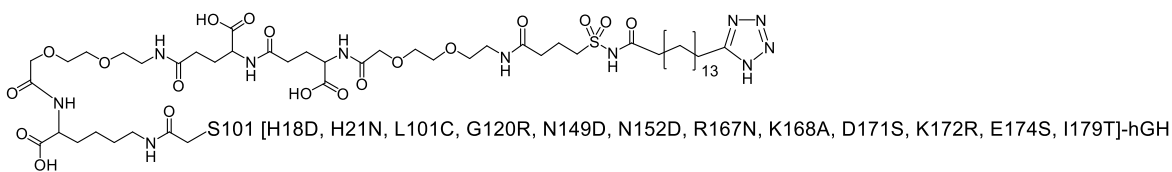


(sustancia química 1);

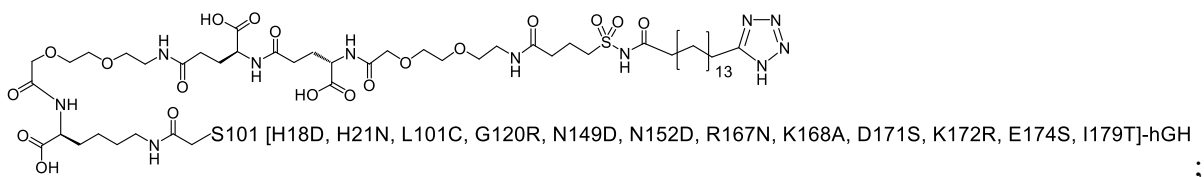
Compuesto 1a:



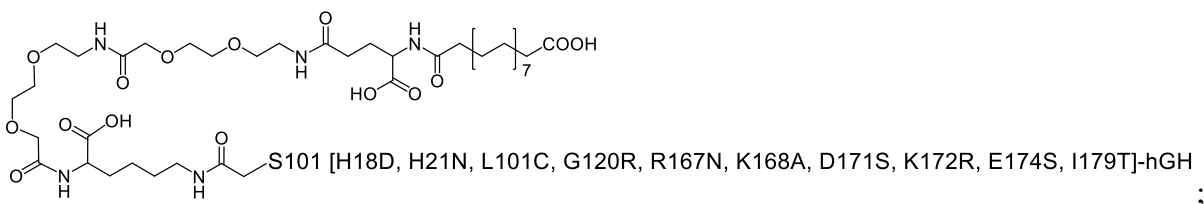
Compuesto 3:



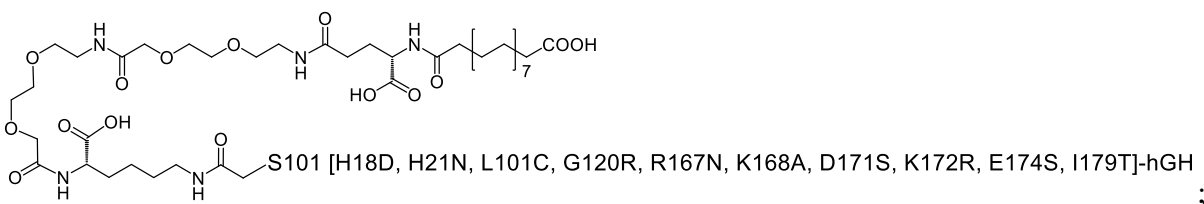
Compuesto 3a:



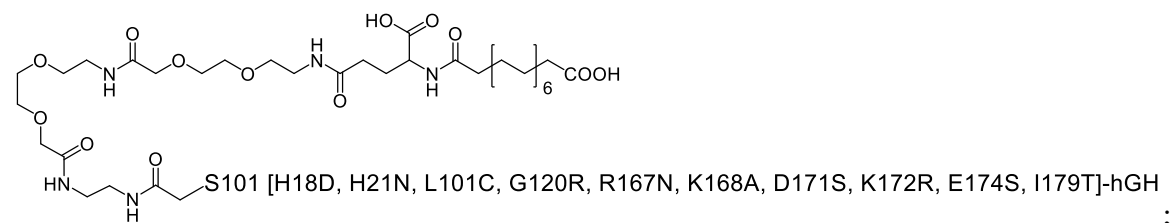
5 Compuesto 4:



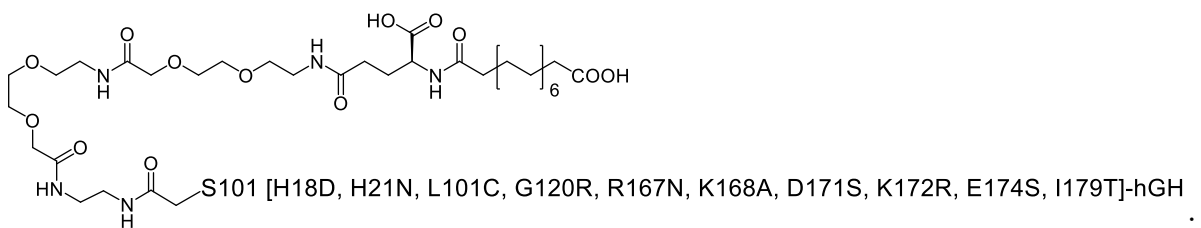
Compuesto 4a:



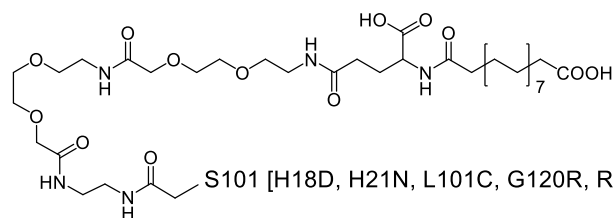
Compuesto 5:



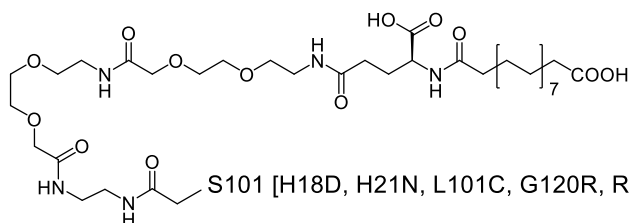
Compuesto 5a:



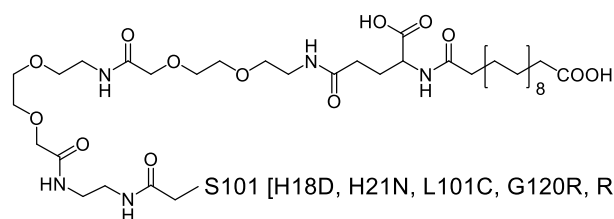
Compuesto 6:



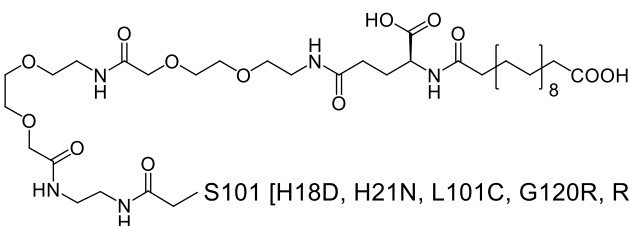
Compuesto 6a:



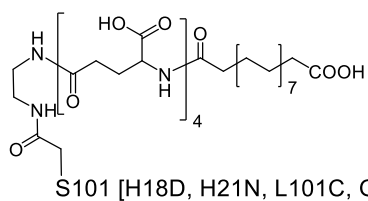
Compuesto 7:



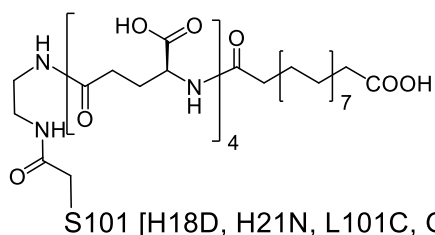
Compuesto 7a:



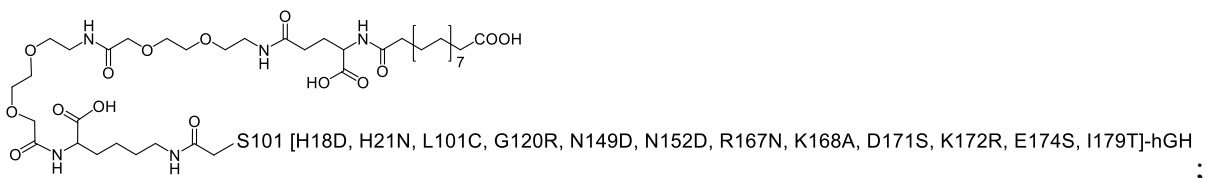
Compuesto 8:



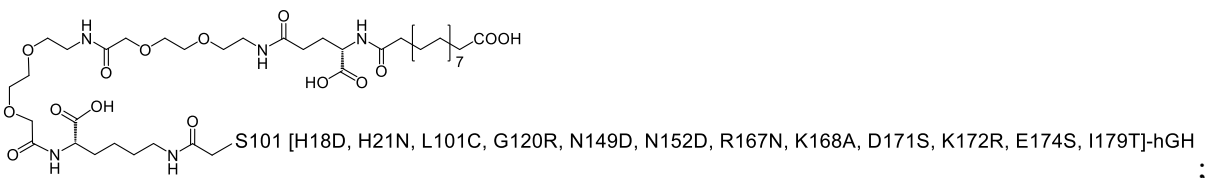
10 Compuesto 8a:



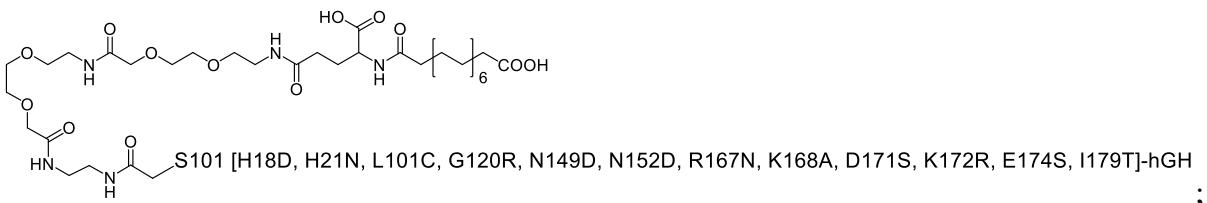
Compuesto 9:



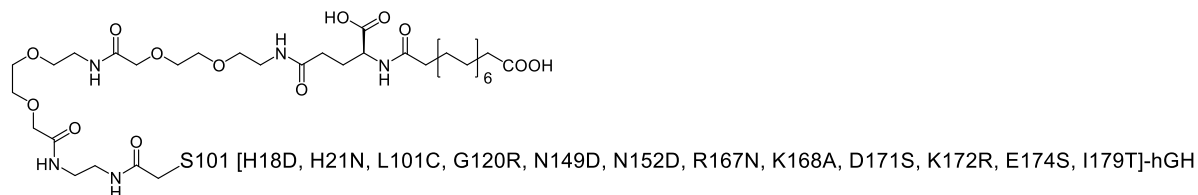
Compuesto 9a:



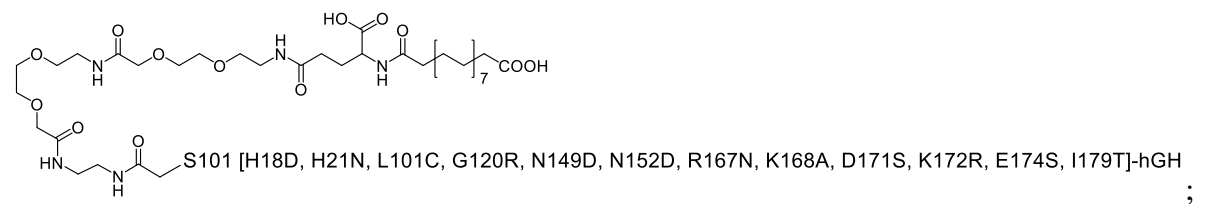
5 Compuesto 10:



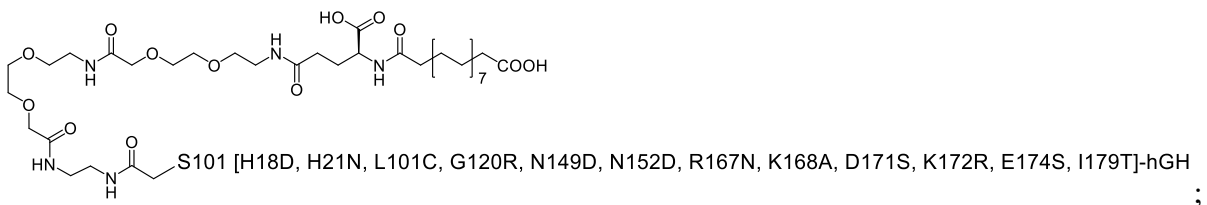
Compuesto 10a:



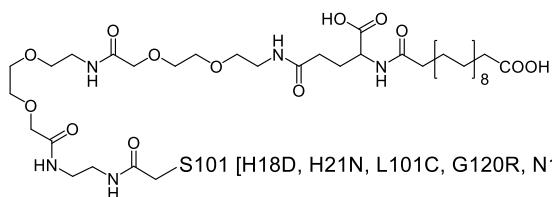
Compuesto 11:



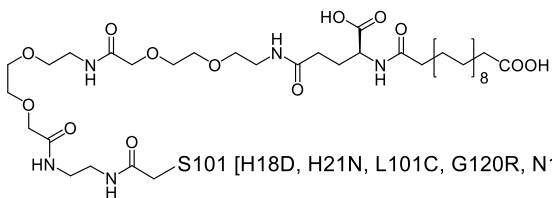
Compuesto 11a:



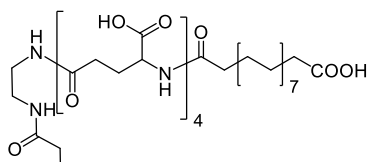
Compuesto 12:



Compuesto 12a:

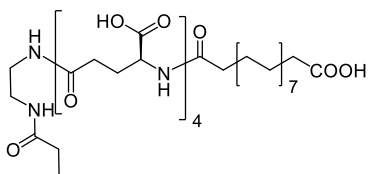


Compuesto 13:



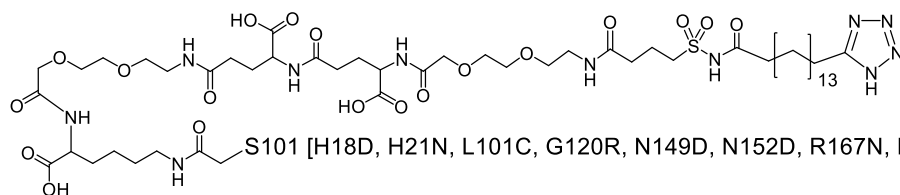
5 S101 [H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]-hGH.

Compuesto 13a:

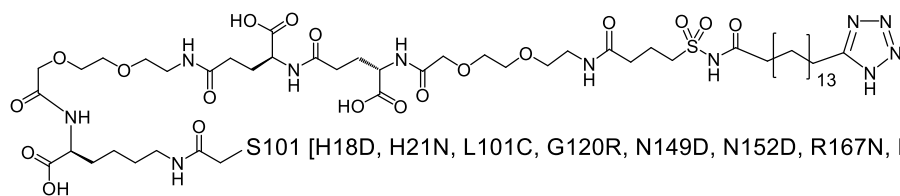


S101 [H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]-hGH.

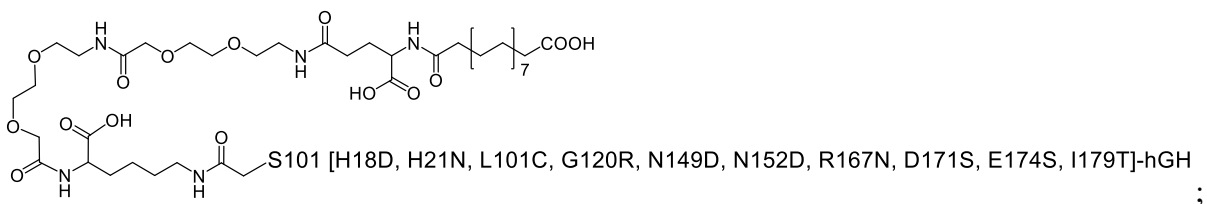
Compuesto 14:



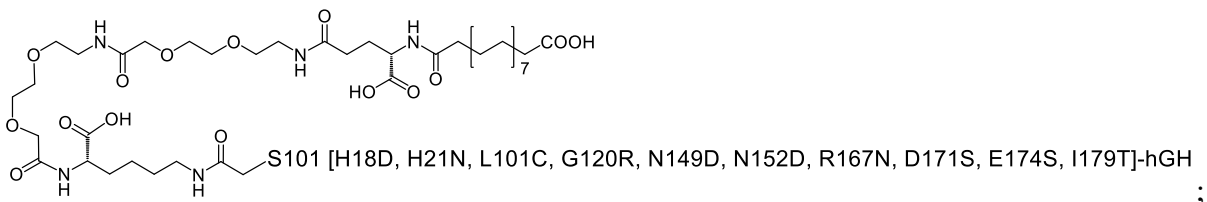
10 Compuesto 14a:



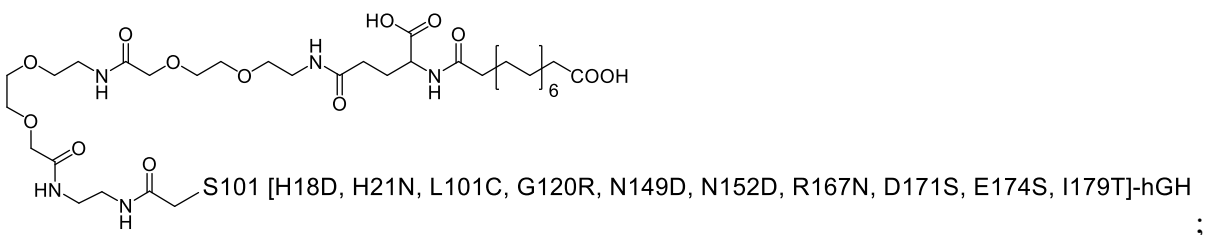
Compuesto 15:



Compuesto 15a:

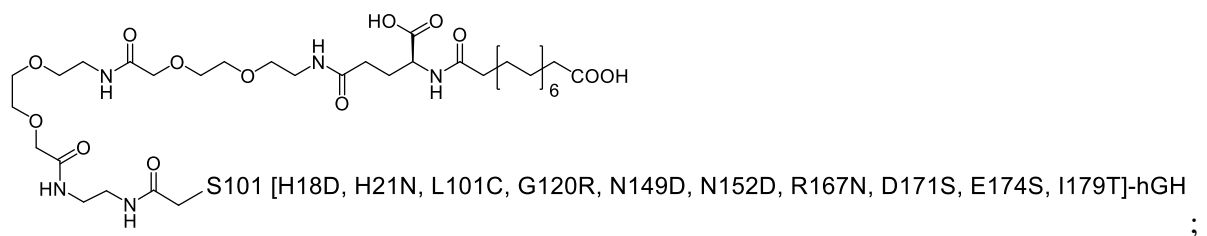


Compuesto 16:

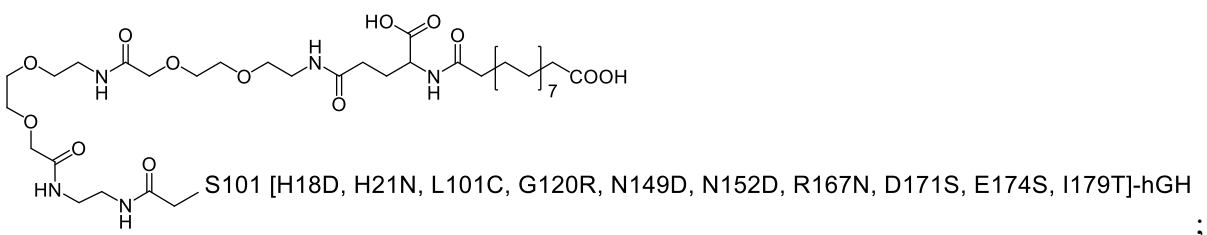


5

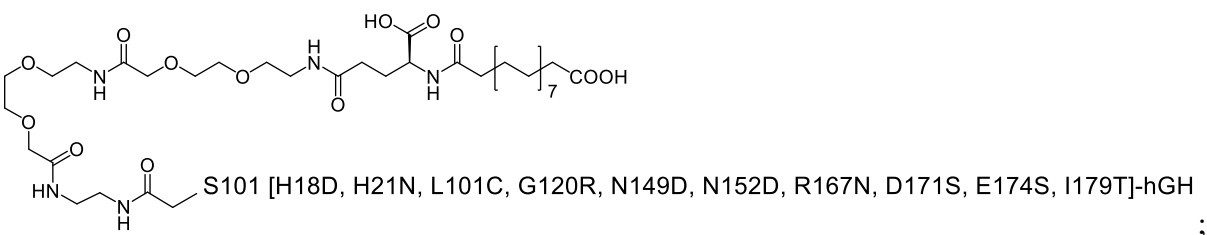
Compuesto 16a:



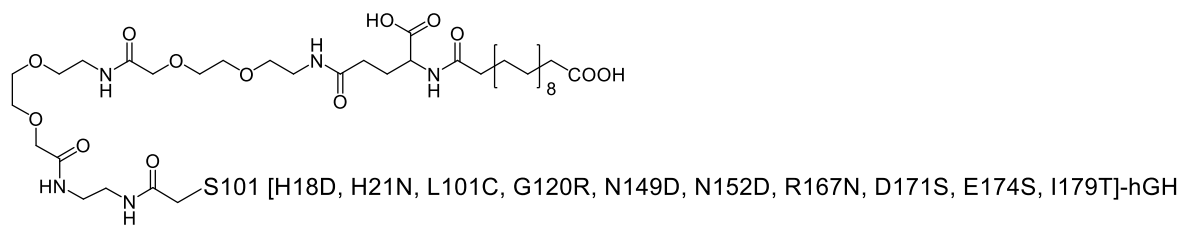
Compuesto 17:



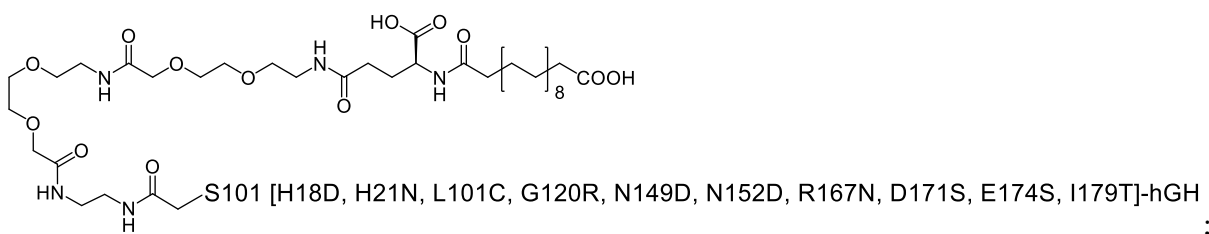
10 Compuesto 17a:



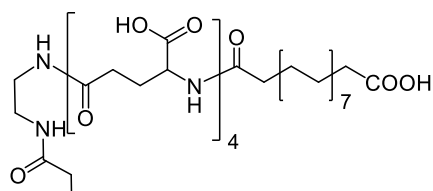
Compuesto 18:



Compuesto 18a:



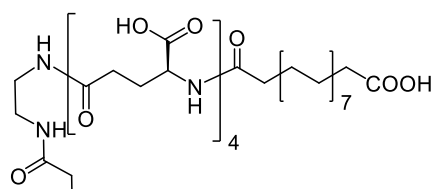
Compuesto 19:



5 S101 [H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, D171S, E174S, I179T]-hGH,

y

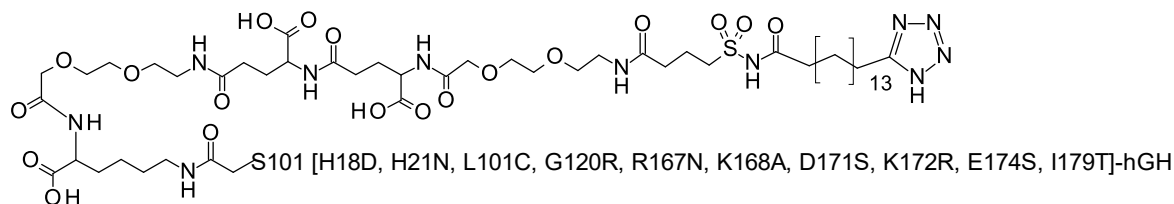
Compuesto 19a:



S101 [H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, D171S, E174S, I179T]-hGH,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

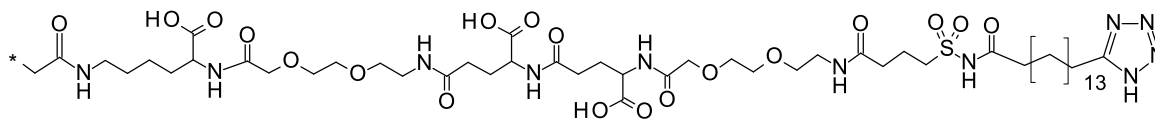
10 En una modalidad, el LA-GHRA de la invención es:



(sustancia química 1).

En una modalidad, se proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento que comprende

- a. una variante de la hormona del crecimiento que comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la hormona del crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1): H18D, H21N, L101C, G120R/G120K, R167N, D171S, E174S, I179T, y
- b. un resto de unión a albúmina definido por la sustancia química 2



(sustancia química 2)

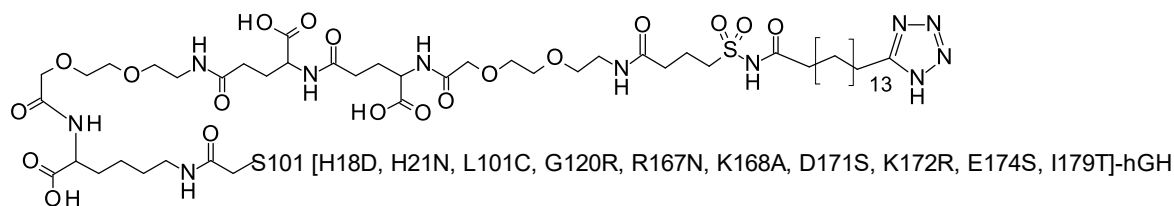
en donde * denota el punto de acoplamiento del resto de unión a albúmina a la variante de la hormona del crecimiento a través del residuo de azufre de la cadena lateral de la cisteína en la posición 101 de la variante de la hormona del crecimiento; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En una modalidad, se proporciona un LA-GHRA, en donde la variante de la hormona del crecimiento comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la hormona del crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1): H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T.

En una modalidad, el LA-GHRA es el compuesto 1 (sustancia química 1a), como se describe en el Ejemplo 1 en la presente descripción también denominado compuesto 1a. En una modalidad, el LA-GHRA comprende uno o más puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y/o Cys182-Cys189. En una modalidad, el compuesto 1 comprende uno o más puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y/o Cys182-Cys189.

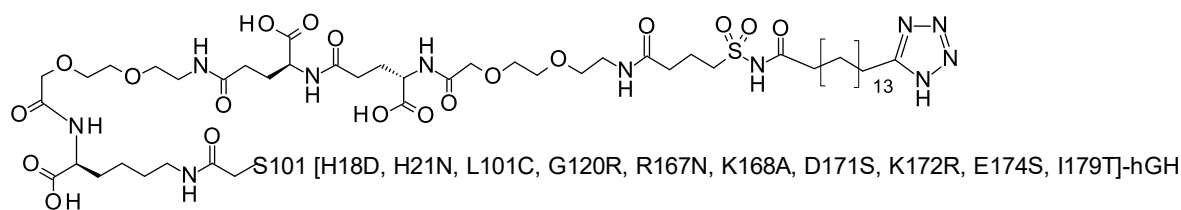
En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento consiste en [H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]-hGH (SEQ ID NO: 2), y el resto de unión a albúmina es la sustancia química 2.

En una modalidad, el antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento es la sustancia química 1:



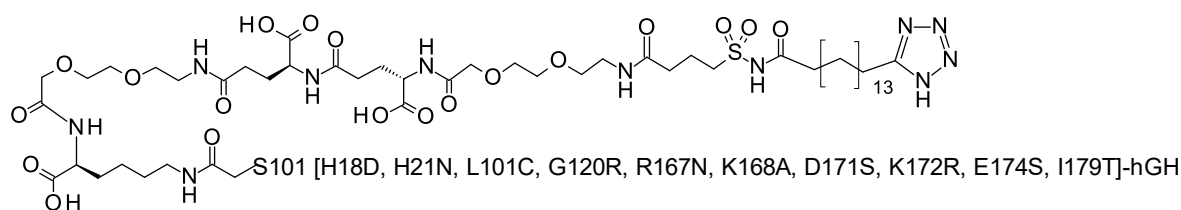
25 (sustancia química 1).

En una modalidad, el antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento es el compuesto 1 (sustancia química 1a):



(sustancia química 1a).

En una modalidad, se proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento de compuesto 1a:



5

(compuesto 1a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene opcionalmente uno o dos puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y/o Cys182-Cys189.

En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende uno o dos puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y/o Cys182-Cys189. En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende dos puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y Cys182-Cys189. En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende un puente disulfuro entre Cys53-Cys165. En una modalidad, la variante de la hormona del crecimiento comprende un puente disulfuro entre Cys182-Cys189.

Propiedades funcionales

15 En un primer aspecto funcional, el LA-GHRA de la invención, por ejemplo, el compuesto 1a, o la cadena principal polipeptídica del mismo, muestra una fuerte afinidad de unión al hGHR. Esto puede determinarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 2 o 3 en la presente descripción. La afinidad de unión puede expresarse por el valor de K_D , y se desea tener una unión fuerte al hGHR, que corresponde a un valor de K_D bajo.

20 En un segundo aspecto funcional, el LA-GHRA de la invención, por ejemplo, el compuesto 1a, o la cadena principal polipeptídica del mismo, no activa el receptor de la hormona del crecimiento o muestra una activación reducida en comparación con la respuesta natural de la hGH, es decir, que es un antagonista del GHR. Particularmente, esto puede determinarse mediante ensayos de actividad *in vitro* (modo antagonista) tal como se describe en los Ejemplos 4 y 5 en la presente descripción.

Generalmente, la actividad o potencia (modo antagonista) debe ser lo más buena posible, es decir, correspondiente a un valor de CI_{50} bajo.

En un tercer aspecto funcional, el LA-GHRA de la invención, por ejemplo, el compuesto 1a, o la cadena principal polipeptídica del mismo, tienen propiedades farmacocinéticas convenientes tales como un aumento de la semivida terminal en comparación con la hGH. El aumento de la semivida terminal significa que el compuesto en cuestión se elimina del cuerpo más lentamente y, por tanto, se extiende la duración del efecto farmacológico del compuesto. Una semivida conveniente significa una tasa que lo hace adecuado, por ejemplo, para la administración diaria o semanal, preferentemente la administración semanal. En una modalidad particular, las propiedades farmacocinéticas pueden determinarse como la semivida terminal ($t_{1/2}$) *in vivo* en ratas Sprague-Dawley después de la administración i.v. o s.c., por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 5 en la presente descripción. En una modalidad, la semivida en ratas Sprague-Dawley es de al menos 5 h, tal como al menos 8 h o al menos 12 h.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento se une al receptor de la hGH en un ensayo de SPR, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2 en la presente descripción.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento se une al receptor de la hGH en un ensayo de afinidad de unión por ITC, tal como se describe en el Ejemplo 3 en la presente descripción.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento es un antagonista en el receptor de la hormona del crecimiento.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento es capaz de inhibir la actividad de la hGH.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento es capaz de inhibir la actividad de la hGH en un ensayo de actividad por STAT3, tal como se describe en el Ejemplo 4 en la presente descripción.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento es capaz de inhibir la actividad de la hGH en un ensayo de actividad BAF-3 GHR, tal como se describe en el Ejemplo 5 en la presente descripción.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento tiene mejores propiedades farmacocinéticas.

En una modalidad, el antagonista del receptor de la hormona del crecimiento tiene un aumento de la semivida terminal, cuando se determina en ratas, tal como se describe en el Ejemplo 6 en la presente descripción.

Procesos de producción

- 5 El LA-GHRA de la invención puede producirse mediante una combinación de técnicas recombinantes seguidas de modificación química, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1 en la presente descripción. La variante de la hormona del crecimiento, tal como la SEQ ID NO: 2, puede prepararse mediante métodos recombinantes, es decir, mediante el cultivo de una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica la variante de la hormona del crecimiento, y capaz de
- 10 expresar el polipéptido en un medio de nutrientes adecuado en condiciones que permitan la expresión del polipéptido. Los ejemplos no limitantes de células huésped adecuadas para la expresión de estos polipéptidos son: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, así como también líneas celulares de mamíferos BHK o CHO. El ejemplo específico de un método para preparar la SEQ ID NO: 2 se incluye en la parte experimental. Ejemplos específicos de un método para preparar la SEQ ID NO:
- 15 3 y 4 también se incluyen en la parte experimental.

En una modalidad, se proporciona un proceso para preparar una variante de la hormona del crecimiento humana seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un vector como se define en la presente descripción.

- 20 En una modalidad, se proporciona un proceso para preparar una variante de la hormona del crecimiento humana de SEQ ID NO: 2, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un vector como se define específicamente en la presente descripción.

Composiciones farmacéuticas

- Las composiciones farmacéuticas inyectables que comprenden el antagonista de la presente invención pueden prepararse mediante el uso de las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para obtener el producto final deseado. Por tanto, de acuerdo con un procedimiento, el antagonista de la presente invención se disuelve en un tampón adecuado a un pH adecuado para minimizar o evitar la precipitación. La composición inyectable se esteriliza, por ejemplo, mediante esterilización por
- 25
- 30 filtración.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el antagonista de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden prepararse como se conoce en la técnica.

El término "excipiente" se refiere, en un sentido amplio, a cualquier componente además del (de los) ingrediente(s) terapéutico(s) activo(s). El excipiente puede ser una sustancia inerte, una sustancia inactiva, y/o una sustancia no activa medicinalmente.

La formulación de los principios activos con diversos excipientes se conoce en la técnica, ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ejemplo, 19.^a edición (1995) y cualquiera de las ediciones posteriores).

Una composición puede ser una formulación estabilizada. El término "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con un aumento de la estabilidad física y/o química, preferentemente ambas. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de conformidad con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

La composición farmacéutica puede administrarse a un individuo a través de la administración parenteral, que incluye la inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión.

En un aspecto de la invención, el antagonista de la invención se combina con un análogo de la somatostatina, por ejemplo, en una forma organizada por módulos, que comprende una preparación del antagonista de la invención como una primera forma farmacéutica unitaria y una preparación del análogo de la somatostatina como una segunda forma farmacéutica unitaria.

Los ejemplos no limitantes de análogos de la somatostatina que se combinan con el antagonista de la presente invención son octreotida, lanreotida, pasireotida o derivados de los mismos.

En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento como se define en la presente descripción y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En modalidades particulares, el antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento es el compuesto 1a.

Indicaciones farmacéuticas

La presente invención también se refiere a un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento para su uso como un medicamento. En una modalidad, la presente descripción proporciona un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del

crecimiento como se define específicamente en la presente descripción, tal como el compuesto 1a, para su uso como un medicamento.

Además, o alternativamente, la presente invención se refiere a una variante de acción prolongada de la hormona del crecimiento que es un antagonista en el receptor de la hormona del crecimiento, para su uso como un medicamento. En una modalidad particular, la presente invención se refiere al compuesto 1a para su uso como un medicamento. En particular, el antagonista de la invención puede usarse para el tratamiento de enfermedades causadas por niveles excesivos de la hormona del crecimiento y/o del IGF-1.

En modalidades particulares, el antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento de la invención puede usarse para el tratamiento de las siguientes indicaciones médicas tales como, pero sin limitarse a, acromegalia, gigantismo, diversos tipos de cáncer donde el IGF-1 es un factor de crecimiento, diabetes mellitus, retinopatía diabética, nefropatía diabética.

En una modalidad particular, la indicación es la acromegalia.

Ácidos nucleicos, vectores, y células huésped

En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos en comparación con la hGH:

H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T (GHv-1);

H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T (GHv-2); o

H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, D171S, E174S, e I179T (GHv-3).

En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos en comparación con la hGH:

H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T.

En una modalidad, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende la siguiente modificación de aminoácido en comparación con la hGH:

H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T (GHv-1);

H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T (GHv-2); o

H18D, H21N, L101C, G120R, N149D, N152D, R167N, D171S, E174S, e I179T (GHv-3).

En una modalidad, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende la siguiente modificación de aminoácido en comparación con la hGH:

H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, e I179T.

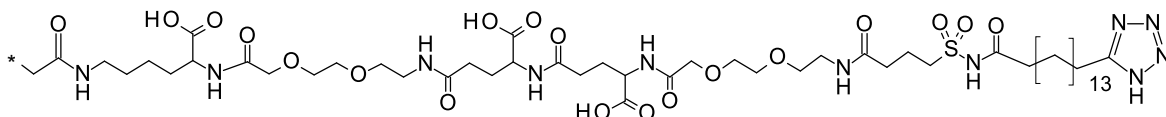
- 5 En una modalidad, se proporciona el vector en donde la variante de la hormona del crecimiento humana se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4. En una modalidad, se proporciona el vector en donde la variante de la hormona del crecimiento humana es la SEQ ID NO: 2.

10 En una modalidad, se proporciona una célula huésped que comprende un vector como se define en la presente descripción.

Modalidades

La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes modalidades no limitantes:

1. Un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento que comprende
 - 15 a. una variante de la hormona del crecimiento que comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la hormona del crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1): L101C, G120R/G120K, y
 - b. un resto de unión a albúmina definido por la sustancia química 2



20 (sustancia química 2)

en donde * denota el punto de acoplamiento del resto de unión a albúmina a la variante de la hormona del crecimiento a través del residuo de azufre de la cadena lateral de la cisteína en la posición 101 de la variante de la hormona del crecimiento;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 25 2. El antagonista de acuerdo con la modalidad 1 que comprende
 - a. una variante de la hormona del crecimiento que comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la hormona del crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1): H18D, H21N, L101C, G120R/G120K, R167N, D171S, E174S, I179T.

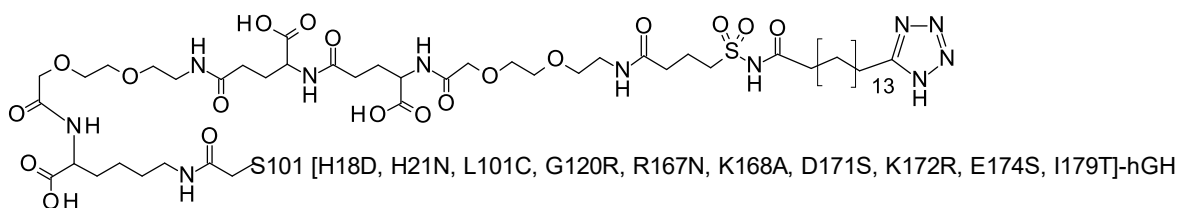
3. El antagonista de acuerdo con las modalidades 1-2, en donde la variante de la hormona del crecimiento comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la hGH: H18D, H21N, L101C, G120R/G120K, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T.

4. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la sustitución en la posición 120 es G120R.

5. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variante de la hormona del crecimiento comprende 1-10, tal como 2-8 o 3-5 sustituciones de aminoácidos adicionales.

6. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variante de la hormona del crecimiento consiste en [H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]-hGH (SEQ ID NO: 2), y el resto de unión a albúmina es la sustancia química 2.

7. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, que es la sustancia química 1:



(sustancia química 1).

8. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, que es el compuesto 1 (sustancia química 1a).

9. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variante de la hormona del crecimiento comprende uno o dos puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y/o Cys182-Cys189.

10. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variante de la hormona del crecimiento comprende dos puentes disulfuro entre Cys53-Cys165 y Cys182-Cys189.

11. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-9, en donde la variante de la hormona del crecimiento comprende un puente disulfuro entre Cys53-Cys165.

12. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-9, en donde la variante de la hormona del crecimiento comprende un puente disulfuro entre Cys182-Cys189.

13. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variante de la hormona del crecimiento tiene una longitud de 191 aminoácidos.
14. El antagonista de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variante de la hormona del crecimiento es un antagonista del receptor de la hormona del crecimiento.
- 5 15. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que es capaz de unirse al receptor de la hormona del crecimiento.
16. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se une a la hGH en un ensayo de SPR, como se describe en el Ejemplo 2 en la presente descripción.
17. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se une a la
10 hGH en un ensayo de afinidad de unión por ITC tal como se describe en el Ejemplo 3 en la presente descripción.
18. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que es un antagonista en el receptor de la hormona del crecimiento.
19. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que es capaz de
15 inhibir la actividad de la hGH.
20. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que es capaz de inhibir la actividad de la hGH en un ensayo de actividad de STAT3 tal como se describe en el Ejemplo 4 en la presente descripción.
21. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que es capaz de
20 inhibir la actividad de la hGH en un ensayo de actividad BAF-3 GHR, tal como se describe en el Ejemplo 5 en la presente descripción.
22. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene mejores propiedades farmacocinéticas.
23. El antagonista de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que tiene un
25 aumento de la semivida terminal cuando se determina en ratas, tal como se describe en el Ejemplo 6 en la presente descripción.
24. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de acción prolongada del receptor de la hormona del crecimiento de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-23, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 25. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-23, para su uso como un medicamento.

26. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-23, para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por niveles excesivos de la hormona del crecimiento humana y/o del IGF-1, tal como acromegalia o gigantismo.
27. El compuesto para su uso de acuerdo con la modalidad 26 en combinación con un análogo de la somatostatina, tal como octreotida, lanreotida, pasireotida o derivados de los mismos.
28. El compuesto para su uso de acuerdo con la modalidad 27, en donde el análogo de la somatostatina es octreotida.
29. Uso del compuesto, de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-23, para la preparación de un medicamento.
30. El uso del compuesto, de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-23, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por el exceso de la hormona del crecimiento humana y/o del IGF-1, tal como acromegalia o gigantismo.
31. Un método de tratamiento de enfermedades causadas por niveles excesivos de la hormona del crecimiento humana y/o del IGF-1, tal como acromegalia o gigantismo, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-23.
32. Un método de tratamiento de enfermedades causadas por niveles excesivos de la hormona del crecimiento humana y/o del IGF-1, tal como acromegalia o gigantismo, que comprende una cantidad farmacéuticamente activa del compuesto 1 (sustancia química 1a).
33. Un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende las siguientes modificaciones de aminoácidos en comparación con la hGH:
H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T.
34. El ácido nucleico de acuerdo con la modalidad 33, en donde la variante de la hormona del crecimiento es la SEQ ID NO: 2.
35. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de la hormona del crecimiento humana que comprende la siguiente modificación de aminoácido en comparación con la hGH:
H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T.
36. El vector de acuerdo con la modalidad 35, en donde la variante de la hormona del crecimiento humana es la SEQ ID NO: 2.
37. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-36.

38. Un proceso para preparar una variante de la hormona del crecimiento humana de SEQ ID NO: 2 que comprende cultivar una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 35-36.

39. El proceso de acuerdo con la modalidad 38 que comprende además la alquilación de la variante de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 en la Cys101 con un resto de unión a albúmina de acuerdo con la sustancia química 2, tal como la sustancia química 2a, por ejemplo, mediante el uso de una haloacetamida de acuerdo con, por ejemplo, la sustancia química 3, sustancia química 3a, sustancia química 4, sustancia química 4a, sustancia química 5 o sustancia química 5a.

10 EJEMPLOS

Lista de abreviaturas:

Ado: (2[2-(amino)etoxi]etoxi)acetilo

CAD: Detector de aerosol cargado

DCM: diclorometano, CH₂Cl₂, cloruro de metileno

15 DIC: diisopropilcarbodiimida

DIPEA: N,N-diisopropiletilamina

DMF: N,N-dimetilformamida

DTT: 1,4-ditiotreitol

ECD: Dominio extracelular

20 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

eq.: Equivalente(s)

Et₂O: éter dietílico

FBS: Suero Fetal Bovino

Fmoc: 9H-fluoren-9-ilmetoxycarbonilo

25 gGlu: ácido gamma glutámico; γGlu

GH: Hormona del crecimiento

h: hora(s)

hGH: hormona del crecimiento humana

hGHR: receptor de la hormona del crecimiento humana

30 hGHRA: antagonista del receptor de la hormona del crecimiento humana

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1

IP TG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

i.v.: intravenosa

LB Amp: Caldo de lisogenia que contiene ampicilina

LCMS: cromatografía líquida - espectrometría de masas

5 m/z: relación de la masa con respecto a la carga

MALS: Dispersión de luz en múltiples ángulos

MeCN: acetonitrilo

min: minuto(s)

MTT: 4-metiltrilito

10 NHS: N-hidroxisuccinimida

NMP: N-metilpirrolidin-2-ona

DO: Densidad óptica

OtBu: éster terc-butílico

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

15 Rcf: fuerza centrífuga relativa

rpm: revoluciones por minuto

TA: temperatura ambiente

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño

s.c.: subcutánea

20 Su: N-hidroxisuccinimida

TBAmp: Caldo Terrific que contiene ampicilina

tBu: terc-butilo

TFA: ácido trifluoroacético

TIS: triisopropilsilano

25 TNBS: ácido trinitrobencenosulfónico

UPLC: Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento

Métodos Generales:

Método de LCMS:

La caracterización se realizó mediante análisis de LCMS mediante el uso de una UPLC H Class

30 Acquity de Waters, con una columna de proteínas BEH UPLC Acquity de Waters (C4, 300 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm) equipada con un detector Xevo G2-XS QToF de Waters. Se usó como eluyente un sistema de agua/MeCN (gradiente lineal de MeCN al 5-95 % durante 6 min que contenía TFA al

0.1 %). La columna se operó a un régimen de flujo de 0.4 ml/min y a una temperatura de 60 °C. Los espectros de masa se registraron en el intervalo de 200-3,000 Da y se deconvolucionaron mediante el uso de MassLynx versión 4.2.

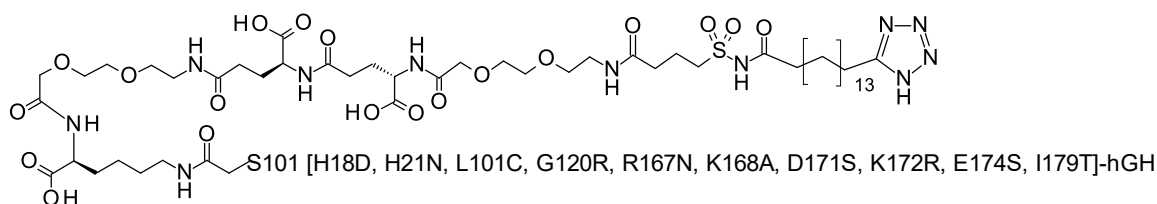
Método de UPLC:

- 5 La pureza se abordó mediante análisis UPLC mediante el uso de un sistema UPLC de Waters equipado con una columna Acquity UPLC BEH300 C4 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm. El sistema se equipó además con una configuración del detector PDA Acquity de Waters para detectar a 214 nm / 280 nm. Los eluyentes consistieron en TFA al 0.05 % en agua Milli-Q (A) y TFA al 0.05 % en acetonitrilo (B). Se empleó un sistema de gradiente lineal que funciona de 25 % a 75 % de B, con un tiempo de ejecución del gradiente de 6 min. La columna se operó a un régimen de flujo de 0.4 ml/min y a una temperatura de 40 °C. La pureza se definió como el AUC del pico en relación con el AUC total del pico del solvente exclusivo (en por ciento) como se informó por el software del sistema para cada longitud de onda UV.

Método CAD:

- 15 Las concentraciones se determinaron mediante el uso de un sistema de detección CAD. Las muestras se procesaron en un sistema Vanquish Thermo-Fisher, mediante el uso de una columna CSH C4, 50 x 2.1 mm, 1.7 μ m de Waters, equipada con un detector CAD/Corona. Se usó como eluyente un sistema de agua/MeCN (gradiente lineal de MeCN al 5-95 % durante 6 min que contenía TFA al 0.1 %). La columna se operó a un régimen de flujo de 0.45 ml/min y a una temperatura de 40 °C. Las cuantificaciones se realizaron con relación al estándar de insulina aspart.

Ejemplo 1: Preparación del compuesto 1, antagonista del receptor de la GH (sustancia química 1a):



(sustancia química 1a)

El compuesto 1a se obtuvo mediante el uso de las siguientes etapas generales:

- 25 i) Expresión de la cadena principal peptídica del GHRA en *E. coli* para obtener el disulfuro mixto en Cys101 protegido con cistamina.
- ii) Síntesis de la yodoacetamida del resto de unión a albúmina (sustancia química 5a).

iii) Desprotección del disulfuro mixto en Cys101 y sustitución nucleófila con yodoacetamida (sustancia química 5a).

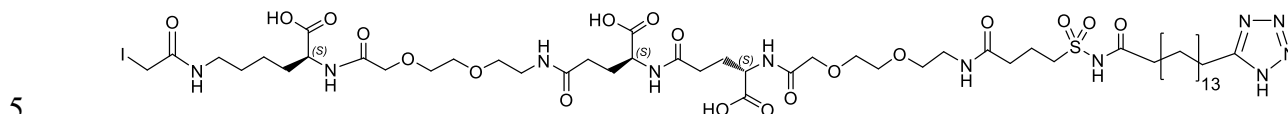
Los detalles de cada etapa se muestran más abajo o, alternativamente, el compuesto puede obtenerse mediante el uso de los procedimientos como se describen en el documento WO2011/089255, (ver
 5 página 132, línea 17 – página 137; Ejemplo 44, página 161, línea 5 – página 164, línea 11).

i) Método para preparar la cadena principal del antagonista del receptor de la GH (compuesto 2; SEQ ID NO: 2)

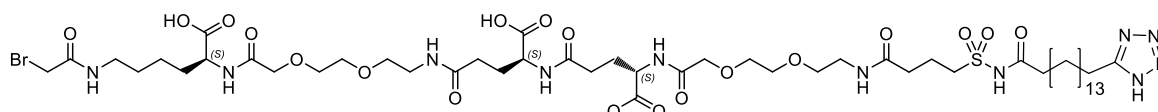
Se preparó un vector plasmídico que codifica Hisx6-SUMO-[H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]-hGH y se transfectó en *E. coli*. Luego, las células se
 10 cultivaron en medio LBamp a 30 °C durante toda la noche, antes de transferirse al medio TBamp y cultivarse a 37 °C hasta que la densidad óptica (DO) alcanzó 1.8. La expresión de la proteína diana se indujo con una concentración final de 0.1 mM de IPTG a 16 °C durante toda la noche. El sedimento celular se recolectó luego mediante centrifugación y se rompió mediante el homogeneizador de células de alta presión. El material se resuspendió en tampón Tris 20 mM, NaCl
 15 300 mM, cisteamina-2.HCl 1 mM, pH 8.0 que contenía Arg 200 mM a una concentración de 1:10 (p/v). El sobrenadante se recolectó mediante centrifugación y, subsecuentemente, se sometió a purificación por cromatografía en una columna de captura con etiqueta de His Ni Excel. La columna se lavó con 5 volúmenes de lecho de Tris 20 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, cisteamina-2.HCl 1 mM, Arg 200 mM. La etiqueta de His-SUMO se retiró mediante el uso de la proteasa SUMO, dilución de
 20 la proteasa 1:1000 (p/p), a 18 °C, durante toda la noche. A la solución de digestión se añadió NaCl a una concentración de 1 M y se cargó en una columna Phenyl FF. La columna se lavó con 2 volúmenes de lecho de Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 1 M, Arg 200 mM, cistamina-2.HCl 1 mM y luego con 2.5 volúmenes de lecho de Tris 20 mM, pH 7.5, cistamina-2.HCl 1 mM para eluir la proteína. La proteína cruda se purificó adicionalmente al pasarla a través de una columna SEC Hiload 26/60,
 25 Superdex 75, y se eluyó con tampón PBS que contenía cisteamina-2.HCl 1 mM. La proteína diana [H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]-hGH (compuesto 2) se obtuvo en la forma de Cys101 protegida con cistamina (disulfuro mixto) a una concentración de 5.3-6.0 mg/ml, según se determinó mediante el análisis de concentración CAD-C4. La proteína purificada intacta se analizó mediante el uso de LCMS. La masa observada correspondió a la masa
 30 teórica deducida a partir de la secuencia de aminoácidos. El enlace esperado de los enlaces disulfuro se demostró mediante el mapeo de péptidos, mediante el uso de la digestión con tripsina y AspN,

seguido por el análisis de LCMS de la digestión, antes y después de la reducción de los enlaces disulfuro con DTT. LCMS (método general): 22 092 Da.

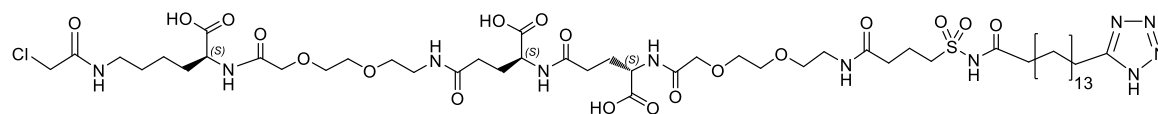
ii) Preparación del aglutinante de albúmina 4-(1H-tetrazol-16-il-hexadecanoilsulfamoil)butanoil-Ado- γ Glu- γ Glu-Ado-N^ε(C(O)CH₂I)Lys-OH (sustancia química 5a):



(sustancia química 5a).



(sustancia química 4a).



10 (sustancia química 3a).

En primer lugar, la bromoacetamida correspondiente (sustancia química 4a) se sintetizó en un soporte sólido de acuerdo con el esquema 1, en la escala de 1 mM mediante el uso de la química estándar péptido-Fmoc en un sintetizador ABI433. El péptido se ensambló en una resina Fmoc-Lys(MTT)-Wang mediante el uso de los aminoácidos protegidos Fmoc-Ado-OH y Fmoc-Glu-OtBu.

El ácido 4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)butírico se acopló manualmente mediante el uso de DIC/NHS en DCM/NMP, 2 eq. durante toda la noche. La resina se trató luego con 50 ml de DCM/TFA/TIS/agua (94:2:2:2), en un arreglo de flujo continuo, hasta que el color amarillo desapareció, seguido de lavado y neutralización con DIPEA/DMF. La resina se trató con una solución de ácido bromoacético (4 mM) en DCM/NMP (1:1), que se activó con una mezcla de NHS y DIC (1 mM de ambos). La mezcla resultante se filtró y luego se combinó con 1 mM adicional de DIPEA. La reacción terminó después de 1 h. La resina se trató con 80 ml de TFA/TIS/agua (95:2.5:2.5) durante 1 h. Se evaporó con una corriente de N₂, se precipitó mediante la adición de Et₂O y se lavó con Et₂O y se secó. El producto crudo se purificó en una HPLC preparativa (2 corridas), con un gradiente de 30-80 % de 0.1 TFA/MeCN frente a TFA al 0.1 % en agua. Las fracciones se recolectaron y liofilizaron con ~50 % de MeCN para proporcionar la sustancia química 4a. TOF-MS: masa 1272.52 (M+1).

El 4-(1H-tetrazol-16-il-hexadecanoilsulfamoil)butanoil-Ado- γ Glu- γ Glu-Ado-N^ε(C(O)CH₂Cl)Lys-OH (sustancia química 3a) puede prepararse mediante el mismo método, mediante el uso de ácido cloroacético en lugar de ácido bromoacético en la última etapa.

La bromoacetamida (sustancia química 4a) estaba convertida, en la etapa final, a la yodoacetamida correspondiente (sustancia química 5a) mediante intercambio de halógenos, como sigue. La sustancia química 4a se suspendió en acetona, y se añadió yoduro de sodio 5 eq. La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h. La reacción se enfrió luego en un baño con hielo durante 15 min. El solvente se decantó y el aceite restante se solidificó al lavarlo con agua. El material sólido se recolectó y se secó al vacío durante 24 h, lo que dio una conversión a yodoacetamida del 45 %, sustancia química 5a.

La yodoacetamida (sustancia química 5a) puede prepararse de manera similar a partir de la cloroacetamida (sustancia química 3a).

10 iii) Preparación del antagonista del receptor de la GH con aglutinante de albúmina en Cys101 (compuesto 1; sustancia química 1a):

Al [H18D, H21N, L101C, G120R, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T]-hGH (21.3 mg) protegido con cistamina en 3.5 ml de PBS que contenía cistamina 1 mM, obtenido como se describió anteriormente i) se le realizó un intercambio de tampón por tampón de trietanolamina 20 mM, NaCl 15 0.1 M, pH 8.5, mediante el uso de columnas de centrifugación y desalinización Zeba (núm. de cat.: 89893 de Thermo Scientific, valor de corte de 7 kDa). Se preparó una solución de 10 mM de sal de bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dihidrato de dipotasio en NaCl 0.1 M, pH 8.5, y se añadieron 2 ml de esta solución (correspondiente a 20 eq.) a la solución polipeptídica protegida con cistamina. La mezcla se agitó durante 1 h a TA. La reducción del disulfuro mixto en Cys101 se confirmó mediante 20 LCMS (método general). A la solución se le realizó de nuevo un intercambio de tampón por tampón de trietanolamina 20 mM, NaCl 0.1 M, pH 8.5, mediante el uso de columnas de centrifugación y desalinización Zeba (núm. de cat.: 89893 de Thermo Scientific, valor de corte de 7 kDa). A la solución con el tampón intercambiado se le añadió el aglutinante de albúmina, sustancia química 5a, como se preparó anteriormente en ii) como un polvo seco (6.5 mg, 5 eq.).

25 La solución transparente se incubó luego durante 3 h a TA. La terminación de la alquilación se confirmó mediante LCMS (método general). La mezcla de reacción se diluyó hasta 25 ml con trietanolamina 20 mM, pH 8.5 que contenía etilenglicol al 10 % (tampón A). La solución se cargó en una columna HiLoad 26/10 A Sepharose HP. El material no unido se eluyó con 2 volúmenes de lecho de tampón A. Luego, la columna se eluyó con un gradiente de tampón B al 0-40 % 30 (trietanolamina 20 mM, NaCl 1 M, etilenglicol al 10 %, pH 8.5). Todas las operaciones se realizaron a 15 °C, con un flujo de 4 ml/min y se monitoreó el eluato a 280 nm. Las fracciones que contenían material puro se recolectaron y se concentraron mediante ultrafiltración (filtros Amicon 3 KDa) se

centrifugaron a 2x20 min a 14 000 rcf. A las soluciones concentradas se les realizó, finalmente, un intercambio de tampón en NH_4HCO_3 10 mM mediante el uso de columnas de centrifugación y desalinización Zeba de 7kDa y se liofilizaron para dar un polvo blanco (10.9 mg). El rendimiento (solo la etapa de alquilación) es de 10.9 mg (50 %). LCMS (electroaspersión): $m/z = 23,206$ Da.

5 Ejemplo 2: Afinidad por receptor de la GH determinada mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR)

El propósito del ejemplo fue determinar la afinidad del compuesto de la presente invención en comparación con el pegvisomant. Los experimentos de SPR se realizaron mediante el uso de instrumentos Biacore T200 y Biacore 8K (Cytiva) a 25 °C. La cinética de unión se determinó
10 mediante el uso de una versión biotinilada con etiqueta Avi del dominio extracelular del receptor de la hormona del crecimiento (hGHR-ECD) que comprende los residuos 19-264 del hGHR.

Para el hGHR-ECD biotinilado, se usó el kit Biotin CAPture (Cytiva; 28920233) que permite la captura reversible de ligandos biotinilados. La superficie del chip se preparó mediante rehidratación en tampón HBS-EP (HEPES 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0.005
15 % v/v) en el instrumento durante toda la noche mediante el uso de un flujo reserva. Antes del experimento, la superficie del chip se acondicionó mediante el uso de solución de regeneración (3 partes del concentrado de regeneración 1 (guanidina-HCl 8 M) y 1 parte del concentrado de regeneración 2 (NaOH 1 M)), seguido de tres ciclos de arranque consecutivos mediante el uso de tampón HBS-EP como analito. Cada ciclo consistió en las siguientes etapas: 1) Reactivo CAPture
20 (incluido en el kit Biotin CAPture) 50 µg/ml en tampón HBS-EP (régimen de flujo: 2 µl/min, tiempo de contacto: 300 s); 2) captura del ligando biotinilado (régimen de flujo: 10 µl/min, tiempo de contacto: 180 s); 3) inyección del analito (compuesto 1a, compuesto 2, somatropina y pegvisomant) (régimen de flujo: 30 µl/min, tiempo de contacto: 120 s, tiempo de disociación: 800 s); y 4) regeneración mediante el uso de solución de regeneración (régimen de flujo: 10 µl/min, tiempo de
25 contacto 60 s). Todos los analitos se diluyeron en tampón HBS-EP y se aplicaron al chip recubierto de ligando en concentraciones de 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 y 0 nM.

El análisis de los datos se realizó mediante el uso del software de evaluación Biacore 8K. El ajuste cinético se realizó después de la sustracción de los valores iniciales y las curvas se ajustaron globalmente mediante el uso de un modelo de unión Langmuir 1:1. Los valores de K_D se calcularon
30 en base a las constantes de asociación (k_a) y disociación (k_d) ajustadas. Los resultados se enumeran en la Tabla 1.

	k_a (1/Ms)		k_d (1/s)		K_D (nM)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Compuesto 1a	3.84E+05	3.23E+04	2.72E-05	4.13E-06	0.07	0.01
Compuesto 2	6.30E+05	3.65E+04	5.23E-05	1.22E-05	0.08	0.02
Pegvisomant	2.49E+04	8.56E+03	5.19E-05	1.20E-05	4.04	1.69
Somatropina	8.42E+05	2.44E+05	1.64E-04	4.57E-05	0.35	0.15

Tabla 1: Valores cinéticos determinados mediante SPR. SEM: Error estándar de la media ($n \geq 3$).

Como se ve en la tabla 1, tanto el compuesto 1a como el compuesto 2 tienen mayor afinidad por el hGHR-ECD en comparación con el pegvisomant.

Ejemplo 3: Afinidad de unión al GHR determinada por calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

- 5 El propósito del ejemplo fue medir las interacciones termodinámicas entre las parejas de unión (receptor/ligando) en solución, con y sin HSA presente, para determinar las afinidades.

- El compuesto 1a, el pegvisomant y la albúmina sérica humana sin ácidos grasos (HSA) (Sigma) se dializaron mediante el uso de casetes de diálisis Slide-A-Lyzer™ durante toda la noche en tampón de histidina 4.38 mM, NaCl 2.05 mM pH 7.1. Todas las proteínas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño con análisis de dispersión de luz en múltiples ángulos (SEC-MALS) para determinar la concentración antes y después de concentrarlas y después de los experimentos de ITC. SEC-MALS se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent de la serie 1200 (Agilent, Darmstadt, Alemania) mediante el uso de una columna TSK G3000 SWXL (Tosoh Bioscience, Tokio). La columna se mantuvo a una temperatura de 20 °C y se equilibró en Na₂HPO₄ 122 mM, NaH₂PO₄ 78 mM, NaCl 300 mM, 2-propanol al 4 %, pH 6.8). La detección se realizó mediante absorción UV a 280 nm, índice de refracción (RI) y dispersión de luz láser en múltiples ángulos (MALS). Los detectores RI y MALS fueron Optilab T-rEX (Wyatt) y MiniDawn Treos (LS) (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, Estados Unidos), respectivamente. Los datos se evaluaron mediante el uso de Chemstation B.03.01 y Astra ver. 6.1.1.17
- 10
- 15
- 20 Los experimentos de ITC se realizaron mediante el uso de un calorímetro PEAQ-ITC (Malvern, Reino Unido) a 37 °C. La celda de muestra (300 µl) contenía 10 µM del compuesto 1a o pegvisomant en presencia de HSA (0, 1, 5 o 10 mg/ml). La jeringa contenía hGHR-ECD (ligando), a 100 µM. A una etapa de equilibrio térmico le siguió un retardo de 60 segundos y, subsecuentemente, una inyección inicial de 0.4 µl de hGHR-ECD, seguido de 25 inyecciones de 1.5 µl y una inyección final
- 25 de 1.1 µl a un intervalo de 120 segundos. La velocidad de agitación fue de 750 rpm, y la energía de

referencia se mantuvo constante a 9.64 $\mu\text{cal/s}$. Tratamiento de datos realizado mediante el uso del software de análisis PEAQ-ITC (Malvern Instruments) mediante el uso de un modelo de ajuste de un sitio con compensación de desplazamiento ajustada. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Compuesto 1a										
[HSA]	N (sitios)		K_D (nM)		ΔH (kcal/mol)		ΔG (kcal/mol)		$T\Delta S$ (kcal/mol)	
mg/ml	Media	SEM	Media	SE M	Media	SE M	Media	SE M	Media	SEM
0	1.09	0.05	2.1	0.3	-32.9	1.1	-12.3	0.1	20.6	1.1
1	1.10	0.05	4.8	0.2	-30.3	0.7	-11.8	0.0	18.5	0.7
5	1.11	0.05	4.9	0.7	-29.6	0.6	-11.8	0.1	17.7	0.6
10	1.11	0.06	3.5	0.2	-29.4	0.9	-12.0	0.1	17.4	0.9
Pegvisomant										
[HSA]	N (sitios)		K_D (nM)		ΔH (kcal/mol)		ΔG (kcal/mol)		$T\Delta S$ (kcal/mol)	
mg/ml	Media	SEM	Media	SE M	Media	SE M	Media	SE M	Media	SEM
0	1.23	0.15	6.6	0.9	-31.2	0.7	-11.6	0.1	19.6	0.8
1	1.17	0.09	6.6	1.3	-31.7	1.0	-11.6	0.1	20.1	1.1
5	1.24	0.12	5.7	0.6	-32.3	0.5	-11.7	0.1	20.6	0.6
10	1.21	0.08	4.8	1.2	-31.5	0.9	-11.9	0.2	19.7	1.0

Tabla 2: Parámetros de unión en el equilibrio a concentraciones crecientes de HSA, determinados mediante el uso de ITC. SEM: Error estándar de la media (n=3)

N es la estequiometría de unión, K_D es la constante de disociación, ΔH es el cambio en la entalpía, ΔG es el cambio en la energía libre de Gibbs, ΔS es el cambio en la entropía y T es la temperatura. Se observa que la K_D para el compuesto 1a es menor que la del pegvisomant, por tanto, el compuesto 1a también muestra mayor afinidad en el ensayo de ITC. También se observa que tanto para el compuesto 1a como para el pegvisomant, la afinidad no cambia significativamente en presencia de HSA en comparación con 0 mg/ml de HSA.

Ejemplo 4: Ensayo *in vitro* de la actividad del receptor de la hormona del crecimiento humana

El propósito del ejemplo fue determinar la actividad de los compuestos seleccionados en cuanto a si actúan como agonistas o antagonistas en el hGHR.

Para evaluar la actividad *in vitro* de los agonistas o antagonistas del receptor de la hormona del crecimiento humana (hGHR), estos se probaron para determinar su capacidad para inducir la fosforilación de STAT3 en células indicadoras que expresan el hGHR. Para producir la línea celular indicadora, las células BHK-21 (ATCC® CCL-10™) se transfectaron de manera estable con un plásmido indicador que codifica un elemento de respuesta a STAT3 acoplado a la luciferasa y un

plásmido de expresión que codifica el hGHR. Se aisló un clon de una única célula para la línea celular indicadora. Cuando las células indicadoras se exponen a un agonista del hGHR, el hGHR causa la fosforilación del factor de transcripción STAT3. El STAT3 fosforilado provoca la activación de la transcripción en el elemento de respuesta a STAT3 y se produce la luciferasa. La luciferasa es capaz de convertir la luciferina en oxiluciferina, un proceso que produce bioluminiscencia. Tras la lisis celular y el suministro del sustrato de la luciferasa, la actividad de la luciferasa puede cuantificarse mediante la detección de la luminiscencia. Por lo tanto, la adición de un agonista del hGRH y la adición subsecuente del reactivo de detección a las células indicadoras provoca la generación de luminiscencia de una manera dependiente de la dosis. Este procedimiento se denomina, más abajo, modo agonista. De manera similar, la adición de un antagonista del hGHR, seguido de la adición de un agonista del hGHR y el reactivo de detección provoca la generación de luminiscencia de una manera inversamente dependiente de la dosis. Este procedimiento se denomina, más abajo, modo antagonista. Al probar una serie de concentraciones diferentes de un agonista o antagonista del hGHR, puede determinarse una concentración efectiva media máxima, denominada CE₅₀ en el modo agonista e CI₅₀ en el modo antagonista. Estas medidas se informan para todos los compuestos probados. En todos los experimentos *in vitro* de actividad del hGHR, se usó somatropina como control positivo para el agonismo del hGHR y se usó pegvisomant como control positivo para el antagonismo del hGHR.

Para realizar el ensayo, las células del clon 9 de BHK21/GHR/STAT3-RE se descongelaron y suspendieron en medio de crecimiento (DMEM (Gibco 31966-021) que contenía FBS al 10 % (Gibco 10091-148) y P/S al 1 % (Lonza DE17-602E)). Luego, las células se sembraron en 25 µl/pocillo a 20,000 células/pocillo en placas blancas opacas de 384 pocillos (Greiner 781080) durante toda la noche. Al día siguiente, los compuestos de prueba se diluyeron en serie en el medio de ensayo (DMEM sin rojo fenol, que contenía OVA al 1 % (Sigma A5505), Tween20 al 0.01 % (Roche 33766700) y P/S al 1 %). Las placas de células se vaciaron y se añadieron a las células, en cuádruple, 20 µl/pocillo de los compuestos de prueba diluidos. Para el modo agonista, se añadieron inmediatamente 5 µl/pocillo del medio de ensayo a la mitad de las placas de células. Para el modo antagonista, se añadieron 5 µl/pocillo de somatropina 5 nM a la otra mitad de las placas de células después de 30 minutos de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de 4 horas de incubación adicionales a 37 °C y 5 % de CO₂, se añadieron 12.5 µl/pocillo del reactivo de detección (Steady-GLO, Promega E2550) a todas las placas de células y las placas se incubaron en la oscuridad durante 15 min a TA. Después, la luminiscencia se detectó mediante un lector de placas EnVision Multimode

(PerkinElmer). Para determinar la CE_{50} y la CI_{50} de cada compuesto de prueba, se realizó una regresión logística de cuatro parámetros en los datos sin procesar para cada compuesto de prueba mediante el uso del paquete SciPy optimize de Python. Cada compuesto de prueba se probó en un mínimo de dos experimentos independientes. Los valores informados son promedios $\pm$ error estándar de la media, en todos los experimentos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Compuesto	Modo agonista CE_{50} (nM)	Modo antagonista CI_{50} (nM)
Somatropina	0.13 ± 0.01	ND
Pegvisomant	ND	256 ± 113
Compuesto 2	ND	9 ± 5
Compuesto 1a	ND	74 ± 1

Tabla 3: Ensayo de actividad hGHR STAT3. ND: No se ha observado ninguna respuesta.

Los datos del agonista muestran, como se esperaba, que la somatropina es un agonista en el hGHR. Además, se observa que ni el pegvisomant, ni el compuesto 1a, ni el compuesto 2, muestran actividad agonista medible. En el modo antagonista, se observa que tanto el pegvisomant, como el compuesto 1a y el compuesto 2 muestran actividad antagonista, sin embargo, el compuesto 1a y el compuesto 2 muestran una mejor actividad antagonista en comparación con el antagonista pegvisomant conocido.

Ejemplo 5: Ensayo BAF-3 GHR para determinar la actividad en el GHR

El propósito del ejemplo fue determinar la actividad de los compuestos seleccionados en cuanto a si actúan como agonistas o antagonistas en el hGHR.

Las células BAF-3 (una línea murina de células linfoides pro-B derivada de la médula ósea) eran, originalmente, dependientes de la IL-3 para su crecimiento y supervivencia. La IL-3 activa JAK-2 y STAT que son los mismos mediadores que la GH activa tras la estimulación. Después de la transfección del receptor de la hormona del crecimiento humana, la línea celular se convirtió en una línea celular dependiente de la hormona del crecimiento. Este clon puede usarse para evaluar el efecto de diferentes muestras de la hormona del crecimiento sobre la supervivencia de la BAF-3GHR. (medio de cultivo: RPMI 1640+GlutaMAXTM +FBS+hGH).

Las células BAF-3GHR se cultivaron en medio de inanición (medio de cultivo sin la hormona del crecimiento) durante 24 h a 37 °C, 5% de CO₂. Luego, las células se usan para probar agonistas o antagonistas del receptor de la hormona del crecimiento.

En el modo agonista, las células se lavaron y resuspendieron en medio de inanición y se sembraron en placas. Se añadieron a las células 10 μ l del compuesto de prueba o del control (hormona del

crecimiento humana en modo agonista) en diferentes concentraciones, y las placas se incubaron durante 68 h a 37 °C, 5 % de CO₂.

En el modo antagonista, las células se lavaron y resuspendieron en medio de inanición y se sembraron en placas. Se añadieron a las células 10 µl de una solución de la hormona del crecimiento a 2 nM, seguido de 10 µl del compuesto de prueba o del control (pegvisomant) en diferentes concentraciones. Luego, las placas se incubaron durante 68 h a 37 °C, 5 % de CO₂.

Se añadió AlamarBlue® a cada pocillo y las células se incubaron durante otras 4 h. AlamarBlue® es un indicador redox, y se reduce por reacciones innatas al metabolismo celular y, por lo tanto, proporciona una medida indirecta del número de células viables.

La actividad metabólica de las células se midió en un lector de fluorescencia de placas. La fluorescencia se midió en el lector de placas a una excitación de 544 nm y una emisión de 590 nm, con agitación antes de la lectura y 9 puntos por pocillo en un patrón cruzado. A partir de las curvas de concentración-respuesta se calculó la actividad (cantidad de un compuesto que estimula/inhibe las células con el 50 %).

Tres compuestos, el pegvisomant, el compuesto 2 y el compuesto 1a, se probaron en el ensayo en el modo agonista, con la somatropina como control positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 4. El pegvisomant, el compuesto 2 y el compuesto 1a se probaron en modo de ensayo antagonista, con el pegvisomant como control positivo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Compuesto	Modo agonista CE ₅₀ (nM)	Modo antagonista CI ₅₀ (nM)
Somatropina (hGH)	0.0654	-
Pegvisomant	ND	205
Compuesto 2	ND	1.39
Compuesto 1a	ND	18.6

Tabla 4: Ensayo de actividad BAF-3 GHR, en modo agonista y antagonista. ND: No se ha observado ninguna respuesta.

Los datos en la Tabla 4, modo agonista, confirman el agonismo de la somatropina con una CE₅₀ estimada de 0.0654 nM, mientras que no se obtuvo ninguna respuesta a la concentración para los otros compuestos de prueba, lo que muestra que ninguno de ellos muestra propiedades agonistas en el ensayo actual.

Los valores de CI₅₀ (modo antagonista) muestran, como se esperaba, que el pegvisomant tiene propiedades antagonistas con una CI₅₀ de 205 nM. También se observa que el compuesto 2 puede inhibir la proliferación de células BAF en presencia de somatropina y tuvo una potencia antagonista

147 veces mayor en comparación con el pegvisomant, mientras que el compuesto 1a tuvo una potencia antagonista 11 veces mayor en comparación con el pegvisomant. Por tanto, se confirma que ambos compuestos 1a y 2 tienen una mejor potencia antagonista en comparación con el pegvisomant.

Ejemplo 6: Datos de PK en ratas – compuesto 1a

- 5 El propósito del ejemplo fue investigar las propiedades farmacocinéticas del compuesto 1a en ratas Sprague-Dawley después de la administración i.v. y s.c. de una dosis única.

En el estudio se incluyeron veinticuatro ratas Sprague-Dawley machos de aproximadamente 250 g. Los animales se aclimataron durante una semana antes de entrar en el estudio. Durante el experimento, los animales se mantuvieron y manipularon de acuerdo con los procedimientos estándar en la unidad animal Novo Nordisk y se les permitió el acceso libre al alimento y al agua. Todas las ratas se pesaron antes del inicio del estudio y, el día de la administración de la dosis, inmediatamente antes de la administración de la dosis. Los animales se dividieron en dos grupos de tratamiento, uno con administración i.v. de la dosis y otro con administración s.c. de la dosis.

- 15 El compuesto 1a se disolvió hasta una concentración final de 450 nmol/l en un tampón estándar, que consiste en: pH=7.4; fosfato de sodio dibásico 8.05 mM; dihidrogenofosfato de potasio 1.96 mM; cloruro de sodio 140 mM; polisorbato 20 al 0.007 %.

Al inicio del experimento, todos los animales recibieron una dosis única de 180 nmol/kg del compuesto 1a, ya sea como una inyección i.v. en bolo de dosis única en la vena de la cola (grupo de tratamiento i.v.) o una única inyección s.c. en el cuello (grupo de tratamiento s.c.).

- 20 Se extrajeron muestras de sangre de todos los animales a partir de la vena de la cola. Se extrajeron 0.1 ml de sangre de acuerdo con el siguiente calendario:

Grupo de tratamiento i.v.: Antes de la dosis, 0.08, 0.5, 1, 2, 4, 8, 18, 24, 30, 48, 72, 96, 168 y 240 horas después de la administración de la dosis.

- 25 Grupo de tratamiento s.c.: Antes de la dosis, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 18, 24, 30, 48, 72, 96, 168 y 240 horas después de la administración de la dosis.

La toma de las muestras de sangre se realizó como un calendario de muestreo disperso, donde ambos grupos de tratamiento se subdividieron en 4 grupos de 3 ratas, lo que garantizó que la sangre se extrajo de 3 animales en cada punto temporal por grupo de tratamiento y que cada animal se desangró 3-4 veces durante todo el estudio.

- 30 En cada punto temporal de muestreo se recolectaron 0.1 ml (8-10 gotitas) de sangre de la vena de la cola y se transfirieron a tubos Eppendorf que contenían EDTA 8 mM. Después de mezclar suavemente, la muestra de sangre se mantuvo en hielo, durante no más de 10 minutos, hasta su

centrifugación a 4000 g durante 5 minutos a +5 °C. Después de la centrifugación, la fracción plasmática se dividió en dos fracciones y se analizó para determinar la concentración del compuesto de prueba y la concentración del IGF-1, como se describe más abajo.

Análisis plasmático del IGF-1 en el plasma de ratas:

- 5 Las muestras se analizaron para determinar el contenido del IGF-1 en ratas mediante el uso de un inmunoensayo luminiscente de canalización de oxígeno (LOCI) homogéneo, desarrollado internamente. Antes de realizar el análisis, las muestras se trataron previamente para liberar el IGF-1 de sus proteínas de unión en el plasma. Durante el ensayo, se creó un inmunocomplejo microesfera-analito dependiente de la concentración, que dio lugar a una salida de luz que se midió en un lector
- 10 Perkin Elmer Envision. En el ensayo, se usaron las microesferas aceptoras conjugadas con el mAb 1212-0362 (anti-IGF-1 de rata) y el mAb 1212-0307 biotinilado (también inducido contra el IGF-1 de rata) junto con las microesferas donantes genéricas recubiertas con estreptavidina. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) es de 20 ng/ml.

Análisis plasmático del compuesto 1a en el plasma de ratas:

- 15 Las muestras se analizaron para determinar el contenido del compuesto 1a mediante el uso de un inmunoensayo luminiscente de canalización de oxígeno (LOCI) homogéneo, desarrollado internamente. Durante el ensayo, se creó un inmunocomplejo microesfera-analito dependiente de la concentración, que dio lugar a una salida de luz que se midió en un lector Perkin Elmer Envision. En el ensayo, se usaron las microesferas aceptoras conjugadas con la proteína de unión a la hormona
- 20 del crecimiento y el pAb 20GS10 biotinilado (inducido contra la hormona del crecimiento humana), junto con las microesferas donantes genéricas recubiertas con estreptavidina. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) es de 50 pM.

Los datos de los análisis se muestran en la Tabla 5.

Tiempo (h)	Concentración media (nM)	
	i.v.	s.c.
0.08	3,207	-
0.25	-	31.0
0.5	2,693	63.5
1	2,540	181
2	1,997	237
4	1,750	384
7	1,347	552
18	739	545
24	488	437

30	501	440
48	70.9	74.4
72	22.6	27.3
96	4.77	6.93
168	0.260	0.205

Tabla 5: Concentraciones, en un momento dado, del compuesto 1a después de la administración i.v. y s.c.

Los perfiles de concentración plasmática frente al tiempo del compuesto 1a después de la administración i.v. y s.c. se muestran en la Figura 1 y muestran que la absorción s.c. terminó 24-48 horas después de la administración de la dosis y que el compuesto 1a no mostró eliminación limitada por la absorción.

Los datos de concentración plasmática frente al tiempo se analizaron mediante farmacocinética no compartimental mediante el uso de Phoenix WinNonlin 6.4 (Pharsight Corporation). Los cálculos se realizaron mediante el uso de los valores de concentración media frente al tiempo de tres animales en cada punto temporal. Las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos se muestran en la Tabla 6, más abajo:

Parámetro	Unidad	Grupo de tratamiento	
		i.v.	s.c.
C_0	(nmol/l)	3,320	-
$t_{\text{máx}}$	(h)	-	7
$C_{\text{máx}}$	(nmol/l)	3,210	552
$AUC_{\text{último}}$	(h*nmol/l)	38,400	20,500
AUC	(h*nmol/l)	38,400	20,500
Aclaramiento	(l/h/kg)	0.00469	-
V_z	(l/kg)	0.101	-
$t_{1/2}$	(h)	14.9	16.4
MRT	(h)	15.4	24.2
F	-	-	0.53

Tabla 6: Parámetros farmacocinéticos del compuesto 1a después de la administración i.v. o s.c.

La Tabla 6 muestra los parámetros farmacocinéticos claves para el compuesto 1a. C_0 es la concentración del compuesto 1a inmediatamente después de la inyección i.v. La $t_{\text{máx}}$ es la concentración plasmática máxima del compuesto 1a después de la administración s.c. y se estima en 7 h. La $C_{\text{máx}}$ es la concentración máxima del compuesto 1a en la sangre y se estima en 3,210 y 552 nmol/l después de la administración i.v. y s.c., respectivamente. $AUC_{\text{último}}$ y AUC son el área bajo la curva en el último punto de datos y estimada en el infinito, respectivamente, y es una medida de

la exposición total al fármaco a lo largo del tiempo. Mediante el uso de los valores de AUC de s.c. e i.v., puede calcularse la biodisponibilidad absoluta (F). El aclaramiento se calcula a partir de la dosis/AUC. V_z es el volumen de distribución, y $t_{1/2}$ es la semivida terminal del compuesto 1a después de que ha terminado la fase de absorción. MRT es el tiempo medio de residencia del compuesto 1a, que corresponde al tiempo promedio en que el compuesto 1a está en el cuerpo y, por tanto, la administración s.c. da lugar a una acción prolongada.

Ejemplo 7: Datos de PK en perros – compuesto 1a

El propósito del ejemplo fue investigar las propiedades farmacocinéticas del compuesto 1a y medir las concentraciones de IGF-1 en perros Beagle después de la administración i.v. a dosis única de dos dosis, 10 mg/kg y 3 mg/kg.

Nueve perros Beagle, machos, peso promedio ~ 11.5 kg, se dividieron en 3 grupos como sigue: vehículo, compuesto 1a a 3 mg/kg y compuesto 1a a 10 mg/kg, $n=3$ por grupo. El volumen de dosis fue 0.3 ml/kg para cada perro a una concentración dada de solución inyectable. Todos los animales se sometieron a ayuno durante ~20 h antes del experimento. Después de la inyección en bolo i.v., se recolectaron muestras de sangre en serie hasta 504 h después de la administración para la cuantificación del compuesto 1a y el IGF-1 circulante. Los puntos temporales detallados del muestreo de sangre fueron: -5 min (antes de la dosis), 5, 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 4, 7, 10 h, 24, 30, 48, 72, 120, 168, 216, 264, 312, 360, 432, 504 h.

Para cada punto temporal único, se recolectaron 1.2 ml de sangre en tubos recubiertos con EDTA, seguido de 3-4 veces de inversión suave. Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo hasta la centrifugación (4 min, 4 °C, 4000 rpm).

Se transfirieron inmediatamente cien μ l $\times 2$ de plasma a tubos Micronic marcados y se mantuvieron a -20 °C hasta el ensayo. Se almacenará otro conjunto de muestras de respaldo de 200 μ l para la posible repetición de la prueba (-20 °C o -80 °C).

Análisis plasmático del IGF-1 en el plasma de perros:

La concentración del IGF-1 en muestras de plasma de perros se determinó mediante el uso de un kit comercial de ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) (Mediagnost, producto núm.: E20). Los calibradores y los controles se prepararon reconstituyendo “CAL” y “Control” en 500 μ l de tampón de muestra (SB). El intervalo dinámico del ensayo estuvo entre 2 a 50 ng/ml. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) del ensayo fue 0.091 ng/ml. Los controles se diluyeron 1:20 en el tampón de muestra PP (SB BUF). La muestra de plasma de perro se diluyó 1:15 en SB. Los procedimientos de dilución se realizaron en el sistema automatizado de manipulación de líquidos

- Apricot. Se transfirieron ochenta μ l de conjugado de anticuerpo “Ab” a las placas de ensayo de 96 pocillos. Se aplicaron veinte μ l de muestra diluida/calibrador/control a las placas de ensayo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con agitación a 350 rpm. Las placas de ensayo se lavaron 5 veces con tampón de lavado (WP). Se aplicaron cien μ l de conjugado enzimático (CONJ) a las placas de ensayo y se incubaron durante 1 hora a TA con agitación a 350 rpm. Las placas de ensayo se lavaron 5 veces con WP. Se aplicaron cien μ l de solución de sustrato (SUBST) a las placas de ensayo y se incubaron en la oscuridad durante 15 minutos a TA. Se añadieron 100 μ l de solución de parada (SL) a las placas de ensayo. Las placas se leyeron en un lector de placas Tecan a 450 nm. Las curvas del calibrador se generaron mediante el ajuste de señales y concentraciones a un modelo logístico de 5 parámetros con ponderación de estándares como $1/\text{señal}^2$. Las concentraciones de los controles y el IGF-1 se calcularon con la curva del calibrador y se corrigieron para la dilución. Las recuperaciones de los controles están dentro de 80 %-120 %. Las recuperaciones de dilución de las muestras están dentro de 80 %-120 %. El coeficiente de variaciones (CV) entre las réplicas está dentro de ± 10 %.
- Los datos de los análisis se muestran en la Tabla 7.

Tiempo (h)	Concentración de IGF-1 (ng/ml)	
	3 mg/kg	10 mg/kg
Antes de la dosis	137 $\pm$ 24.5	110 $\pm$ 40.9
0.08	136 $\pm$ 21.2	111 $\pm$ 36.7
0.25	137 $\pm$ 19.9	110 $\pm$ 40.8
0.5	131 $\pm$ 18.0	105 $\pm$ 41.3
0.75	130 $\pm$ 16.2	106 $\pm$ 38.8
1	132 $\pm$ 18.9	108 $\pm$ 40.2
1.5	132 $\pm$ 18.2	107 $\pm$ 39.1
2	133 $\pm$ 18.3	110 $\pm$ 43.2
4	131 $\pm$ 16.2	111 $\pm$ 42.0
7	140 $\pm$ 14.6	110 $\pm$ 37.9
10	138 $\pm$ 15.7	112 $\pm$ 41.5
24	113 $\pm$ 11.0	91.8 $\pm$ 35.9
30	104 $\pm$ 11.5	86.0 $\pm$ 35.7
48	86.5 $\pm$ 10.0	70.5 $\pm$ 28.1
72	72.9 $\pm$ 11.0	54.2 $\pm$ 22.8
120	54.2 $\pm$ 13.6	36.4 $\pm$ 14.5
168	50.8 $\pm$ 21.5	30.0 $\pm$ 13.6
216	49.2 $\pm$ 23.1	26.5 $\pm$ 8.76
264	51.5 $\pm$ 21.4	25.9 $\pm$ 10.6
312	63.1 $\pm$ 27.1	27.8 $\pm$ 16.6

360	100 ± 17.6	26.7 ± 16.3
432	133 ± 23.1	53.9 ± 41.0
504	134 ± 27.4	79.2 ± 45.4

Tabla 7: Concentraciones (media $\pm$ SD) en un momento dado de IGF-1 después de la administración i.v. de 3 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente.

Análisis plasmático del compuesto 1a en el plasma de perros:

La concentración del compuesto 1a en muestras de plasma de perros se determinó mediante el uso del inmunoensayo luminiscente de canalización de oxígeno (LOCI). Los calibradores y los controles se prepararon al añadir manualmente el analito en el plasma de perros. El intervalo dinámico del ensayo estuvo entre 4.9 a 20,000 pM. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) del ensayo fue 4 pM. Los tres controles fueron 3,000, 100 y 4 pM, respectivamente. Las diluciones de las muestras en plasma de perros se realizaron en el sistema automatizado de manipulación de líquidos Bravo. Se aplican 2 μ l de muestra diluida/calibrador/control junto con 3 μ l de tampón de muestra en placas LOCI de 384 pocillos, incubación con microesferas aceptoras conjugadas con AcM (NNC1212-0000-0575) y proteína de unión a la hormona del crecimiento biotinilada a 22 °C durante toda la noche. Se añadieron a cada pocillo treinta μ l de microesferas donantes recubiertas con estreptavidina (67 μ g/pocillo) y se incubaron durante 30 minutos a 20 °C. Las placas se leyeron en un lector de placas Ensignht a 21-22 °C con un filtro que tiene un ancho de banda de 520-645 nm después de la excitación mediante un láser de 680 nm. El tiempo de medición total por pocillo fue de 210 ms que incluye un tiempo de excitación de 70 ms. La curva del calibrador se generó mediante el ajuste de señales y concentraciones a un modelo logístico de 5 parámetros con ponderación de estándares como $1/\text{señal}^2$. Las concentraciones de los controles y del compuesto 1a se calcularon con la curva del calibrador y se corrigieron para la dilución. Las recuperaciones de los controles estuvieron dentro de 80 %-120 %. Las recuperaciones de dilución de las muestras estuvieron dentro de 80 %-120 %. El coeficiente de variaciones (cv) entre las réplicas estuvo dentro de ± 10 %.

Los datos de los análisis se muestran en la Tabla 8.

Tiempo (h)	Concentración del compuesto 1a (nM)	
	3 mg/kg	10 mg/kg
0.08	$2,467 \pm 90.7$	$8,600 \pm 311$
0.25	$2,460 \pm 151$	$8,443 \pm 121$
0.5	$2,260 \pm 123$	$7,530 \pm 212$
0.75	$2,213 \pm 170$	$7,633 \pm 211$
1	$2,160 \pm 85.4$	$7,500 \pm 159$
1.5	$2,137 \pm 37.9$	$7,093 \pm 415$

2	2,150 ± 26.5	7,203 ± 307
4	2,100 ± 43.6	7,423 ± 188
7	1,953 ± 140	6,633 ± 315
10	1,773 ± 64.3	6,347 ± 401
24	1,253 ± 70.9	4,667 ± 809
30	1,163 ± 41.6	4,023 ± 192
48	922 ± 37.5	3,347 ± 405
72	779 ± 85.4	2,600 ± 72.1
120	515 ± 44.6	1,867 ± 289
168	366 ± 93.1	1,343 ± 101
216	233 ± 62.9	930 ± 52.5
264	132 ± 51.0	614 ± 69.7
312	25.8 ± 28.8	415 ± 43.4
360	0.473 ± 0.358	255 ± 32.2
432	-	74.3 ± 63.8
504	-	4.61 ± 7.53

Tabla 8: Concentraciones (media ± SD) en un momento dado del compuesto 1a después de la administración i.v. de 3 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente.

Los datos de concentración plasmática frente al tiempo se analizaron mediante farmacocinética no compartimental mediante el uso de Phoenix WinNonlin 6.4 (Pharsight Corporation). Los cálculos se realizaron mediante el uso de los valores de concentración media frente al tiempo de tres animales en cada punto temporal. Las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos se muestran en la Tabla 9, más abajo:

Parámetro	Unidad	Grupo de administración	
		3 mg/kg	10 mg/kg
C ₀	(nmol/l)	2,467 ± 90.7	8,593 ± 220
AUC _{último}	(h*nmol/l)	165,034 ± 15,870	573,414 ± 54,772
AUC	(h*nmol/l)	171,276 ± 20,283	582,613 ± 53,120
Aclaramiento	(l/h/kg)	0.00075 ± 0.000084	0.00074 ± 0.000066
V _z	(l/kg)	0.07636 ± 0.00715	0.08486 ± 0.00658
t _½	(h)	70.1 ± 13.7	79.3 ± 4.25
MRT	(h)	98.4 ± 18.6	106 ± 6.28

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos del compuesto 1a después de la administración i.v. de 3 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente.

- La Tabla 9 muestra los parámetros farmacocinéticos claves para el compuesto 1a. C₀ es la concentración del compuesto 1a inmediatamente después de la inyección i.v. AUC_{último} y AUC son el área bajo la curva en el último punto de datos y estimada en el infinito, respectivamente, y es una medida de la exposición total al fármaco a lo largo del tiempo. El aclaramiento se calcula a partir

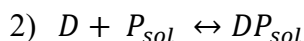
de la dosis/AUC. V_z es el volumen de distribución, y $t_{1/2}$ es la semivida terminal del compuesto 1a. MRT es el tiempo medio de residencia del compuesto 1a que corresponde al tiempo promedio que el compuesto 1a está en el cuerpo.

Ejemplo 8: Unión in vitro del compuesto 1a a proteínas en plasma de ratones, ratas, conejos, perros y seres humanos

El objetivo fue usar la tecnología del ensayo del desplazamiento en equilibrio para investigar la unión entre el compuesto 1a y las proteínas plasmáticas en solución libre. Se realizó un análisis cinético para determinar el porcentaje de fracción no unida de compuesto 1a en plasma.

La albúmina sérica humana libre de ácido graso (HSA) se inmovilizó en las microesferas Mini-Leak de acuerdo con el procedimiento descrito por Kurtzhals y otros (1, 2). En resumen, el medio de almacenamiento se retiró de las microesferas de sefarosa mediante succión en un filtro. Posteriormente, las microesferas se lavaron con tres volúmenes de cloruro de sodio isotónico. A un gramo de microesferas de Sefarosa, se añadieron 2 ml de HSA al 5 % (p/v) en agua Milli-Q y 2 ml de PEG20000 al 30 % (p/v) en HCO_3^- 0.3 M. La solución se mezcló en un agitador Hula durante toda la noche. Subsecuentemente, el medio de ensayo se retiró mediante succión en un filtro y las microesferas se lavaron con 20 ml de cloruro de sodio isotónico. Las microesferas se trataron a continuación con etanolamina 0.2 M durante cinco horas. Posteriormente, las microesferas se lavaron con 12 ml de tampón fosfato (pH 11, tres veces) y 12 ml de tampón glicina (pH 3, tres veces). Las microesferas se almacenaron en tampón PBS (pH 7.2) a una concentración de 200 mg de microesferas por ml. La concentración de HSA inmovilizada se determinó de acuerdo con el procedimiento informado por Kurtzhals y otros (1).

Si un fármaco (D) se incubaba con una proteína inmovilizada (P_{inm}) y una proteína soluble (P_{sol}), pueden producirse dos reacciones de unión:



Cuando la concentración de fármaco es mucho menor que la concentración de proteína, se espera que a la proteína se una solo una molécula de fármaco. En equilibrio, las constantes de asociación para las dos reacciones de unión son:

$$1) K_{a,\text{inm}} = \frac{[DP]_{\text{inm}}}{[D][P]_{\text{inm}}}$$

$$2) K_{a,\text{sol}} = \frac{[DP]_{\text{sol}}}{[D][P]_{\text{sol}}}$$

$K_{a,\text{sol}}$ puede reorganizarse y colocarse en la ecuación para $K_{a,\text{sol}}$, que da las siguientes ecuaciones

$$K_{a,sol} = \frac{[DP]_{sol}}{[D][P]_{sol}} \rightarrow [D] = \frac{[DP]_{sol}}{K_{a,sol} [P]_{sol}}$$

$$K_{a,inm} = \frac{[DP]_{inm}}{[D][P]_{inm}} = \frac{[DP]_{inm}}{\frac{[DP]_{sol}}{K_{a,sol} [P]_{sol}} [P]_{inm}}$$

$$\Downarrow$$

$$\frac{[DP]_{sol}}{[DP]_{inm}} = \frac{K_{a,sol} [P]_{sol}}{K_{a,inm} [P]_{inm}}$$

- 5 La concentración de HSA inmovilizada puede estimarse representando gráficamente DP_{sol}/DP_{inm} frente a la concentración de HSA soluble. Suponiendo que $K_{a,sol} = K_{a,inm}$, la pendiente del gráfico lineal es $1/[HSA_{inm}]$.

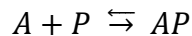
La concentración de HSA inmovilizada puede determinarse incubando una cantidad establecida de microesferas con diversas concentraciones de HSA soluble. En la presente descripción, se incubaron
10 15.5 mg de microesferas con cinco concentraciones diferentes de HSA soluble (la concentración final de HSA es: 2.5, 5, 10, 20 y 40 μM) y 250 nM de un compuesto de referencia en tampón de PBS (pH 7.2) durante dos horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 750 g durante 10 min. A continuación, las muestras se precipitaron y subsecuentemente se analizaron mediante LC-MS.

- 15 La correlación lineal entre la fracción no unida y unida (f_u/f_b) y la concentración de HSA soluble puede representarse gráficamente, y se usa la pendiente para calcular la concentración de HSA inmovilizada por mg de microesferas Mini-Leak como sigue.

$$HSA_{inm} = \frac{n_{HSA_{inm}}}{m_{microesferas}} = \frac{[HSA_{inm}] \times V_{incubación}}{m_{microesferas}} = \frac{1}{pendiente} \times V_{incubación} = \frac{1}{pendiente} \times 0.0005 l = \frac{nmol}{15.5 mg} = \frac{nmol}{mg \text{ microesferas}}$$

- Se usó el promedio de 12 experimentos, lo que dio como resultado una concentración de 0.51 nmol
20 de HSA inmovilizada por mg de microesferas. Este valor se usó para el cálculo de $K_{d,HSA_{inm}}$ y la fracción no unida en plasma.

La unión entre un fármaco (A) y una proteína (P) puede describirse como:



- Debido a la ley de conservación de la masa, la unión entre un fármaco (A) y una proteína (P) puede
25 describirse con la constante de disociación definida:

$$K_d = \frac{[A][P]}{[AP]}$$

En equilibrio, la concentración de fármaco (A) y fármaco-proteína (AP) puede describirse como:

$$[A] = c_0 * f_u = ([A] + [AP]) * f_u$$

y

$$[AP] = c_0 * f_b = ([A] + [AP]) * f_b$$

Por lo tanto, la fórmula para la constante de disociación puede reorganizarse:

$$K_d = \frac{[A][P]}{[AP]} = \frac{([A] + [AP]) * f_u * [P]}{([A] + [AP]) * f_b}$$

↓

$$\frac{([A] + [AP]) * f_u}{([A] + [AP]) * f_b} = \frac{1}{[P]} * K_d$$

↓

$$\frac{f_b}{f_u} = \frac{1}{K_d} * [P]$$

- 10 Mediante esta fórmula, la afinidad por la HSA inmovilizada puede calcularse representando gráficamente la relación entre el compuesto unido y no unido (f_b/f_u) contra la concentración de albúmina inmovilizada.

Experimentalmente, esto se llevó a cabo al incubar una concentración final de 250 nM del compuesto la seis concentraciones diferentes de HSA inmovilizada en tampón de PBS (pH 7.2) y dos incubaciones de referencia sin HSA inmovilizada. Además, se usó una concentración final de 0.01 % de P188 para evitar la adsorción a los recipientes. Las muestras se incubaron durante dos horas a 37 °C mediante agitación mecánica en un robot KingFisher (Thermo Fisher Scientific) mediante el uso de placas y peines de puntas KingFisher de pocillos profundos recubiertos con OVA al 1 %. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 750 g para sedimentar las microesferas. Antes de la preparación de la muestra, se diluyó un volumen de sobrenadante con un volumen de blanco de plasma. Las mezclas se analizaron mediante LC-MS para el compuesto 1a.

La fracción no unida y unida se calculó mediante el uso de las siguientes ecuaciones:

$$f_b = \frac{[0559 - 0000 - 1657]_{ref(media)} - [0559 - 0000 - 1657]_{microesferas}}{[0559 - 0000 - 1657]_{ref(media)}}$$

$$f_u = 1 - f_b$$

- 25 El promedio de la concentración en las dos incubaciones de referencia se usó para el cálculo de f_b . Al representar gráficamente f_b/f_u contra la concentración de HSA inmovilizada se obtiene una línea recta, donde la pendiente (α) puede convertirse en la constante de disociación mediante esta fórmula:

$$\alpha = \frac{1}{K_{d,HSAinm}} \rightarrow K_{d,HSAinm} = \frac{1}{\alpha}$$

La determinación individual de $K_{d,HSAinm}$ se basa en ocho puntos de datos. En cada cálculo, uno de los puntos de datos de referencia y otro punto de datos podría excluirse del cálculo.

La fracción libre puede describirse como:

$$f_u = \frac{1}{1 + \sum \frac{P_i}{K_d^i}}$$

Mediante esta fórmula, la fracción libre cuando se incubaba con plasma y HSA inmovilizada puede expresarse como:

$$f_u = \frac{1}{1 + \frac{[HSA]}{K_{d,HSAinm}} + \frac{[P]}{K_{d,plasma}}}$$

La concentración libre (A) es:

$$A = c_0 * f_u$$

La concentración unida total (por ejemplo, unida a microesferas (AB) y unida a plasma (AP)) se define como

$$AB + AP = c_0 * f_b$$

Después de retirar las microesferas, la concentración en el sobrenadante (APA) es la concentración unida a proteínas plasmáticas (AP) y concentración libre (A):

$$APA = AP + A$$

La concentración de AP puede definirse como:

$$AP = \vartheta * c_0 * f_b$$

Donde ϑ es la relación entre el compuesto unido a proteínas plasmáticas ([AP]) y la cantidad total unida a proteínas plasmáticas y HSA inmovilizada ([AB]). Esta relación puede expresarse como sigue:

$$\vartheta = \frac{[AP]}{[AP] + [AB]} = \frac{\frac{[A][P]}{K_{d,plasma}}}{\frac{[A][P]}{K_{d,plasma}} + \frac{[A][HSA]}{K_{d,HSAinm}}} = \frac{\frac{[P]}{K_{d,plasma}}}{\frac{[P]}{K_{d,plasma}} + \frac{[HSA]}{K_{d,HSAinm}}}$$

La concentración en el sobrenadante (APA) puede reorganizarse.

$$\begin{aligned}
 APA &= \vartheta * c_0 * f_b + c_0 * f_u \\
 &= \left(\frac{\frac{[P]}{K_{d,plasma}}}{\frac{[P]}{K_{d,plasma}} + \frac{[HSA]}{K_{d,HSAinm}}} \right) * c_0 * \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{[HSA]}{K_{d,HSAinm}} + \frac{[P]}{K_{d,plasma}}} \right) + c_0 \\
 &\quad * \left(\frac{1}{1 + \frac{[HSA]}{K_{d,HSAinm}} + \frac{[P]}{K_{d,plasma}}} \right)
 \end{aligned}$$

La ecuación anterior puede entonces reorganizarse:

$$APA = \frac{c_0 * K_{d,HSAinm} * (\alpha * P + K_{d,plasma})}{[HSA_{inm}] * K_{d,plasma} + K_{d,HSAinm} * (\alpha * P + K_{d,plasma})}$$

Donde:

APA: Concentración del compuesto en el sobrenadante (libre y unido a proteínas plasmáticas).

c_0 : Concentración inicial del compuesto de prueba.

P: Concentración de proteína (fijada arbitrariamente a 600 μ M).

10 $K_{d,HSAinm}$: Constante de disociación de HSA inmovilizada en las microesferas Mini-Leak.

$K_{d,plasma}$: Constante de disociación de proteínas en plasma.

α : factor de dilución plasmática.

[HSA]: Concentración de HSA inmovilizada en las microesferas Mini-Leak.

La constante de pseudodisociación hacia las proteínas plasmáticas puede estimarse mediante el uso
 15 de un valor, que da la suma más baja de residuales cuadrados entre los valores de APA medidos y los valores de APA calculados teóricamente.

Mediante el uso de la concentración arbitraria de 600 μ M como la concentración de proteína plasmática, la fracción no unida en plasma puede calcularse mediante el uso de esta fórmula:

$$f_u = \frac{1}{1 + \frac{[P]}{K_{d,plasma}}} = \frac{1}{1 + \frac{600 \mu M}{K_{d,plasma}}}$$

20 Experimentalmente, se incubó una concentración final de 250 nM de compuesto 1a en tampón de PBS con diversas concentraciones de HSA inmovilizada, P188 al 0.01 % y tres concentraciones diferentes de plasma (la dilución final de plasma de cada especie se enumera en la Tabla 10).

Núm. de dilución	1	2	3
Ratón	1:5	1:15	1:45
Rata	1:5	1:15	1:45

Núm. de dilución	1	2	3
Conejo	1:5	1:15	1:45
Perro	1:5	1:15	1:45
Humano	1:10	1:30	1:90

Tabla 10. Las diluciones finales de plasma en las incubaciones de cada especie.

Se prepararon dos soluciones de referencia en cada dilución de plasma. Las muestras se incubaron durante dos horas a 37 °C mediante agitación mecánica en un robot KingFisher (Thermo Fisher Scientific) mediante el uso de placas y peines de puntas KingFisher de pocillos profundos recubiertos con OVA al 1 %. Después de la incubación, las muestras se centrifugan durante 10 min a 750 g para retirar las microesferas. Antes de la cuantificación de la muestra, un volumen de sobrenadante se diluye con un volumen de plasma de cerdos LYD para ajustar la matriz. Las mezclas se analizan para determinar el compuesto 1a.

El cálculo de la constante de pseudodisociación a proteínas plasmáticas se basa en 15 puntos de datos (cinco puntos de datos con cada dilución de plasma y tres diluciones del plasma). Para cada dilución de plasma individual, uno de los puntos de datos de referencia y otro punto de datos podrían excluirse del cálculo.

Análisis de muestras por LOCI

Todas las muestras se analizaron para determinar el compuesto 1a mediante el uso de un inmunoensayo luminiscente de canalización de oxígeno (LOCI) también llamado AlphaLISA, que es una tecnología homogénea de inmunoensayo sándwich a base de microesferas. La señal medida depende de la proximidad de dos tipos de microesferas. Las microesferas donantes se recubren con estreptavidina, mientras que las microesferas aceptoras en este caso se conjugaron con la proteína de unión a la hormona del crecimiento soluble que reconoce la parte de unión al receptor de la hGH de la molécula. La segunda pareja de unión en el sándwich es un anticuerpo monoclonal biotinilado (0195-0000-0127) que reconoce otro epítipo del análogo de la hormona del crecimiento. Durante el ensayo, los tres reactantes se combinaron con analito en el plasma para formar un inmunocomplejo agregado a microesferas. La iluminación del complejo con un láser libera oxígeno singlete de las microesferas donantes que se canalizan hacia las microesferas aceptoras y desencadenan la quimioluminiscencia que se mide. La cantidad de luz generada es proporcional a la concentración del análogo de la hGH. Las curvas estándar se realizaron en plasma de cerdos LYD/PBS al 50 %/50 % con un límite inferior de cuantificación resultante de 50 pM para el análogo del compuesto 1a.

Se llevaron a cabo los experimentos para determinar la afinidad de unión del compuesto 1a hacia la HSA inmovilizada ($K_{d,HSA_{inm}}$) y se analizaron en paralelo con cada experimento de unión a proteínas plasmáticas. Los resultados de 13 experimentos individuales que superaron los criterios se muestran en la Tabla 11 y se usaron para calcular la $K_{d,HSA_{inm}}$ -promedio. El valor promedio de $K_{d,HSA_{inm}}$ se calculó que era 1.69×10^{-6} M, que se usó en los cálculos de todos los experimentos de unión a proteínas plasmáticas posteriores.

Número de experimento	$K_{d,HSA_{inm}}$ (M)	R^2	Puntos de datos excluidos
1	1.83E-06	0.9930	0/6
2	2.03E-06	0.9758	0/6
3	1.44E-06	0.9967	0/6
4	2.06E-06	0.9806	1/6
5	1.54E-06	0.9837	0/6
6	1.38E-06	0.9921	1/6
7	1.31E-06	0.9864	0/6
8	1.55E-06	0.9828	0/6
9	1.68E-06	0.9916	1/6
10	1.38E-06	0.9799	1/6
11	1.76E-06	0.9907	0/6
12	2.16E-06	0.9920	0/6
13	1.82E-06	0.9874	0/6
Media	1.69E-06	-	-
SD	2.82E-07	-	-
%CV	16.7	-	-

Tabla 11. Valores calculados individualmente de $K_{d,HSA_{inm}}$ (M) del compuesto 1a hacia la HSA inmovilizada. El valor medio se usa para calcular la fracción no unida en plasma.

La determinación de la fracción no unida (fu) en los experimentos de unión a proteínas plasmáticas en plasma de ratones, ratas, conejos, perros y seres humanos se enumera con valores individuales y promedio en la Tabla 12. La fracción no unida promedio (como un porcentaje), fu, del compuesto 1a fue 1.42 % en plasma de ratón, 0.62 % en plasma de rata, 0.41 % en plasma de conejo, 0.22 % en plasma de perro y 0.08 % en plasma humano.

Núm. de experimento	Ratones (C57BL/6)	Rata (Sprague-Dawley)	Conejos (Nueva Zelanda Blanco)	Perros (Beagle)	Humano
#1	0.97 %	0.56 %	0.31 %	0.17 %	0.083 %
#2	1.46 %	0.52 %	0.41 %	0.24 %	0.079 %
#3	1.82 %	0.78 %	0.51 %	0.25 %	0.079 %
Media	1.42 %	0.62 %	0.41 %	0.22 %	0.08 %
SD	0.003470	0.001132	0.000800	0.000317	0.000015
%CV	24.49 %	18.22 %	19.48 %	14.46 %	1.92 %

Tabla 12. Fracciones individuales y promedio no unidas (fu (%)) del compuesto 1a en plasma de ratones, ratas, conejos, perros y seres humanos.

Conclusión

La unión a proteínas plasmáticas in vitro del compuesto 1a se determinó en plasma de ratones, ratas, conejos, perros y seres humanos. Las fracciones del compuesto 1a no unido en plasma estuvieron en el intervalo de 0.08 a 1.42 %, con la fracción no unida más baja en plasma en el siguiente orden: Seres humanos < perros < conejos < ratas < ratones.

Referencias

1. Kurtzhals, P., Havelund, S., Jonassen, I., Kiehr, B., Larsen, U. D., Ribel, U., y Markussen, J. (1995) Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo. *Biochem. J.* 312 (3), 725-731.
2. Kurtzhals, P., Havelund, S., Jonassen, I., Kiehr, B., Ribel, U., y Markussen, J. (1996) Albumin binding and time action of acylated insulins in various species. *J. Pharm. Sci.* 85(3), 304-308.

Ejemplo 9: Internalización in vitro mediada por el receptor de la hormona del crecimiento (GHR) del compuesto 1a, la hormona del crecimiento humana (hGH) recombinante y el pegvisomant. El objetivo fue investigar la internalización del compuesto 1a, hGH y pegvisomant mediante el uso de fibroblastos de riñón de hámster recién nacido que expresan la GHR humana (BHK21).

- 20 Se realizó un estudio cuantitativo in vitro de la internalización del compuesto 1a, la hGH y el antagonista del GHR pegvisomant mediante el uso de fibroblastos de riñón de hámster recién nacido que expresan la GHR humana (BHK21). El compuesto 1a, la hGH y el pegvisomant se conjugaron

con el colorante Alexa Fluor 647 para seguir la internalización. El marcaje se realizó en tampón Hepes 50 mM, pH 7.5 mediante el uso de Alexa Fluor 647 NHS de Life Technologies. El marcaje se realizó aleatoriamente en las aminas de épsilon – lisina disponibles. A continuación, los compuestos monomarcados se aislaron mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico, y el

5 tampón se intercambiaba en PBS mediante el uso de columnas de desalación y centrifugación Zeba (núm. de cat.: 89893 de Thermo Scientific, valor de corte de 7 kDa). El grado de marcaje se determinó mediante LCMS (hGH, compuesto 1a) o fluorométrico (pegvisomant). El grado de marcaje fue 1.0, 1.0 y 0.7 para la hGH, el compuesto 1a y el pegvisomant, respectivamente.

Línea celular y condiciones de cultivo

- 10 Para el ensayo de internalización se utilizaron células de riñón de hámster recién nacido (BHK21) que sobreexpresan el receptor de la hormona del crecimiento humana (BHK21/hGHR), empleadas previamente en actividades de tamizaje de compuestos funcionales internas. La sobreexpresión del hGHR es esencial para lograr niveles más altos de internalización. Las células BHK21/hGH se generaron mediante el uso de un plásmido pcDNA3,1+(neo) que contiene la secuencia de hGHR.
- 15 Adicionalmente, se transfectó un plásmido que codifica Stat3-Luciferasa (resistencia a la puromicina) a las células para propósitos de tamizaje funcional que no es relevante para el ensayo descrito aquí. Las células transfectadas se seleccionaron mediante el uso de 600 µg/ml de G418 (Gibco #10131-027) y 1 µg/ml de puromicina (Gibco #11138-03) para generar una mezcla estable que se usó posteriormente para la selección de la línea celular monoclonal.
- 20 Para el mantenimiento, las células se cultivaron en DMEM suplementado con Glutamax (Gibco #31966-021), FBS al 10 % (Thermo Fisher #10091148) y penicilina-estreptomycin al 1 % (Gibco #15140-122), 600 µg/ml de G418 y 1 µg/ml de puromicina en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂. Para el ensayo, las células se sembraron en medio de cultivo con una reducción del contenido de FBS de 1 % y sin marcadores de selección G418 y puromicina.
- 25 **Internalización**
- Se sembraron 20,000 células en medio de ensayo en PhenoPlatTM de 96 pocillos (Revidad #6055302). Para los experimentos de curso temporal, se preparó una placa para cada punto temporal: 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 1,440 min. Las células se incubaron durante toda la noche a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, las células se trataron con los compuestos y se observó la
- 30 internalización mediante el uso del sistema de análisis de alto contenido (Revvity) Operetta CLS. Los compuestos se titularon en medio de siembra de células suplementado con BSA al 1 % (Miltenyi Biotech #130-091-476) en lugar de FBS al 1 %. Las titulaciones estaban en el intervalo de 10-0.0045

nM. Las placas con células se incubaron de acuerdo con los puntos temporales indicados, se lavaron una vez brevemente con PFA al 4 % en PBS (Ampliqon #AMPQ43226) y después se fijaron con PFA al 4 % en PBS durante 20 min. Las células se lavaron tres veces con PBS y se almacenaron a 4 °C hasta la tinción. Para la tinción de los núcleos, se aplicó Hoechst 33342 1:10,000 (Invitrogen #H3570) en PBS. Después de 15 min de tratamiento, las células se lavaron con PBS (Gibco #14040-091). Las células se capturaron mediante obtención de imágenes confocales.

Obtención de imágenes confocales

La internalización se evaluó mediante el uso del software Harmony de Operetta. Las células se capturaron con un objetivo en agua 40x y canales Hoechst 33342 y Alexa Fluor 647. Se obtuvieron y se analizaron imágenes de nueve campos por pocillo. La secuencia de análisis fue como sigue: Encuentre núcleos mediante Hoechst 33342, encuentre el citoplasma mediante el uso de los núcleos para identificar las células, seleccione la población mediante el ajuste del área del citoplasma y la intensidad y el área del núcleo, encuentre los puntos y seleccione la población mediante el ajuste de la intensidad y el área del punto. Esta secuencia de análisis condujo al resultado de “media de intensidad relativa del punto por pocillo”. Se realizó un análisis adicional en GraphPad Prism 9.0.1. Para caracterizar la internalización de los compuestos, se aplicó un ajuste de asociación monofásica por regresión no lineal en los datos obtenidos. Aunque los compuestos se han probado a diferentes concentraciones, solo se usaron datos de la concentración de 1 nM de compuesto para determinar la semivida y el máximo.

Las células se fijaron en puntos temporales predeterminados de 0-4 horas y se determinó la fluorescencia para cada combinación de punto temporal y nivel de concentración.

Los resultados mostraron que los tres compuestos se internalizaron por el GHR en el intervalo de concentración de 0.0045–10 nM. La velocidad de internalización fue más alta para la hGH seguido del compuesto 1a y pegvisomant con una velocidad de internalización similar pero más baja. La internalización se redujo en presencia de un competidor no marcado.

La adición del compuesto 1a no marcado y el pegvisomant a las células con hGH marcada mostró un efecto de desplazamiento tanto del compuesto 1 como del pegvisomant en el GHR, lo que sugiere que la captación es específica del receptor.

El efecto de desplazamiento para la hGH fue mayor a las 4 horas en comparación con 24 horas después de la adición del compuesto 1a y el pegvisomant en comparación con 24 horas, el efecto de desplazamiento para el somapacitán duró 24 horas.

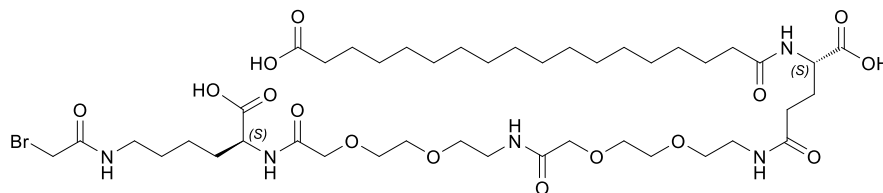
Conclusión

El compuesto 1a experimenta internalización mediada por el receptor por el GHR a una velocidad menor que la GH humana, pero más rápida que el pegvisomant. El compuesto 1a se desplaza más fácilmente del GHR por el pegvisomant en comparación con la GH humana.

Ejemplo 10: Síntesis de aglutinantes de albúmina adicionales

- 5 De manera similar, los aglutinantes de albúmina derivados de bromoacetamida más abajo se fabricaron mediante el uso del método de fase sólida como se describe en los documentos US 8779109 B2, US 9895417 B2 o similar al Ejemplo 1. Las bromoacetamidas pueden usarse directamente para acoplarse al residuo de cisteína libre reducida en la proteína (como se describe en el ejemplo 44 del documento US 8779109 B2 o en el ejemplo 5.1 del documento US 9895417 B2).
- 10 Alternativamente, pueden convertirse en los yodoacetatos como se describe en el Ejemplo 1.ii y se usan para acoplarse al residuo de cisteína libre en la proteína como en el Ejemplo 1.iii.

Br-Sustancia química 6a: Ácido (8*S*, 31*S*)-1-bromo-2,10,19,28,33-pentaoxo-12,15,21,24-tetraoxa-3,9,18,27,32-pentaazanonatetracontano-8,31,49-tricarboxílico

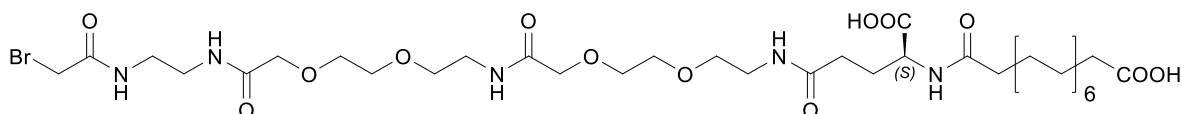


- 15 Este compuesto se preparó sobre un soporte sólido mediante el uso de la química estándar péptido-Fmoc en un sintetizador ABI433. El péptido se ensambló en una resina Fmoc-Lys(Mtt)-Wang mediante el uso de Fmoc-Ado-OH, Fmoc-Glu-OtBu y éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico. Los acoplamientos se realizaron mediante el uso de tetrafluoroborato 3-óxido de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (TCTU, 1 equivalente) y
- 20 DIPEA (2 equivalentes) en DMF. El grupo Mtt se eliminó mediante el tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HPIF) al 80 % en diclorometano, y el acoplamiento final del ácido bromoacético se realizó con N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). El compuesto se escindió de la resina mediante el uso de ácido trifluoroacético en DCM (2:1). La resina se separó por filtración y se lavó con diclorometano. El solvente se evaporó y se añadió acetonitrilo al residuo. El precipitado
- 25 blanco se filtró, se lavó con acetonitrilo y éter dietílico y se secó al vacío para producir el compuesto del título como un polvo blanco. Espectro ¹H RMN (300 MHz, AcOD-d₄, dH): 4.68 (dd, J=8.3 y 5.0 Hz, 1 H); 4.61 (dd, J=8.9 y 4.7 Hz, 1 H); 4.17 (s, 2 H); 4.12 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.78-3.60 (m, 12 H); 3.58-3.40 (m, 4 H); 3.31 (t, J=6.8 Hz, 2 H); 2.45 (t, J=7.3 Hz, 2 H); 2.39-2.30 (m, 4 H); 2.29-

2.17 (m, 1 H); 2.16-2.06 (m, 1 H); 2.02-1.92 (m, 1 H); 1.90-1.75 (m, 1 H); 1.69-1.55 (m, 6 H); 1.52-1.41 (m, 2 H); 1.30 (s, 24 H). LC-MS: $R_t = 2.82$ min. LC-MS m/z : 984.5 (M+H)⁺.

Br-Sustancia química 7a: Ácido 15-{(S)-1-carboxi-3[2-(2-{[2-(2-{2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi}-

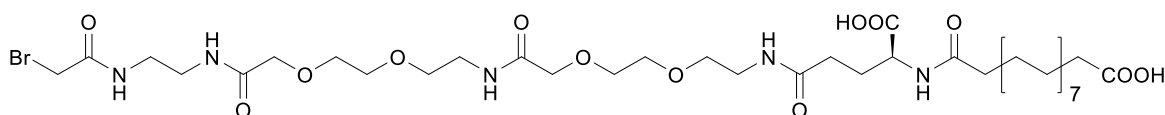
5 etoxi)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil}pentadecanoico



Este compuesto se preparó como se describió en el ejemplo 4.1 del documento US 9895417 B2.

Br-Sustancia química 8a: Ácido 17-{(S)-1-carboxi-3[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi}-

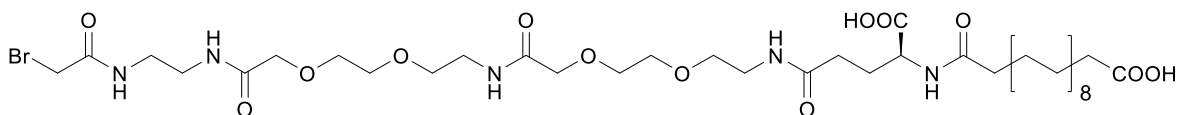
10 etoxi)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil}heptadecanoico



Este compuesto se preparó como se describió en el ejemplo 4.5 del documento US 9895417 B2.

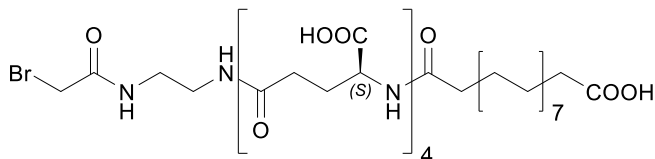
Br-Sustancia química 9a: Ácido 19-{(S)-1-carboxi-3[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi}-

15 etoxi)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil}nonadecanoico



Este compuesto se preparó como se describió en el ejemplo 4.4 del documento US 9895417 B2.

Br-Sustancia química 10a: Ácido (10S,15S,20S,25S)-1-bromo-2,7,12,17,22,27-hexaoxo-
20 3,6,11,16,21,26-hexaazatritetracontano-10,15,20,25,43-pentacarboxílico



Este compuesto se preparó sobre un soporte sólido mediante el uso de la química estándar péptido-Fmoc en un sintetizador ABI433. El péptido se ensambló en resina de cloruro de 2-clorotritilo mediante el uso de Fmoc-Glu-OtBu y éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico, siguiendo
25 generalmente el protocolo del ejemplo 4.1 del documento US 9895417 B2. Espectro de ¹H RMN

(300 MHz, AcOD-d₄, dH): 4.69-4.57 (m, 4 H); 3.95 (s, 2 H); 3.50-3.31 (m, 4 H); 2.57-2.21 (m, 16 H); 1.71-1.55 (m, 4 H); 1.30 (bs, 24 H). LC-MS Rt = 2.45 min. LC-MS m/z: 994.0 (M+H)⁺.

Ejemplo 11: Síntesis y caracterización de antagonistas adicionales del receptor de la GH (GHRA)

Los compuestos 3-19 se prepararon esencialmente mediante el uso del procedimiento descrito en el

5 Ejemplo 1, mediante las siguientes etapas generales:

i) Expresión de la cadena principal peptídica del GHRA en *E. coli* para obtener el disulfuro mixto en Cys101 protegido con cistamina.

ii) Síntesis de la yodoacetamida del resto de unión a albúmina.

10 iii) Desprotección del disulfuro mixto en Cys101 y sustitución nucleófila con la yodoacetamida.

Los detalles de cada etapa se muestran en el Ejemplo 1 mediante el uso de la sustancia química apropiada que se basará aparentemente en la estructura del GHRA objetivo, alternativamente, los compuestos pueden obtenerse mediante el uso de los procedimientos esencialmente como se describen en el documento WO2011/089255, (ver página 132, línea 17 – página 137; Ejemplo 44, 15 página 161, línea 5 – página 164, línea 11). Los datos de caracterización se proporcionan en la Tabla 13.

Tabla 13: Datos de caracterización para conjugados antagonistas de la hGH (compuestos)

LA-GHRA	Variante de la hormona del crecimiento	Aglutinante de albúmina	Fórmula de suma	Masa calculada	LCMS encontrada*	Tiempo de retención (UPLC)	%Pureza
Compuesto 1a	GHv-1	Sustancia química 1a	C1028 H1596 N272 O322 S9	23,206 Da	23,206 Da	4.463 min	>99
Compuesto 3a	GHv-2	Sustancia química 1a	C1028 H1594 N270 O324 S9	23,208 Da	23,206 Da	4.541 min	>99
Compuesto 4a	GHv-1	Sustancia química 6a	C1020 H1584 N266 O318 S8	22,918 Da	22,916 Da	4.631 min	>99
Compuesto 5a	GHv-1	Sustancia química 7a	C1014 H1574 N266 O316 S8	22,803 Da	22,802 Da	4.554 min	98.6
Compuesto 6a	GHv-1	Sustancia química 8a	C1016 H1578 N266 O316 S8	22,831 Da	22,829 Da	4.631 min	>99
Compuesto 7a	GHv-1	Sustancia química 9a	C1018 H1582 N266 O316 S8	22,860 Da	22,858 Da	4.723 min	>99
Compuesto 8a	GHv-1	Sustancia química 10a	C1019 H1577 N267 O319 S8	22,929 Da	22,928 Da	4.618 min	>99
Compuesto 9a	GHv-2	Sustancia química 6a	C1020 H1582 N264 O320 S8	22,920 Da	22,919 Da	4.635 min	>99
Compuesto 10a	GHv-2	Sustancia química 7a	C1014 H1572 N264 O318 S8	22,805 Da	22,804 Da	4.562 min	>99
Compuesto 11a	GHv-2	Sustancia química 8a	C1016 H1576 N264 O318 S8	22,834 Da	22,832 Da	4.640 min	>99
Compuesto 12a	GHv-2	Sustancia química 9a	C1018 H1580 N264 O318 S8	22,862 Da	22,860 Da	4.735 min	>99

Compuesto 13a	GHv-2	Sustancia química 10a	C1019 H1575 N265 O321 S8	22,930 Da	22,929 Da	4.596 min	>99
Compuesto 14a	GHv-3	Sustancia química 1a	C1031 H1601 N269 O324 S9	23,237 Da	23,237 Da	4.494 min	98.28
Compuesto 15a	GHv-3	Sustancia química 6a	C1023 H1589 N263 O320 S8	22,949 Da	22,948 Da	4.567 min	>99
Compuesto 16a	GHv-3	Sustancia química 7a	C1017 H1579 N263 O318 S8	22,835 Da	22,834 Da	4.499 min	>99
Compuesto 17a	GHv-3	Sustancia química 8a	C1019 H1583 N263 O318 S8	22,863 Da	22,861 Da	4.637 min	>99
Compuesto 18a	GHv-3	Sustancia química 9a	C1021 H1587 N263 O318 S8	22,891 Da	22,889 Da	4.717 min	>99
Compuesto 19a	GHv-3	Sustancia química 10a	C1022 H1582 N264 O321 S8	22,960 Da	22,958 Da	min	>99

*Los espectros de masas se registraron en el intervalo de 200-3,000 Da y se deconvolucionaron mediante el uso de la versión 4.2 de MassLynx.

Ejemplo 12: Afinidad por el receptor de la GH determinada mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) para GHRA adicionales

- 5 El propósito del ejemplo fue determinar la afinidad del compuesto de la presente invención en comparación con el pegvisomant. Los experimentos de SPR se realizaron mediante el uso de instrumentos Biacore T200 y Biacore 8K (Cytiva) a 25 °C. La cinética de unión se determinó mediante el uso de una versión biotinilada con etiqueta Avi del dominio extracelular del receptor de la hormona del crecimiento (hGHR-ECD) que comprende los residuos 19-264 del hGHR y un
- 10 constructo hGHR-ECD-Fc dimérico conjugado a Fc.

Para el hGHR-ECD biotinilado, se usó el kit Biotin CAPture (Cytiva; 28920233) que permite la captura reversible de ligandos biotinilados. La superficie del chip se preparó mediante rehidratación en tampón HBS-EP (HEPES 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0.005 % v/v) en el instrumento mediante el uso de un flujo reserva. Antes del experimento, la superficie

- 15 del chip se acondicionó mediante el uso de solución de regeneración (3 partes del concentrado de regeneración 1 (guanidina-HCl 8 M) y 1 parte del concentrado de regeneración 2 (NaOH 1 M)), seguido de tres ciclos de arranque consecutivos mediante el uso de tampón HBS-EP como analito. Cada ciclo consistió en las siguientes etapas: 1) Reactivo CAPture (incluido en el kit Biotin CAPture)
- 50 µg/ml en tampón HBS-EP (régimen de flujo: 2 µl/min, tiempo de contacto: 300 s); 2) captura del
- 20 ligando biotinilado (régimen de flujo: 10 µl/min, tiempo de contacto: 180 s); 3) inyección del analito (compuesto 1a, compuesto 2, somatropina y pegvisomant) (régimen de flujo: 30 µl/min, tiempo de contacto: 240 s, tiempo de disociación: 1,200 s); y 4) regeneración mediante el uso de solución de regeneración (régimen de flujo: 10 µl/min, tiempo de contacto 60 s). Todos los analitos se diluyeron

en tampón HBS-EP y se aplicaron al chip recubierto de ligando en concentraciones de 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 y 0 nM.

Para el hGHR-ECD-Fc dimérico, usamos un chip sensor de proteína A (Cytiva; 29127555). La superficie del chip se preparó mediante rehidratación en tampón HBS-EP en el instrumento mediante el uso de un flujo reserva. Antes del experimento, la superficie del chip se acondicionó mediante el uso de solución de regeneración mediante el uso de la solución de regeneración 2 (10 mM de glicina-HCl pH 1.5, Cytiva; BR100354) seguido de tres ciclos de arranque consecutivos mediante el uso de tampón como analito. Cada ciclo consistió en las siguientes etapas: 1) Captura de ligando (régimen de flujo: 10 ul/min, tiempo de contacto: 30 segundos). 2) Inyección del analito (régimen de flujo: 50 ul/min, tiempo de contacto: 240 segundos, tiempo de disociación: 1,200 segundos) y 3) regeneración mediante el uso de solución de regeneración 2 (régimen de flujo 30 ul/min tiempo de contacto 30 s). Todos los analitos se diluyeron en tampón HBS-EP y se aplicaron al chip recubierto de ligando en concentraciones de 100, 20 ,4, 0.8, 0.16, 0.032 y 0 nM.

Todas las diluciones y experimentos se repitieron en tampón HBS-EP que contenía albúmina sérica bovina al 1 % (BSA, Sigma-Aldrich: A4503)

El análisis de los datos se realizó mediante el uso del software de evaluación Biacore 8K. El ajuste cinético se realizó después de la sustracción de los valores iniciales y las curvas se ajustaron globalmente mediante el uso de un modelo de unión Langmuir 1:1. Los valores de K_D se calcularon en base a las constantes de asociación (k_a) y disociación (k_d) ajustadas. Los resultados se enumeran en la Tabla 14.

	k_a (1/Ms)		k_d (1/s)		K_D (nM)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
GHv-1	1.6E+05	2.8E+03	3.0E-05	1.2E-05	0.19	0.07
Compuesto 1a	2.3E+05	7.9E+03	2.7E-05	1.2E-06	0.12	0.01
Compuesto 3a	3.0E+05	1.1E+04	3.1E-05	2.9E-06	0.11	0.01
Compuesto 4a	2.7E+05	9.0E+03	2.9E-05	6.5E-07	0.11	0.00
Compuesto 5a	2.6E+05	3.0E+03	2.6E-05	1.5E-06	0.10	0.01
Compuesto 6a	2.8E+05	5.6E+03	2.9E-05	5.0E-06	0.10	0.02
Compuesto 7a	3.0E+05	1.2E+04	2.6E-05	3.7E-06	0.09	0.01
Compuesto 8a	1.9E+05	6.7E+03	2.6E-05	3.8E-06	0.13	0.02
Compuesto 9a	4.3E+05	1.4E+04	2.6E-05	1.1E-06	0.06	0.00
Compuesto 10a	2.6E+05	9.7E+03	2.6E-05	1.7E-06	0.10	0.00
Compuesto 11a	2.8E+05	8.0E+03	2.4E-05	1.7E-06	0.09	0.01
Compuesto 12a	4.2E+05	2.2E+04	2.7E-05	1.7E-06	0.06	0.00

Compuesto 13a	3.5E+05	1.5E+04	2.7E-05	4.9E-07	0.08	0.00
Compuesto 14a	3.3E+05	5.6E+03	2.8E-05	8.9E-07	0.08	0.00
Compuesto 15a	3.2E+05	1.4E+04	2.8E-05	1.4E-06	0.09	0.01
Compuesto 16a	3.3E+05	1.3E+04	2.7E-05	2.1E-06	0.08	0.00
Compuesto 17a	3.2E+05	5.0E+03	2.5E-05	2.4E-08	0.08	0.00
Compuesto 18a	3.2E+05	3.8E+03	2.7E-05	2.4E-06	0.09	0.01
Compuesto 19a	2.8E+05	3.1E+03	2.7E-05	3.6E-07	0.10	0.00
Norditropina	1.1E+06	6.0E+04	1.2E-04	2.0E-06	0.11	0.01
Pegvisomant	1.2E+04	2.5E+03	3.2E-05	8.2E-07	2.67	0.49
Somapacitán	4.8E+05	2.5E+04	1.6E-04	1.8E-06	0.34	0.02

Tabla 14: Valores cinéticos determinados mediante SPR para determinar la unión a hGHR-ECD monomérico. SD: Desviación estándar (n=3). Estándar

	ka (1/Ms)		kd (1/s)		KD (nM)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
GHv-1	1.8E+05	1.1E+04	2.3E-05	1.3E-06	0.13	0.00
Compuesto 1a	4.1E+05	2.8E+04	2.6E-05	6.1E-06	0.06	0.01
Compuesto 3a	5.0E+05	1.3E+05	3.3E-05	6.7E-06	0.07	0.01
Compuesto 4a	2.8E+05	5.7E+04	7.0E-05	3.1E-06	0.25	0.04
Compuesto 5a	2.4E+05	2.5E+03	3.8E-05	2.5E-06	0.16	0.01
Compuesto 6a	2.6E+05	8.5E+04	7.1E-05	5.0E-06	0.29	0.09
Compuesto 7a	3.0E+05	2.0E+05	3.6E-05	1.5E-05	0.24	0.30
Compuesto 8a	3.9E+05	2.7E+05	4.5E-05	1.8E-05	0.27	0.36
Compuesto 9a	2.3E+05	1.0E+04	8.6E-05	7.0E-06	0.37	0.02
Compuesto 10a	2.5E+05	1.3E+04	3.9E-05	3.5E-06	0.16	0.01
Compuesto 11a	2.7E+05	1.1E+05	8.1E-05	6.2E-06	0.34	0.16
Compuesto 12a	3.2E+05	1.2E+05	4.7E-05	5.7E-06	0.15	0.03
Compuesto 13a	1.9E+05	1.6E+04	7.1E-05	6.8E-06	0.38	0.02
Compuesto 14a	3.3E+05	1.9E+04	3.6E-05	4.4E-06	0.11	0.01
Compuesto 15a	3.0E+05	6.4E+04	8.4E-05	6.7E-06	0.29	0.05
Compuesto 16a	3.1E+05	8.9E+03	4.2E-05	1.1E-06	0.13	0.01
Compuesto 17a	3.6E+05	3.8E+04	7.9E-05	9.7E-06	0.22	0.00
Compuesto 18a	3.1E+05	2.2E+05	3.7E-05	2.0E-05	0.28	0.38
Compuesto 19a	3.1E+05	1.4E+05	7.5E-05	1.1E-05	0.31	0.22
Norditropina	1.1E+06	1.5E+04	1.2E-04	1.4E-06	0.11	0.00
Pegvisomant	9.7E+03	1.5E+03	3.9E-05	4.7E-06	4.12	1.13
Somapacitán	1.6E+05	7.1E+03	2.3E-04	8.0E-06	1.45	0.04

Tabla 15: Valores cinéticos determinados mediante SPR para determinar la unión a hGHR-ECD monomérico en presencia de BSA al 1 %. SD: Desviación estándar (n=3).

	ka (1/Ms)		kd (1/s)		KD (nM)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
GHv-1	2.1E+05	6.8E+03	5.0E-05	2.6E-05	0.24	0.13
Compuesto 1a	2.9E+05	9.8E+03	4.9E-05	1.0E-05	0.17	0.04
Compuesto 3a	3.6E+05	1.2E+04	5.3E-05	8.8E-06	0.15	0.03
Compuesto 4a	3.1E+05	8.7E+03	4.4E-05	8.4E-06	0.14	0.03
Compuesto 5a	3.2E+05	5.6E+03	4.4E-05	4.4E-06	0.14	0.02
Compuesto 6a	3.2E+05	7.7E+03	4.5E-05	9.5E-06	0.14	0.03
Compuesto 7a	3.4E+05	8.1E+03	4.2E-05	6.7E-06	0.12	0.02
Compuesto 8a	2.4E+05	3.6E+03	4.3E-05	1.5E-06	0.18	0.01
Compuesto 9a	4.8E+05	5.8E+03	4.7E-05	4.9E-06	0.10	0.01
Compuesto 10a	3.1E+05	7.5E+03	3.9E-05	7.1E-06	0.12	0.02
Compuesto 11a	3.3E+05	5.5E+03	4.0E-05	4.9E-06	0.12	0.01
Compuesto 12a	4.7E+05	2.1E+04	4.2E-05	1.2E-06	0.09	0.01
Compuesto 13a	3.8E+05	6.1E+03	4.7E-05	4.0E-06	0.12	0.01
Compuesto 14a	3.7E+05	2.7E+04	4.8E-05	6.5E-06	0.13	0.03
Compuesto 15a	3.4E+05	7.6E+03	4.6E-05	3.0E-06	0.13	0.01
Compuesto 16a	3.6E+05	5.3E+03	4.4E-05	1.1E-06	0.12	0.00
Compuesto 17a	3.4E+05	2.6E+03	4.1E-05	4.4E-06	0.12	0.01
Compuesto 18a	3.6E+05	1.1E+04	4.4E-05	3.6E-06	0.12	0.01
Compuesto 19a	3.3E+05	4.3E+03	4.7E-05	2.1E-06	0.14	0.01
Norditropina	3.0E+06	8.8E+04	4.0E-05	2.3E-06	0.01	0.00
Pegvisomant	1.5E+04	4.4E+03	1.1E-04	4.5E-06	7.69	1.76
Somapacitán	1.3E+06	1.1E+05	4.4E-05	2.1E-07	0.03	0.00

Tabla 16: Valores cinéticos determinados mediante SPR para determinar la unión a hGHR-ECD-Fc dimérico. SD: Desviación estándar (n=3).

	ka (1/Ms)		kd (1/s)		KD (nM)	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
GHv-1	2.3E+05	7.3E+03	3.5E-05	2.6E-05	0.16	0.12
Compuesto 1a	1.2E+05	2.8E+04	3.4E-05	2.8E-06	0.30	0.09
Compuesto 3a	1.2E+05	3.4E+03	3.5E-05	3.0E-06	0.31	0.02
Compuesto 4a	1.4E+05	3.3E+03	3.5E-05	6.9E-06	0.25	0.05
Compuesto 5a	2.7E+05	1.2E+04	4.5E-05	8.2E-06	0.17	0.02
Compuesto 6a	1.4E+05	3.3E+03	3.7E-05	5.3E-06	0.26	0.03
Compuesto 7a	1.1E+05	1.0E+04	2.7E-05	3.3E-06	0.25	0.01
Compuesto 8a	1.1E+05	9.1E+03	4.2E-05	4.1E-06	0.38	0.03
Compuesto 9a	1.9E+05	2.3E+03	2.8E-05	5.4E-06	0.15	0.03
Compuesto 10a	2.7E+05	8.2E+03	3.6E-05	1.3E-05	0.13	0.05
Compuesto 11a	1.4E+05	1.8E+03	2.9E-05	3.3E-06	0.21	0.02
Compuesto 12a	1.4E+05	3.3E+03	2.2E-05	6.4E-06	0.16	0.04

Compuesto 13a	1.6E+05	4.4E+03	3.3E-05	7.1E-06	0.20	0.04
Compuesto 14a	1.4E+05	1.7E+04	3.2E-05	4.8E-06	0.23	0.01
Compuesto 15a	1.4E+05	1.1E+03	3.5E-05	7.8E-06	0.24	0.05
Compuesto 16a	3.2E+05	1.5E+04	4.6E-05	4.8E-06	0.14	0.01
Compuesto 17a	1.4E+05	4.3E+03	2.7E-05	4.3E-06	0.19	0.04
Compuesto 18a	1.1E+05	2.5E+03	3.1E-05	6.0E-06	0.29	0.05
Compuesto 19a	1.3E+05	3.2E+03	3.7E-05	5.6E-06	0.28	0.04
Norditropina	3.3E+06	2.8E+05	3.9E-05	3.1E-06	0.01	0.00
Pegvisomant	1.9E+04	1.8E+03	1.1E-04	4.4E-06	5.78	0.69
Somapacitán	4.2E+05	1.4E+04	4.6E-05	6.0E-06	0.11	0.01

Tabla 17: Valores cinéticos determinados mediante SPR para determinar la unión a hGHR-ECD-Fc dimérico en presencia de BSA al 1 %. SD: Desviación estándar (n=3).

Como se ve en las tablas 14-17, tanto el compuesto 1a como el compuesto 2 tienen mayor afinidad por hGHR-ECD en comparación con el pegvisomant. La prolongación de la molécula pegvisomant se basa en la pegilación. La pegilación tiene un impacto negativo en la afinidad de unión al receptor al receptor de la hormona del crecimiento con una velocidad de asociación y disociación más lenta. Ejemplo 13: Afinidad de unión al GHR en estado estacionario por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) para GHRA adicionales

El propósito del ejemplo fue medir las interacciones termodinámicas entre las parejas de unión (receptor/ligando) en solución, con y sin HSA presente, para determinar las afinidades.

El compuesto 1a, el pegvisomant y la albúmina sérica humana sin ácidos grasos (HSA) (Sigma) se dializaron mediante el uso de casetes de diálisis Slide-A-Lyzer™ durante toda la noche en tampón de histidina 4.38 mM, NaCl 2.05 mM pH 7.1. Todas las proteínas se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño con análisis de dispersión de luz en múltiples ángulos (SEC-MALS) para determinar la concentración antes y después de concentrarlas y después de los experimentos de ITC. SEC-MALS se llevó a cabo en un sistema HPLC Agilent de la serie 1200 (Agilent, Darmstadt, Alemania) mediante el uso de una columna TSK G3000 SWXL (Tosoh Bioscience, Tokio). La columna se mantuvo a una temperatura de 20 °C y se equilibró en Na₂HPO₄ 122 mM, NaH₂PO₄ 78 mM, NaCl 300 mM, 2-propanol al 4 %, pH 6.8). La detección se realizó mediante absorción UV a 280 nm, índice de refracción (RI) y dispersión de luz láser en múltiples ángulos (MALS). Los detectores RI y MALS fueron Optilab T-rEX (Wyatt) y MiniDawn Treos (LS) (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, Estados Unidos), respectivamente. Los datos se evaluaron mediante el uso de Chemstation B.03.01 y Astra ver. 6.1.1.17

Los experimentos de ITC se realizaron mediante el uso de un calorímetro PEAQ-ITC (Malvern, Reino Unido) a 37 °C. La celda de muestra (300 µl) contenía 10 µM del compuesto 1a o pegvisomant en presencia de HSA (0, 1, 5 o 10 mg/ml). La jeringa contenía hGHR-ECD (ligando), a 100 µM. A una etapa de equilibrio térmico le siguió un retardo de 60 segundos y, subsecuentemente, una inyección inicial de 0.4 µl de hGHR-ECD, seguido de 25 inyecciones de 1.5 µl y una inyección final de 1.1 µl a un intervalo de 120 segundos. La velocidad de agitación fue de 750 rpm, y la energía de referencia se mantuvo constante a 9.64 µcal/s. Tratamiento de datos realizado mediante el uso del software de análisis PEAQ-ITC (Malvern Instruments) mediante el uso de un modelo de ajuste de un sitio con compensación de desplazamiento ajustada. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Compuesto 1a										
[HSA]	N (sitios)		K _D (nM)		ΔH (kcal/mol)		ΔG (kcal/mol)		TΔS (kcal/mol)	
mg/ml	Media	SEM	Media	SE M	Media	SE M	Media	SE M	Media	SEM
0	1.09	0.08	2.1	0.44	-32.9	1.91	-12.3	0.12	20.6	1.99
1	1.10	0.09	4.8	0.29	-30.3	1.16	-11.8	0.06	18.5	1.15
5	1.11	0.09	4.9	1.26	-29.6	1.10	-11.8	0.15	17.7	1.00
10	1.11	0.11	3.5	0.32	-29.4	1.53	-12.0	0.10	17.4	1.51
Pegvisomant										
[HSA]	N (sitios)		K _D (nM)		ΔH (kcal/mol)		ΔG (kcal/mol)		TΔS (kcal/mol)	
mg/ml	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SE M	Media	SD
0	1.23	0.26	6.6	1.58	-31.2	1.15	-11.6	0.15	19.6	1.31
1	1.17	0.15	6.6	2.33	-31.7	1.73	-11.6	0.25	20.1	1.96
5	1.24	0.21	5.7	1.00	-32.3	0.92	-11.7	0.10	20.6	1.01
10	1.21	0.14	4.8	2.11	-31.5	1.47	-11.9	0.31	19.7	1.75

Tabla 18: Parámetros de unión en el equilibrio a concentraciones crecientes de HSA, determinados mediante el uso de ITC. SD: Desviación estándar (n=3)

N es la estequiometría de unión, K_D es la constante de disociación, ΔH es el cambio en la entalpía, ΔG es el cambio en la energía libre de Gibbs, ΔS es el cambio en la entropía y T es la temperatura.

Se observa que la K_D para el compuesto 1a es menor que la del pegvisomant, por tanto, el compuesto 1a también muestra mayor afinidad en el ensayo de ITC. También se observa que tanto para el compuesto 1a como para el pegvisomant, la afinidad no cambia significativamente en presencia de HSA en comparación con 0 mg/ml de HSA.

Ejemplo 14: Estudio de los GHRA en un ensayo STAT3

Se probó una serie de antagonistas de la hGH en el modo antagonista (N = 1) con y sin albúmina humana en el medio. Los datos se resumen en la Tabla 19 más abajo.

Tabla 19: STAT3 – Datos del ensayo

Medio	DMEM sin rojo fenol (Gibco, 31053-028) + Albúmina sérica humana al 2.5 % (Sigma, A9511) + Tween-20 al 0.01 %.	DMEM sin rojo fenol (Gibco, 31053-028) + Ovoalbúmina al 1 % (Sigma, A5503) + Tween-20 al 0.01 %	Desplazamiento del aglutinante de albúmina
Com-puesto	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	
GHv-1	5.5	2.4	2.3
Com-puesto 1a	29.2	2.0	14.3
Com-puesto 3a	32.2	1.7	18.7
Com-puesto 4a	25.8	1.4	18.9
Com-puesto 5a	12.9	1.6	8.0
Com-puesto 6a	33.2	2.1	15.5
Com-puesto 7a	18.0	1.1	16.2
Com-puesto 8a	21.0	1.5	14.4
Com-puesto 9a	26.6	1.7	16.0
Com-puesto 10a	15.3	1.9	8.1
Com-puesto 11a	52.7	2.9	18.3
Com-puesto 12a	45.1	2.4	18.5

Com- puesto 13a	21.4	1.6	13.3
Com- puesto 14a	30.1	2.6	11.5
Com- puesto 15a	26.7	1.0	25.5
Com- puesto 16a	11.3	2.0	5.6
Com- puesto 17a	24.0	1.5	16.5
Com- puesto 18a	55.3	2.8	19.7
Com- puesto 19a	53.1	3.4	15.8

Conclusión

El presente ejemplo demuestra que los compuestos de la presente descripción, en particular los compuestos 1a, 3a-19a, muestran propiedades prometedoras de GHRA para su uso en un entorno médico.

- 5 Mientras determinadas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente descripción, a los expertos en la técnica ahora se les ocurrirán muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones anexas pretenden cubrir todas esas modificaciones y cambios siempre que caigan dentro del verdadero espíritu de la invención.