

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.08.29	(73) Titular(es): CURED M GROUP HOLDINGS, LLC 1201 N. MARKET STREET, SUITE 701 WILMINGTON, DE 19801 US
(30) Prioridade(s): 2007.08.30 US 969019 P 2007.10.12 US 979526 P 2007.12.03 US 991964 P 2008.02.26 US 31479 P	(72) Inventor(es): CLARESA S. LEVETAN US VICTOR M. GARSKY US LORAIN VEAL UPHAM US
(43) Data de publicação do pedido: 2010.06.09	(74) Mandatário: CÁTIA CRISTIANA JORGE RIBEIRO LARGO DE SÃO DOMINGOS, Nº1 2910-092 SETÚBAL PT
(45) Data e BPI da concessão: 2015.01.07 078/2015	

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E PROCEDIMENTOS DE UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS PRO-ILHOTA E SEUS ANÁLOGOS**

(57) Resumo:

AS FORMAS DE REALIZAÇÃO RELACIONAM-SE COM PEPTÍDEOS PRO-ILHOTA, PREFERENCIALMENTE HIP, QUE EXIBEM MAIOR ESTABILIDADE E EFICÁCIA, E MÉTODOS PARA UTILIZAÇÃO DOS MESMOS PARA TRATAR UMA PATOLOGIA ASSOCIADA À FUNÇÃO PANCREÁTICA DIMINUÍDA, INCLUINDO DIABETES TIPO 1 E TIPO 2 E SINTOMAS DA MESMA.

Descrição

COMPOSIÇÕES E PROCEDIMENTOS DE UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS PRO-ILHOTA E SEUS ANÁLOGOS

São descritos os peptídeos pro-ilhota concebidos para aumentar a sua solubilidade, biodisponibilidade e resistência em soro à clivagem de protease, melhorando deste modo a sua eficácia como agente terapêutico e métodos de utilização dos mesmos.

O documento US 2007/087971 descreve peptídeos pro-ilhota humanos.

São providos os peptídeos pro-ilhota modificados como definido na reivindicação 1.

Numa forma de realização, os peptídeos pro-ilhota são bloqueados com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal.

Numa forma de realização, HIP e derivados do mesmo são bloqueados com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal (HIP3Blocked (SEQ ID NO: 5), HIP1Blocked (SEQ ID NO: 6) e HIP2Blocked (SEQ ID NO: 7)). Tais modificações parecem tornar a sequência menos suscetível à clivagem de protease no soro com aquelas proteases que normalmente reconhecem extremidades livres, aumentando deste modo o T_{máx} e biodisponibilidade do peptídeo. Os peptídeos modificados nesta forma demonstram maior eficácia, necessitando deste modo de dosagens menores quando administrados, por exemplo, por IV, IM, SubQ ou intraperitonealmente.

As formas de realização adicionais providenciam compostos de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP otimizado (SEQ ID NOs: 5 a 17 e 19), para administração de forma isolada ou em combinação com outros agentes terapêuticos para estimular a regeneração celular pancreática de ilhota. Em várias formas de realização, uma quantidade terapeuticamente eficaz de Peptídeo pro-ilhota otimizado pode ser administrada de forma isolada, em combinação com insulina, em combinação com insulina e outro agente e em combinação com um ou mais agentes que não insulina.

Outras formas de realização providenciam formulações farmacêuticas e formas de dose unitária de compostos de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado. Numa forma de realização, a formulação farmacêutica providenciada contém HIP Otimizado isolado ou em combinação com um ou mais ingredientes ativos (API). Numa forma de realização, os API são um ou agentes em preparações de lisossoma solúveis que permitem que o HIP Otimizado seja administrado através de várias formas, incluindo de forma subcutânea, intramuscular, intravenosa e mesmo oral, dependendo da formulação selecionada. Numa forma de realização, a formulação destina-se à administração sistêmica geral, mas em outras formas de realização, a formulação compreende um agente de direcionamento para administração específica em locais, recetores, células, tecidos, órgãos ou sistemas de órgão específicos num sujeito.

Em outras formas de realização, os peptídeos podem ser usados para tratar uma patologia associada à função pancreática diminuída num sujeito com necessidade de tal tratamento. Um ou mais agentes para estimular a regeneração celular de ilhotas pancreáticas pode ser administrado além

dos compostos de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado. Num aspeto da forma de realização, os agentes são seleccionados de HIP ou peptídeos relacionados com HIP que não HIP Otimizado, amilina/Pramlintida (SYMLIN™), exendina-4 (EXENATIDE™), GIP, GLP-1, agonistas do recetor GLP-1, análogos do GLP-1, peptídeos INGAP do hamster e peptídeos relacionados, Liraglutido (NN2211) e inibidores da dipeptidil peptidase, que bloqueia a degradação de GLP-1.

Em outra forma de realização, os peptídeos podem ser usados para tratar uma patologia associada à função pancreática diminuída num sujeito com necessidade de tal tratamento. Também é descrito um passo de (1) intensificar o controlo glicémico; (2) administrar vitamina D3 (colecalfiferol) oral ou vitamina D2 (ergocalciferol) para manter os níveis de 25-hidroxivitamina acima de 40 ng/ml; (3) administrar uma ou mais terapias imunes para proteger a formação de novas células de ilhotas, incluindo administração de agentes imunossupressores; (4) administrar compostos Peptídeos pro-ilhota otimizados incluindo HIP Otimizado em combinação com insulina, mas diminuindo a insulina administrada ao longo do tempo; e (5) administrar repetidamente uma terapia para proteger as ilhotas, preferivelmente com base em 3 a 24 meses, dependendo da terapia imune seleccionada, além do passo de administrar o HIP Otimizado.

Em outra forma de realização, os peptídeos podem ser usados para tratar uma patologia associada à função pancreática diminuída num sujeito com necessidade de tal tratamento. Também é descrito um método que compreende um ou mais dos passos de: (1) intensificar o controlo glicémico; (2) administrar vitamina D3 (colecalfiferol) oral para manter

os níveis 25-hidroxivitamina acima de 40 ng/ml; (3) administrar um agente para estimular a regeneração de ilhotas pancreáticas além dos compostos de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, incluindo, mas não limitado a HIP e análogos de HIP que são HIP Otimizados; (4) coadministrar um agente selecionado do grupo que consiste de anilina/Pramlintida (SYMLIN™), exendina-4 (EXENATIDE™; BYETTA™), Gastrina, Fator de Crescimento Epidérmico e análogo de Fator de Crescimento Epidérmico, GIP, GLP-1, agonistas de recetor GLP-1, análogos de GLP-1, INGAP, Liraglutido (NN2211) e inibidores da dipeptidil peptidase IV, que bloqueia a degradação de GLP-1; e (5) reduzir ou abrandar a administração de outra terapia de diabetes.

Em outra forma de realização, os peptídeos podem ser usados para tratar uma patologia associada à função pancreática diminuída num sujeito com necessidade de tal tratamento. Também é descrito um método que compreende, além de administrar compostos Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, o passo de administrar um ou mais agentes que inibem, bloqueiam ou destroem as células autoimunes que têm como alvo as ilhotas pancreáticas. Tais terapias são denominadas "terapias imunes" acima. Em vários aspetos desta forma de realização, os agentes que inibem, bloqueiam ou destroem as células autoimunes que têm como alvo as ilhotas pancreáticas são selecionados do grupo que consiste dos seguintes indicados individualmente ou em combinação entre si. Os anticorpos anti CD-3 incluindo hOKT3γ1(Ala-Ala) (teplizumab); ChAglyCD3 que visam a resposta imune e bloqueiam especificamente os linfócitos T que provocam a morte de células beta na diabetes tipo 1; o antígeno linfócito T citotóxico-4, CLTA-4 lg (Abatacept); Sirolimus (Rapamicina) simples em combinação com Tacrolimus

(FK506) ou IL-2 (rapamune); Rapamune simples ou em combinação com Proleucina (aldesleucina); uma proteína de choque térmico 60 (DIAPEP277), uma vacina Anti-D Descarboxilase de Ácido Glutâmico 65 (GAD65); a vacina de células dendríticas supressora da diabetes, GSK189075, diazóxido e estatinas incluindo atorvastatina utilizadas como um agente para preservar a função das células beta, Micofenolato de Mofetil simples ou em combinação com Daclizumab, o agente anti-CD20, Rituximab; Campath-1 H (Anticorpo Anti-CD52), lisofilina; globulina antilinfócito T policlonal (ATG/Timoglobulina), fator de estimulação de colônia de granulócito, Neulasta (Pegfilgrastim), 25-hidroxi e 1,25-hidroxivitamina D suplementar, Vitamina D, vacina IBC-VSO, que é uma forma sintética, metabolicamente inativa de insulina concebida para evitar a destruição de células beta pancreáticas; interferão-alfa; uma vacina usando células T reguladoras específicas de antígeno CD4+CD25+ ou qualquer agente ou agentes concebidos para suprimir o ataque imune sobre as células beta dentro das ilhotas de Langerhans, Prochymal (Células Estaminais de Adulto Humano), o agente Anakinra anti-inflamatório e o agente anti-inflamatório, Deoxispergualina, um agente anti-inflamatório que bloqueia a produção de citocina pró-inflamatória e inibe as células T e células B. Este ou agentes semelhantes podem ser usados nas terapias de combinação que utilizam células T reguladoras diretamente ou através do uso de imunoterapia para parar a destruição de células de produção de insulina.

Em outra forma de realização, os peptídeos podem ser usados para tratar uma patologia associada à função pancreática diminuída num sujeito com necessidade de tal tratamento, em que pelo menos um sintoma da patologia associada à função pancreática diminuída é tratado ou reduzido como um

resultado da administração dos compostos de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP Otimizado. Em um aspecto desta forma de realização, o sintoma é selecionado dos níveis baixos de insulina ou atividade de insulina, resistência à insulina, hiperglicemia, nível de hemoglobina A1C maior do que 6,0%, poliúria, sede excessiva, fome excessiva, perda de peso anormal, cansaço aumentado, irritabilidade, visão turva, prurido nos órgãos genitais, dores anormais, boca seca, pele seca ou com prurido, impotência, candidíase, fraca cicatrização de cortes e arranhões, infecções excessivas ou anormais, hiperglicemia, perda de controle glicêmico, oscilações na glicose sanguínea pós-prandial, oscilações no glucagon sanguíneo, oscilações nos triglicéridos sanguíneos, com a hiperglicemia a levar por último a complicações microvasculares e macrovasculares, que incluem sintomas visuais que levam à cegueira, deterioração acelerada do rim que pode levar à falha renal, necessitando de diálise e transplante de rim, e neuropatia que leva a úlceras dos pés e amputações. Adicionalmente, estudos recentes demonstraram a redução do risco microvascular e macrovascular / cardiovascular entre os pacientes com diabetes tipo 1 que melhoram o controle glicêmico.

Em outra forma de realização, os peptídeos podem ser usados para tratar uma patologia associada à função pancreática diminuída num sujeito com necessidade de tal tratamento. A patologia associada à função pancreática diminuída é qualquer uma da diabetes tipo 1, surgimento recente de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes autoimune latente de adulto, pré-diabetes, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída, síndrome de resistência à insulina, síndrome metabólica/síndrome dismetabólica, excesso de peso, obesidade, hiperlipidemia,

hipertrigliceridemia, distúrbios alimentares, ciclos não ovulatórios e síndrome de ovários policísticos.

Também são descritos anticorpos que se ligam seletivamente a compostos de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado. Num exemplo, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Num outro exemplo, o anticorpo é um anticorpo policlonal. Tais anticorpos podem ser usados em métodos de diagnóstico, cujos métodos compreendem detetar níveis de HIP Otimizado no soro ou tecido de um mamífero. Numa forma de realização, o método diagnóstico é usado para monitorizar o tratamento com HIP Otimizado para garantir que os níveis terapêuticamente eficazes estão a ser conseguidos num paciente que receba tal terapia.

As formas de realização da descrição também providenciam *kits* para tratar um paciente com diabetes tipo 1 ou tipo 2 ou outra condição na qual existam níveis aberrantes de insulina, perturbação no metabolismo da glicose ou resistência à insulina, compreendendo uma dose terapêuticamente eficaz de compostos Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado e opcionalmente, pelo menos, um agente para estimular recetores GLP-1 ou aumentar os níveis de GLP-1, promover a regeneração celular beta, aumentar a saciedade, diminuir a absorção de alimentos e perda de peso, quer no mesmo ou em embalagens separadas e instruções de utilização. As formas de realização adicionais providenciam um *kit* para medir compostos Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo níveis HIP Otimizado numa amostra, o *kit* compreendendo um anticorpo de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo um anticorpo específico de HIP otimizado e compostos Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado e meios de etiquetagem opcionalmente.

H. Descrição dos Desenhos

O ficheiro desta patente contém, pelo menos, uma fotografia ou desenho a cores. As cópias do(s) desenho(s) ou fotografia(s) serão providas pelo Departamento de Patentes e Registo de Marcas dos EUA após solicitação e pagamento da taxa necessária.

Para uma maior compreensão da natureza e vantagens da presente invenção, deve ser feita referência à seguinte descrição detalhada, relativamente aos desenhos em anexo, nos quais:

A Fig. 1 é um gráfico que demonstra os níveis de insulina após incubação na cultura com tecido ductal pancreático humano em HIP1, HIP2 e HIP3.

A Fig. 2 é um gráfico que demonstra os requisitos de insulina em camundongos tratados com HIP1, HIP2 e HIP3.

A Fig. 3 é um gráfico que demonstra a redução média em glicose a partir da linha de base em camundongos tratados com HIP1, HIP2 e HIP3.

A Fig. 4A é um gráfico que demonstra o número de ilhotas em camundongos tratados com HIP2 e HIP3. A Fig. 4B providencia imagens representativas de imunomarcacão de insulina em ratos tratados com placebo e com HIP e as ilhotas marcadas com insulina são definidas em amarelo para diferenciar estas estruturas das células sanguíneas auto-fluorescentes. Escala = 50 μ m em todas as imagens.

A Fig. 5 é uma marcação imunofluorescente para insulina em ratos com tecido pancreático tratado com HIP.

A Fig. 6 é um gráfico que demonstra a semivida do HIP administrado intramuscularmente aos ratos.

A Fig. 7 é um gráfico que demonstra a semivida do HIP

administrado subcutaneamente aos ratos.

A Fig. 8 é um gráfico que demonstra a estabilidade *in vitro* de HIP 2 e HIP 2B no plasma ao longo do tempo.

A Fig. 9A é uma análise *Western Blot* que demonstra a expressão de insulina humana das células PANC-1 sob condições de não-redução e redução em resposta à incubação com vários HIP e HIP Otimizados. A Fig. 9B mostra Marcações Ponceau sob condições de não-redução e redução em resposta à incubação com vários HIP e HIP Otimizados.

A Fig. 10A demonstra células PANC-1 tratadas com HIP2, e Peptídeos HIP otimizados durante quatro dias, com fotografias no dia 7 com 200X de ampliação. A Fig. 10B demonstra o progresso de alterações celulares morfológicas PANC-1 durante 7 dias (controle, HIP2 e HIP2B), com fotos tiradas nos dias 1, 2, 3, 5 e 7 a 200X de amplificação. A Fig. 10C demonstra o progresso das alterações morfológicas de células PANC-1 tratadas com controle e HIP Otimizado (Dímero HIP2 e PEG HIP2).

A Fig. 11 é uma marcação para CK19 e DAPI para mostrar núcleos e insulina em células pancreáticas humanas após administração de HIP2B.

A Fig. 12 é um gráfico que mostra os níveis de glicose de três camundongos NOD após tratamento com placebo e lisofilina (LSF), HIP 2 e LSF e HIP2B e LSF.

A Fig. 13 é uma marcação imunohistoquímica de anticorpos duplos Cy3 de células PANC-1 após tratamento com 150 μ M de HIP e peptídeos de HIP otimizado durante 48 horas, que demonstra a translocação do recetor HIP da membrana celular das células PANC-1 para o citoplasma após estimulação com HIP e HIP Otimizado.

A Fig. 14 demonstra células PANC-1 de exposição ajustada em SFM e TSFM com HIP e peptídeos HIP2B otimizado.

A Fig. 15 demonstra uma avaliação repetida do impacto dos peptídeos HIP2 otimizado das células PANC-1 ao utilizar análises imunofluorescentes que indicam que o HIP2B interage com o recetor HIP (EXTL) resultando na absorção do recetor de HIP a partir da membrana citoplasmática para o citoplasma para o núcleo após estimulação com HIP.

A Fig. 16 demonstra uma *western blot* do HIP2B otimizado que melhora o tempo de translocação (EXTL3) do recetor HIP da membrana citoplasmática para o núcleo nas células PANC-1.

A Fig. 17 é um gráfico que mostra os níveis de glicose diários médios num Modelo de Camundongo Diabético STZ após administração de HIP2, HIP2B e placebo.

A Fig. 18 é um gráfico que mostra os níveis de glicose diários médios entre o HIP2B tratado (verde) e controlo (púrpura) e grupos de placebo de camundongos.

A Fig. 19 é um gráfico que mostra os níveis de glicose entre HIP2B (amarelo), grupos de camundongos tratados com HIP2 (verde) e controlo (azul) no início e fim da intervenção.

A Figura 20 demonstra o impacto de HIP2B Otimizado que restaura os níveis de glicemia em jejum para intervalos não-diabéticos e para níveis abaixo dos níveis de glicose de linha de base antes do tratamento STZ.

A Figura 21 demonstra os resultados de testes de tolerância de glicose entre grupos de tratamento no final do estudo com níveis de glicose mais baixos vistos no grupo de tratamento com HIP2B Otimizado.

A Figura 22 demonstra um estudo de análise de resposta à dose do HIP2B Otimizado em camundongos tornados diabéticos com STZ para comparar os efeitos do HIP2B Otimizado no controlo de glicose quando administrado em dosagens distintas num modelo de diabetes em

camundongos para determinar a dosagem potencial mais baixa que produz a máxima eficácia.

A Figura 23 mostra o impacto de concentração distinta de HIP2B na atenuação da diabetes.

A Figura 24 demonstra a análise farmacocinética da administração pós-cutânea e intravenosa de HIP2B, HIP2 e INGAP a ratos Sprague Dawley, a 4 mg/kg.

A Fig. 25 demonstra a análise farmacocinética do HIP2B Otimizado administrado subcutaneamente.

1. Descrição Detalhada

Antes de serem descritas as presentes composições e métodos, deve ser compreendido que esta invenção não é limitada às moléculas particulares, composições, metodologias ou protocolos descritos, uma vez que podem variar. Também deverá ser compreendido que a terminologia usada na descrição destina-se a descrever apenas as versões ou formas de realização particulares, e não pretende limitar o âmbito da presente invenção que será limitado apenas pelas reivindicações em anexo. Exceto se definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como normalmente compreendido por alguém com experiência na técnica.

A insulina tem sido, desde 1922, a principal, senão mesmo a única, terapia disponível para o tratamento da diabetes tipo 1 e outras condições relatadas devido à falta de ou eficácia diminuída ou produção de insulina. No entanto, os pacientes diabéticos a consumir insulina não possuem um metabolismo de glicose normal, porque a insulina é a única parte da função pancreática em falta ou aberrante.

Até à data, não tem existido nenhuma terapia única ou em

combinação que tenha sido usada com sucesso para tratar os mecanismo da doença subjacente da diabetes tipo 1 ou tipo 2. O desenvolvimento de um tratamento bem-sucedido que estimula a regeneração das células que produzem insulina dentro do pâncreas vai representar um marco no tratamento significativo para pacientes com diabetes. Alguma literatura usa de forma indevida o termo "células de ilhotas" para se referir apenas a células beta ou a ilhotas inteiras. No entanto, é importante distinguir entre células beta e ilhotas porque algumas alternativas ao tratamento procuram aumentar o número de células beta, enquanto não existem tratamentos disponíveis para substituir endogenamente ilhotas inteiras que não o transplante de ilhotas.

Apesar de décadas de pesquisa e o advento do transplante da ilhota pancreática em 1974 e reivindicações de sucesso mais recentes que resultam do Protocolo Edmonton para o transplante de ilhota, estas abordagens não foram muito bem-sucedidas nos Estados Unidos. Por exemplo, nos quatro anos após o transplante, menos de 10% dos pacientes que receberam transplantes de ilhotas permanecem insulinodependentes. Adicionalmente, existe uma taxa de 18% de efeitos secundários graves. Está bem estabelecido que no surgimento da diabetes tipo 1, os pacientes já perderam a maior parte das suas ilhotas e o número de ilhotas continua a diminuir de forma progressiva. No entanto, estudos mais recentes descobriram que na altura do diagnóstico da diabetes tipo 2, os pacientes exibiram uma perda de, pelo menos, 50% da massa e número de ilhotas. Tal como com os pacientes do tipo 1, o número e massa de ilhotas continua a diminuir, não do ataque autoimune, mas porque as células beta tornam-se efetivamente "esgotadas". Apesar de este declínio ocorrer mais rapidamente nos pacientes do tipo 1,

ainda existe um declínio de 10-20% por ano entre os pacientes do tipo 2.

Num pâncreas que funciona normalmente, os pequenos números de ilhotas morrem de forma natural diariamente e são substituídos como requerido para manter os níveis de glicose sob controlo. Em média, este processo regenerativo conhecido como neogénese das ilhotas substitui as ilhotas a uma taxa de aproximadamente 2% por mês. Em pacientes não diabéticos, a massa de células beta dentro das ilhotas existentes pode expandir ou contrair dependendo das necessidades de insulina do indivíduo. Este processo é referido como "proliferação de células beta" e não ocorre em pacientes com diabetes tipo 1 e é limitado nos pacientes do tipo 2.

O estudo da neogénese de ilhotas não é recente. Em 1920, foi reportado que uma pedra pancreática obstrutiva resultou em atrofia na maior parte do pâncreas mas num aumento nas ilhotas. Foi então alvitrado que ligar (unir) os ductos pancreáticos pode levar à identificação de uma substância que pode ser útil no tratamento da diabetes. Os cirurgiões ligaram os ductos pancreáticos de crianças diabéticas na esperança de produzir substâncias que formassem novas ilhotas. Apesar de os efeitos positivos destes procedimentos serem de curta duração, demonstraram o potencial de uma restauração de ilhotas no homem.

Os estudos de ligação ductal pancreático que se destinaram a criar um modelo de hamster para pancreatite resultaram na formação de muitas novas ilhotas. Esta pesquisa levou ao isolamento de um peptídeo de hamster referido como a Proteína Associada à Neogénese das Ilhotas ou INGAP (em inglês, Islet Neogenesis Associated Peptide). No

desenvolvimento clínico da INGAP, foi ainda demonstrado que novas ilhotas humanas podem ser diferenciadas das células progenitoras de ilhotas tipo células estaminais que residem em todo o pâncreas adulto durante décadas após o surgimento da diabetes tipo 1.

Separada do conceito de usar ligação ductal para produzir novas ilhotas, a pesquisa foi realizada relativamente à potencial regeneração de ilhotas durante a gravidez. Foi reportado que as ilhotas foram formadas no final da embriogénese e indicou que a população de ilhotas continua a crescer de forma pós-natal através de um processo de metamorfose do tecido ductal circundante.

A forma principal na qual os pacientes com diabetes tipo 1 ou no estágio final do tipo 2 lidam com a sua doença é ao administrar insulina, quer seja por injeção subcutânea ou ao usar uma infusão de bomba subcutânea. Assim como as desvantagens de estilo de vida óbvias, a terapia de insulina não corresponde aos mecanismos de controlo normal do corpo e, por isso, não gere na totalidade as oscilações de glicose. Como mostrado pelo gráfico adjacente, até mesmo os pacientes diabéticos do tipo 1 melhor controlados não têm nada parecido como um metabolismo de glicose normal. Isto deve-se ao facto de a secreção de insulina ser apenas parte da função pancreática em falta.

Os investigadores avaliaram se a produção endógena de insulina pode ser estimulada por tratamento com fármaco. Por exemplo, durante as últimas décadas, várias terapias foram estudadas, nas quais um peptídeo envolvido no metabolismo de glicose, ou análogos de tais peptídeos, foi administrado a pacientes diabéticos. Estas terapias incluem a administração de peptídeos com sequências de aminoácido

semelhantes àsquelas do Peptídeo-1 similar ao glucagon (do inglês, Glucagon Like Peptide-1 - GLP-1), e tais peptídeos incluem: os análogos de recetor GLP-1, Exendin-4, Exenatide/BYETTA™, que são derivados do Gila Monster, Januvia™, Peptídeo inibidor gástrico/Peptídeo insulínótropico insulino-dependente (do inglês, Gastric Inhibitory Peptide/Glucose-Dependent Insulinotropic polypeptide - GIP), compostos homólogos a GLP-1, tais como Liraglutido (NN2211), Inibidores da Dipeptidil Peptidase-4, os quais inibem a decomposição do GLP-1, Gastrina, Fator de Crescimento Epidérmico e Análogos do Fator de Crescimento Epidérmico, e Peptídeo Associado à Neogénese das Ilhotas derivado de Hamster (INGAP).

Nenhum destes tratamentos provou eficácia na reversão dos mecanismos de diabetes subjacentes. A geração de novas ilhotas não forma só as células beta que produzem insulina, também forma as outras células envolvidas no metabolismo de glicose. Consequentemente, se não forem geradas novas ilhotas, o paciente é finalmente capaz de recuperar o controlo glicémico. Por isso, a neogénese de ilhotas apresenta a possibilidade não apenas para tratar, mas atualmente para reverter a diabetes.

Para qualquer agente de neogénese de células de ilhotas ser eficaz, o pâncreas deve ser "flexível" com respeito à sua capacidade de gerar novas células de ilhotas. A prova da flexibilidade do pâncreas com respeito à geração de novas ilhotas pancreáticas durante a vida de alguém em resposta à morte de ilhotas pancreáticas ou apoptose substituiu o conceito já existente de que o número de estruturas de ilhotas que produzem insulina é fixo no momento do nascimento e mantido durante a vida, enquanto a plasticidade e capacidade de células beta proliferarem

dentro das ilhotas existentes foram bem estabelecidas. É atualmente aceite que a neogénese de ilhotas pancreáticas ocorra a partir de células pancreáticas preexistentes através de diferenciação de células progenitoras descobertas entre as frações de endócrina e exócrina do pâncreas. Os dados demonstram que, mesmo passadas décadas após o surgimento da diabetes tipo 1, as ilhotas pancreáticas podem ser regeneradas.

Por exemplo, os pacientes com diabetes tipo 1 são capazes de produzir níveis normais de peptídeo C durante a gravidez. Várias equipas descobriram um aumento paradoxal nos níveis de peptídeo C durante o primeiro trimestre de gravidez no intervalo normal em tanto quanto um terço de todas as pacientes do tipo 1 grávidas. Este aumento no peptídeo C é acompanhado por uma redução significativa nos requisitos de insulina com alguns pacientes sendo capazes de descontinuar a insulina transientemente durante o primeiro trimestre de gravidez. Este aumento no peptídeo C durante a gravidez que ocorre nas 10 semanas de gestação entre as pacientes, apesar de não existir nenhum peptídeo C mensurável antes da gravidez, implica a restauração das estruturas das ilhotas a funcionar. É alvitado que a neogénese de ilhotas que ocorra durante a gravidez resulte no aumento concomitante na produção de esteroides endógenos e numa baixa regulação do sistema imune que evita o ataque imune ao feto, o que provavelmente também desempenha um papel na supressão do ataque linfócito nas ilhotas. Juntamente com a supressão imune, é também especulado que exista uma supra-regulação da promoção do crescimento de ilhotas maternas que promovem os fatores durante a gravidez para compensar a diminuição do valor nominal de glicose materno na gravidez. Os modelos animais também demonstraram que a neogénese de ilhotas precede o

desenvolvimento de expansão de células beta durante a gravidez e foi demonstrado que as células progenitoras pancreáticas diferenciam-se para ilhotas. De igual modo, os pacientes que têm estado numa imunodepressão a longo prazo para transplante de rim foram observados para regenerar as ilhotas que produzem insulina.

Durante a última década, os estudos clínicos foram realizados para avaliar o impacto de um número de moduladores imunes que podem parar a destruição das células beta do pâncreas. Os anticorpos Anti-CD 3, tais como hOKT3 γ 1 (Ala-Ala) e ChAglyCD3, que têm como alvo a resposta imune e especificamente bloquear os linfócitos T que provocam a morte das células beta na diabetes tipo 1, foram utilizados para este efeito, tal como os tratamentos que envolvem a administração de Sirolimus (Rapamicina), Tacrolimus (FK506), uma proteína de choque térmico 60 (DIAPEP277™), uma vacina Anti-Descarboxilase de Ácido Glutâmico 65 (GAD65), Micofenolato de Mofetil simples ou em combinação com Daclizumab, o agente anti-CD20, globulina antilinfócito T policlonal (ATG), lisofilina, Rituximab, Campath-1 H (Anticorpo Anti-CD52), Vitamina D, vacina IBC-VSO, que é uma forma sintética, metabolicamente inativa de insulina concebida para evitar a destruição de células beta pancreáticas e vacinação interferão- α usando células T reguladoras específicas do antígeno CD4+CD25+. Estas abordagens terapêuticas destinam-se a serem usadas para utilizar as células T reguladoras diretamente ou através do uso de imunoterapia para parar a destruição de células que produzem insulina. O objetivo destes ensaios é determinar a capacidade de tais agentes para preservar a função de ilhotas ao evitar o ataque imune adicional nas células beta das ilhotas do pâncreas.

Adicionalmente, estudos recentes descobriram que a vitamina D pode desempenhar um papel importante na modulação imune na prevenção da diabetes tipo 1. Até 54,7% da população dos Estados Unidos, não obstante a latitude, têm baixos níveis de 25-hidroxivitamina D. A deficiência da vitamina D foi demonstrada, não apenas por ser associada ao risco aumentado da diabetes tipo 1 e vista no surgimento do diagnóstico do tipo 1, mas também é comumente vista entre os pacientes com diabetes tipo 1 e tipo 2. É recomendado manter os níveis acima dos 40 ng/ml para manter uma função imune normal. Não foram observados efeitos adversos com as doses até 10 000 IU/dia.

As definições seguintes são providas para ajudar o leitor. Exceto se de outro modo definido, todos os termos da técnica, notações e outros termos médicos ou científicos ou terminologia aqui usada destinam-se a ter os significados comumente compreendidos por aqueles com experiência nas técnicas química e médica. Em alguns casos, os termos com significados comumente compreendidos são aqui definidos para clareza e/ou para referência rápida, e a inclusão de tais definições aqui não devem ser necessariamente compreendidas para representar uma diferença substancial sobre a definição do termo, como geralmente compreendido na técnica.

Também deverá ser notado que como aqui usado e nas reivindicações em anexo, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referência plural, exceto se o contexto indicar o contrário. Deste modo, por exemplo, a referência a um "fibroblasto" é uma referência a uma ou mais células e equivalentes das mesmas conhecidas pelos especialistas na técnica, e etc.

Como aqui usado, o termo "cerca" significa mais ou menos 10% do valor numérico do número que está a ser usado. Por isso, cerca de 50% significa estar no intervalo de 45%-55%. Como aqui usado, "peptídeo pro-ilhota" refere-se a proteínas ou peptídeos derivados de tais proteínas que estimulam a neogénese de células de ilhota, incluindo, mas não limitado a, REG3A de humano (SEQ ID NO: 1), REG3G de humano (SEQ ID NO: 28), REG1A de humano, REG1B de humano, REG4 de humano, INGAP de hamster (SEQ ID NO: 27), REG2 de hamster, REG3G de hamster, REG1 de rato, PAP/REG3B de rato, PAP3 de rato, REG3G de rato, REG1 de camundongo, REG2 de camundongo, REG3A de camundongo, REG3B de camundongo, REG3G de camundongo, REG3S de camundongo, REG4 de camundongo, PTP de bovino, chimpanzé, vaca, cão, ovelha e análogos e homólogos, tais como proteínas, e fragmentos de peptídeos derivados de tais proteínas ou homólogos dos mesmos. As sequências de proteína de tais peptídeos pro-ilhotas estão disponíveis publicamente. Os peptídeos pro-ilhotas incluem ainda peptídeos que são fragmentos de REG3A, INGAP ou proteínas homólogas que contêm a sequência de catorze aminoácidos ativa de HIP2 (ou a sequência correspondente para cada homólogo) (consultar a Tabela 1 abaixo) e são menos de 150 aminoácidos, menos de 125 aminoácidos, menos de 100 aminoácidos, menos de 75 aminoácidos, menos de 50 aminoácidos ou menos de 25 aminoácidos. Exemplos de tais peptídeos (que providenciam a sequência de catorze aminoácidos ativa) incluem, mas não são limitados aos seguintes:

Tabela 1

REG3A de humano		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G		SEQ ID NO: 4
Chimpanzé		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		SEQ ID NO: 60
INGAP de hamster		I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G		SEQ ID NO: 61
REG3A de camundongo		I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		SEQ ID NO: 62
REG3 de rato da Noruega		I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		SEQ ID NO: 63
Vaca		I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A		SEQ ID NO: 64
Cão		M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A		SEQ ID NO: 65
Ovelha		I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A		SEQ ID NO: 66
REG1A de humano		I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W		SEQ ID NO: 67
REG1B de humano		I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W		SEQ ID NO: 68
REG1 de rato		I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	w	H	W		SEQ ID NO: 69
REG1 de camundongo		T	G	L	H	D	P	K	R	N	R	R	w	H	W		SEQ ID NO: 70
REG2 de camundongo		T	G	L	H	D	P	K	S	N	R	R	w	H	W		SEQ ID NO: 71
REG2 de hamster		I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	w	H	W		SEQ ID NO: 72
REG3 de rato		I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	p	N	G		SEQ ID NO: 73
PAP/REG3B de rato		I	G	L	H	D	P	T	L	G	G	E	p	N	G		SEQ ID NO: 74
PAP3 de rato		I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	p	N	R		SEQ ID NO: 75
REG3A de camundongo		I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	p	N	G		SEQ ID NO: 76
REG3B de camundongo		I	G	L	H	D	P	T	L	G	A	E	p	N	G		SEQ ID NO: 77

REG3G	de		I	G	L	H	D	P	T	L	G	Y	E	p	N	R		SEQ	ID
camundongo																		NO: 78	
REG3G	de		I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	p	N	R		SEQ	ID
rato																		NO: 79	
REG3G	de		I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	p	N	G		SEQ	ID
hamster																		NO: 80	
REG3G	de		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	p	D	G		SEQ	ID
humano																		NO: 81	
REG3S	de		I	G	L	H	D	L	S	L	G	S	L	p	N	E		SEQ	ID
camundongo																		NO: 82	
PTP	de		I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	A	N	A		SEQ	ID
bovino																		NO: 83	
INGAP	de		I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G		SEQ	ID
hamster																		NO: 84	
REG4	de		I	G	L	H	D	P	Q	K	R	Q	Q	W	Q	W		SEQ	ID
humano																		NO: 85	
REG4	de		I	G	L	H	D	P	Q	K	K	Q	L	W	Q	w		SEQ	ID
camundongo																		NO: 86	
Chimpanzé			I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		SEQ	ID
																		NO: 87	
Vaca			I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A		SEQ	ID
																		NO: 88	
Cão			M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A		SEQ	ID
																		NO: 89	
Ovelha			I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A		SEQ	ID
																		NO: 90	

Tais fragmentos de peptídeos incluem, mas não estão limitados a HIP1, HIP2, HIP3, INGAP (SEQ ID NO: 26), e homólogos dos mesmos, identificados abaixo. Foi encontrado um gene humano similar no gene homem para rato, que é referido como gene Reg, e é o gene sobre o qual o HIP foi descoberto em humanos e uma grande homologia entre espécies dos peptídeos pro-ilhota humanos e outras espécies mamíferas. A seguinte homologia de espécies mostra que a sequência relacionada com HIP é conservada através da evolução. É provável que cada uma destas sequências terá alguma eficácia em humanos, mas nenhuma correspondeu exatamente à sequência ativa humana do HIP.

Espécies		Homologia																	
REG3A	de	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	E	SEQ	ID
humano																		NO: 30	
Chimpanzé		W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	G	SEQ	ID
																		NO: 31	
INGAP	de	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	S	SEQ	ID
Hamster																		NO: 32	
REG3A	de	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEQ	ID
camundongo																		NO: 33	
REG3	de	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEQ	ID
rato																		NO: 34	
da Noruega																		SEQ	ID
Vaca		W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	G		
																		NO: 35	
Cão		W	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	D	SEQ	ID
																		NO: 36	
Ovelha		W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	G	SEQ	ID
																		NO: 37	

A tabela acima compara uma cadeia de dezasseis aminoácidos de um peptídeo humano que contém a sequência HIP2 de catorze aminoácidos, em comparação com outras espécies.

REG3A	de	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G		SEQ	ID
humano																		NO: 3	
Chimpanzé		W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		SEQ	ID
																		NO: 38	
INGAP	de	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G		SEQ	ID
hamster																		NO: 39	
REG3A	de	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		SEQ	ID
camundongo																		NO: 40	
REG3	de	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		SEQ	ID
rato																		NO: 41	
da																			
Noruega																			
Vaca		W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A		SEQ	ID
																		NO: 42	
Cão		W	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A		SEQ	ID
																		NO: 43	
Ovelha		W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A		SEQ	ID
																		NO: 44	
REG3A	de		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G		SEQ	ID
humano																		NO: 4	
Chimpanzé			I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		SEQ	ID
																		NO: 45	

INGAP de	I G L H D P S	H	G	T L	P	N G	SEQ ID
Hamster							
REG3A de	I G L H D P T	M	G	Q Q	P	N G	NO: 46
camundongo							SEQ ID
REG3 de	I W L H D P T	M	G	Q Q	P	N G	NO: 47
rato da							SEQ ID
Noruega							NO: 48
Vaca	I G L H D P T		G	S E	P	D A	SEQ ID
							NO: 49
Cão	M G L H D P T	E	G	Y E	P	N A	SEQ ID
							NO: 50
Ovelha	I G L H D P T		G	S E	P	N A	SEQ ID
							NO: 51
REG3A de	I G L H D P T	Q	G	T E	P	N G	SEQ ID
humano							NO: 2
Chimpanzé	I G L H D P T		G	S E	P	D G	SEQ ID
							NO: 52
INGAP de	I G L H D P S	H	G	T L	P	N G	SEQ ID
hamster							NO: 27
REG3A de	I G L H D P T	M	G	Q Q	P	N G	SEQ ID
camundongo							NO: 53
REG3 de	I W L H D P T	M	G	Q Q	P	N G	SEQ ID
rato da							NO: 54
Noruega							
Vaca	I G L H D P T	E		S E	P	D A	SEQ ID
							NO: 55
Cão	M G L H D P T	E	G	Y E	P	N A	SEQ ID
							NO: 56
Ovelha	I G L H D P T		G	S E	P	N A	SEQ ID
							NO: 57

Como aqui usado, "Peptídeo pro-ilhota Otimizado" refere-se a variações de um peptídeo pro-ilhota, incluindo, mas não limitado a, REG3A humano, REG3G humano, REG1A humano, REG1B humano, REG4 humano, INGAP de hamster, REG2 de hamster, REG3G de hamster, REG1 de rato, PAP/REG3B de rato, PAP3 de rato, REG3G de rato, REG1 de camundongo, REG2 de camundongo, REG3A de camundongo, REG3B de camundongo, REG3G de camundongo, REG3S de camundongo, REG4 de camundongo,

PTP, HIP1, HIP2 e/ou HIP3 de bovino, em que o peptídeo foi modificado para aumentar a estabilidade, solubilidade ou biodisponibilidade de tais peptídeos, como definido na reivindicação 1. Para efeitos desta descrição, a estabilidade refere-se à resistência de peptídeos para degradação por proteases em soro que se destinam a e degradam Peptídeos pro-ilhota não-otimizados, peptídeo REG3A, REG3G, INGAP, REG3G, peptídeo INGAP, HIP1, HIP2 e/ou HIP3 ou homólogos de tais peptídeos. Também, para efeitos desta descrição, a biodisponibilidade refere-se à quantidade de peptídeo disponível para uso terapêutico *in vivo* pelas células alvo, vias e/ou mecanismos sistêmicos com base na capacidade de peptídeo para evitar a degradação por proteases e outras vias sistêmicas que degradaram os Peptídeos pro-ilhota não-otimizados, REG3A humano, REG3G humano, REG1A humano, REG1B humano, REG4 humano, INGAP de hamster, REG2 de hamster, REG3G de hamster, REG1 de rato, PAP/REG3B de rato, PAP3 de rato, REG3G de rato, REG1 de camundongo, REG2 de camundongo, REG3A de camundongo, REG3B de camundongo, REG3G de camundongo, REG3S de camundongo, REG4 de camundongo, PTP de bovino, chimpanzé, vaca, cão, ovelha e análogos e homólogos de tais proteínas, HIP1, HIP2 e/ou HIP3 ou homólogos de tais peptídeos. De preferência, os Peptídeos pro-ilhota não-otimizados referem-se ao peptídeo REG3G, peptídeo INGAP, HIP3, HIP1 e/ou HIP2 ou homólogos que são bloqueados pela adição de um grupo amido C-terminal e um grupo acetil N-terminal, peguilado, e uma combinação dos mesmos.

Como aqui usado, "HIP Otimizado" refere-se a variações de HIP, HIP1 e/ou HIP2, em que o peptídeo foi modificado para aumentar a estabilidade, solubilidade ou biodisponibilidade de HIP, HIP1 ou HIP2, como definido na reivindicação 1. Para efeitos desta descrição, a estabilidade refere-se à

resistência do peptídeo para degradação por protéase em soro que se destina e degrada HIP3, HIP1 e/ou HIP2 não-Otimizado. Também, para efeitos desta descrição, a biodisponibilidade refere-se à quantidade de peptídeo disponível para uso terapêutico *in vivo* pelas células alvo, vias e/ou mecanismos sistêmicos com base na capacidade para evitar a degradação por protéases e outras vias sistêmicas que degradaram HIP3, HIP1 e/ou HIP2 não-Otimizado. De preferência, os HIP Otimizados referem-se ao HIP3, HIP1 e/ou HIP2 que são bloqueados pela adição de um grupo amido C-terminal e um grupo acetil N-terminal, peguado, e uma combinação dos mesmos.

Como aqui usado, "tratar" uma condição ou paciente refere-se a tomar medidas para obter resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Para efeitos desta descrição, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não são limitados a alívio ou melhoria de um ou mais sintomas de diabetes, diminuição da disseminação da doença, atraso ou abrandamento do progresso da doença, melhoria, palição ou estabilização do estado da doença, e outros resultados benéficos descritos abaixo. Os sintomas da diabetes incluem níveis baixos ou inadequados de insulina ou atividade de insulina, poliúria, sede excessiva, fome excessiva, perda de peso anormal, cansaço aumentado, irritabilidade, visão turva, prurido nos órgãos genitais, dores anormais, boca seca, pele seca ou com prurido, impotência, candidíase, fraca cicatrização de cortes e arranhões, infecções excessivas ou anormais, hiperglicemia, perda de controle glicêmico, oscilações na glicose sanguínea pós-prandial, oscilações no glucagon sanguíneo, oscilações nos triglicéridos sanguíneos. A diabetes pode ser diagnosticada através de métodos bem conhecidos de alguém com conhecimento na técnica. Por

exemplo, habitualmente, os diabéticos têm um resultado de glicose no plasma do sangue superior a 126 mg/dL de glicose. A Pré-diabetes, que pode também ser tratada pelas composições e métodos aqui descritos, é habitualmente diagnosticada em pacientes com um nível de glicose no sangue entre 100 e 125 mg/dL de glicose. Outros sintomas podem também ser usados para diagnosticar a diabetes, doenças relacionadas e distúrbios, e doenças e distúrbios afetados pela diminuição da função pancreática.

Como aqui utilizado, "redução" de um sintoma ou sintomas (e equivalentes gramaticais desta frase) significa diminuir a gravidade ou frequência do(s) sintoma(s), ou eliminação do(s) sintoma(s).

O termo "inibir" inclui a administração de um composto da presente descrição para evitar o surgimento dos sintomas, aliviar os sintomas ou eliminar a doença, condição ou distúrbio.

Como aqui utilizado, a "patologia associada à função pancreática diminuída" é uma na qual a patologia é associada a uma menor capacidade de um paciente para que o seu pâncreas produza e/ou segregue hormonas e/ou citocinas. Preferencialmente, esta hormona ou citocina é insulina. A patologia associada à função pancreática diminuída é qualquer uma da diabetes tipo 1, surgimento recente de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes autoimune latente de adulto, pré-diabetes, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída, síndrome de resistência à insulina, síndrome metabólica/síndrome dismetabólica, excesso de peso, obesidade, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, distúrbios alimentares, ciclos não ovulatórios e síndrome de ovários policísticos.

Como aqui utilizado, "administrar" ou "administração de" um fármaco ou terapêutica a um paciente (e equivalentes gramaticais desta frase) inclui administração direta, incluindo autoadministração, diretamente dentro ou num tecido alvo, ou administrar uma terapêutica a um paciente em que a terapêutica afeta positivamente o tecido alvo, e administração indireta, incluindo o ato de prescrever um fármaco. Por exemplo, como aqui utilizado, um médico que instrua um paciente a autoadministrar um fármaco e/ou providencie a um paciente uma prescrição de um fármaco, está a administrar o fármaco ao paciente.

Como aqui usado, um "paciente" ou "sujeito" é um mamífero, tipicamente um humano, mas opcionalmente um animal mamífero de importância veterinária, incluindo, mas não limitado a, cavalos, gado, ovelhas, cães e gatos.

Como aqui utilizado, uma "manifestação" de doença refere-se a um sintoma, sinal, estado anatômico (por exemplo, falta de células de ilhota), estado fisiológico (por exemplo, nível de glicose) ou característica de análises (por exemplo, nível de triglicéridos) de um paciente com a doença.

Como aqui usado, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um fármaco ou agente é uma quantidade de um fármaco ou agente que, quando administrado a um paciente com uma doença ou distúrbio terá o efeito terapêutico pretendido, por exemplo, alívio, melhoria, palição ou eliminação de uma ou mais manifestações da doença ou condições no paciente. O efeito terapêutico total não ocorre necessariamente pela administração de uma dose e pode ocorrer apenas após administração de uma série de doses. Deste modo, uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser

administrada em uma ou mais administrações.

Como aqui usado, uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um fármaco é uma quantidade de um fármaco que, quando administrado a um paciente, terá o efeito profilático pretendido, por exemplo, evitar ou atrasar o surgimento (ou recorrência) de uma doença ou sintomas, ou reduzir a probabilidade do surgimento (ou recorrência) de doença ou sintomas. O efeito terapêutico total não ocorre necessariamente pela administração de uma dose e pode ocorrer apenas após administração de uma série de doses. Deste modo, uma quantidade profilaticamente eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações.

Por "farmaceuticamente aceitável", quer dizer-se que o portador, diluente ou excipiente tem de ser compatível com os outros ingredientes das formulações e não prejudicial ao destinatário das mesmas.

Como aqui usado, "TID", "QD" e "QHS" têm os seus significados habituais de "três vezes por dia", "uma vez por dia" e "uma vez antes do deitar", respetivamente.

A administração de um agente "em combinação com" inclui administração paralela (administração de ambos os agentes ao paciente durante um período de tempo, tal como administração de um anticorpo monoclonal e uma hormona de peptídeo, tal como hormona incretina ou análogo em dias alternados durante um mês), coadministração (na qual os agentes são administrados, aproximadamente ao mesmo tempo, por exemplo dentro de alguns minutos até algumas horas entre si), e co-formulação (na qual os agentes são combinados ou compostos numa única forma de dosagem adequada para administração oral, subcutânea ou

parenteral).

Os "Inibidores DPP-4" são inibidores da dipeptidil peptidase-4.

"INGAP de hamster" é um peptídeo associado de neogénese de ilhota não-humana tendo a sequência lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (SEQ ID NO: 26). Este peptídeo é um fragmento da proteína INGAP de hamster com a sequência lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (SEQ ID NO: 27).

"GIP" é o Peptídeo Inibidor Gástrico, também conhecido como Peptídeo Insulino-trópico Insulino-dependente.

"GLP-1" é Peptídeo-1 similar ao glucagon.

"HIP3" (lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu (SEQ ID NO: 2)) é um Peptídeo pro-ilhota Humano na forma purificada, sintética ou recombinante. HIP3 tem um peso molecular de cerca de 1564,6.

"HIP1" (Trp-lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly (SEQ ID NO: 3)) é um Peptídeo pro-ilhota Humano na forma purificada, sintética ou recombinante.

"HIP2" (lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly (SEQ ID NO: 4)) é um Peptídeo pro-ilhota Humano na forma purificada, sintética ou recombinante. HIP2 tem um peso molecular de cerca de 1435,5.

HIP3Blocked ou HIP3B (Ac-lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-NH₂) (SEQ ID NO: 5)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi bloqueado com um grupo

acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante. HIP3B tem um peso molecular de cerca de 1605,7.

HIP1Blocked (Ac-Trp-lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH₂ (SEQ ID NO: 6)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante.

HIP2Blocked ou HIP2B (Ac-lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH₂) (SEQ ID NO: 7)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante. HIP2B tem um peso molecular de cerca de 1476,6.

Peptídeo INGAP Blocked ou INGAPB é um Peptídeo INGAP que foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante.

HIP3Cys (lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys) (SEQ ID NO: 8)) é um Peptídeo pro-ilhota Humano que tem um resíduo cisteína C-terminal, em forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

HIP1Cys (Trp-lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (SEQ ID NO: 9)) é um Peptídeo pro-ilhota Humano que tem um resíduo cisteína C-terminal, em forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

HIP2Cys (lle-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (SEQ ID NO: 10)) é um Peptídeo pro-ilhota

Humano que tem um resíduo cisteína C-terminal, em forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

Peptídeo INGAPCys ou INGAPCys é um Peptídeo INGAP que tem um resíduo cisteína C-terminal, em forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

HIP3CysDimer (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)₂ (SEQ ID NO: 11)) é um dímero peptídeo pro-ilhota humano onde cada monómero foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante. O dímero forma-se através da criação de uma ligação de dissulfureto entre os resíduos cisteína dos monómeros individuais (comparativa).

HIP1CysDimer (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys)₂ (SEQ ID NO: 12)) é um dímero peptídeo pro-ilhota humano onde cada monómero foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante. O dímero forma-se através da criação de uma ligação de dissulfureto entre os resíduos cisteína dos monómeros individuais (comparativa).

HIP2CysDimer (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)₂ (SEQ ID NO: 13)) é um dímero peptídeo pro-ilhota humano onde cada monómero foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante. O dímero forma-se através da criação de uma ligação de dissulfureto entre os resíduos cisteína dos monómeros individuais. HIP2 tem um peso molecular de cerca de 1435.5 (comparativa).

INGAPCysDimer é um dímero peptídeo INGAP em que cada monómero foi modificado para incluir um resíduo cisteína N-

terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

HIP3CysBlocked (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH₂) (SEQ ID NO: 14)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal e foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante.

HIP1CysBlocked (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂) (SEQ ID NO: 15)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal e foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante.

HIP2CysBlocked (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂) (SEQ ID NO: 16)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal e foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante.

INGAPCysBlocked é peptídeo INGAP que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal e foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante.

HIP3CysBlockedDimer (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH₂)₂ (SEQ ID NO: 17)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal e foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma

purificada, sintética ou recombinante. O dímero forma-se através da criação de uma ligação de dissulfureto entre os resíduos cisteína dos monómeros individuais.

HIP1CysBlockedDimer (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂)₂ (SEQ ID NO: 18)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal e foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante. O dímero forma-se através da criação de uma ligação de dissulfureto entre os resíduos cisteína dos monómeros individuais.

HIP2CysBlockedDimer ou HIP2B Cys Dimer (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂)₂ (SEQ ID NO: 19) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal e foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante. O dímero forma-se através da criação de uma ligação de dissulfureto entre os resíduos cisteína dos monómeros individuais. HIP2B Cys Dimer tem um peso molecular de cerca de 3157,5.

INGAPCysBlocked Dimer é um Dímero de Peptídeo INGAP que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal e foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, na forma purificada, sintética ou recombinante. O dímero forma-se através da criação de uma ligação de dissulfureto entre os resíduos cisteína dos monómeros individuais.

HIP3CysPEG (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys(PEG)) (SEQ ID NO: 20) é um peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um

resíduo cisteína C-terminal ao qual foi unido de forma covalente um constructo de dímero maleimida ativado 40Kd PEG, na forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

HIP1CysPEG (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)) (SEQ ID NO: 21) é um peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal ao qual foi unido de forma covalente um constructo de dímero maleimida ativado 40Kd PEG, na forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

HIP2CysPEG (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)) (SEQ ID NO: 22) é um peptídeo pro-ilhota humano que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal ao qual foi unido de forma covalente um constructo de dímero maleimida activado 40Kd PEG, na forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

INGAPCysPEG é Peptídeo INGAP que foi modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal ao qual foi unido de forma covalente um constructo de dímero maleimida ativado 40Kd PEG, na forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

HIP3CysBlockedPEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys(PEG)-NH₂) (SEQ ID NO: 23)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, e modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal ao qual foi unido de forma covalente um constructo de dímero maleimida ativado 40Kd PEG, na forma purificada, sintética ou recombinante.

HIP1CysBlockedPEG (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)-NH₂) (SEQ ID NO: 24)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, e modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal ao qual foi unido de forma covalente um constructo de dímero maleimida ativado 40Kd PEG, na forma purificada, sintética ou recombinante.

HIP2CysBlockedPEG ou HIP2B Cys-PEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)-NH₂) (SEQ ID NO: 25)) é um Peptídeo pro-ilhota humano que foi bloqueado com um grupo acetil N-terminal e um grupo amida C-terminal, e modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal ao qual foi unido de forma covalente um constructo de dímero maleimida ativado 40Kd PEG, na forma purificada, sintética ou recombinante. HIP2B Cys(PEG) tem um peso molecular de cerca de 44,782.

INGAPCysBlocked PEG é Peptídeo INGAP que foi bloqueado com um grupo acetil C-terminal e um grupo amida N-terminal, e modificado para incluir um resíduo cisteína C-terminal ao qual foi ligado um constructo de dímero maleimida ativado 40Kd PEG, na forma purificada, sintética ou recombinante (comparativa).

REG3G é um precursor 3 gama de proteína derivada de ilhota regenerante humana com a sequência
MLPPMALPSVSWMLLSCILLCQVQGEETQKELPSPRISCPKGSKAYGSPCYALFLSPKS
WMDADLACQKRPSGKLVSVLSGAEGSFVSSLVRSISNSYSYIWIGLHDPTQGSEPDGDG
WEWSSTDVMNYFAWEKNPSTILNPGHCGSLSRSTGFLKWKDYNCDALCLPYVCKFKD (SEQ ID NO: 28).
O peptídeo REG3G é um peptídeo precursor 3 gama de proteína derivada de ilhota regenerante humana derivado de REG3G com a sequência IGLHDPTQGSEPDG (SEQ ID NO: 29). Outros peptídeos REG3G são
WIGLHDPTQGSEPDG (SEQ ID NO: 58) e

IGLHDPTQGSEPDGD (SEQ ID NO: 59).

As formas de realização da presente descrição providenciam estratégias detalhadas para otimizar a estabilidade e solubilidade de peptídeos pro-ilhota, incluindo HIP, para utilização melhorada como agente terapêutico. HIP é um fragmento de peptídeo da proteína alfa 3 derivada de ilhota regenerante humana (REG3A) (NM_138937.1), também conhecida como precursor da proteína associada à pancreatite (NP-002571) localizada no cromossoma 2, local 2p12, posição 79240075 (SEQ ID NO: 1). O HIP3, HIP1 e HIP2 reduzem ou estimulam a neogénese da ilhota das células progenitoras residentes no pâncreas. Estes agentes de neogénese usados de acordo com os métodos da atual descrição resultam em formas otimizadas de peptídeos pro-ilhota, incluindo HIP, os quais demonstram melhor estabilidade *in vivo*, solubilidade e eficácia quando usados como agente terapêutico para tratar doenças. Estas doenças incluem, mas não estão limitadas a diabetes mellitus (diabetes tipo 1), diabetes tipo 2 (diabetes mellitus não dependente da insulina e surgimento de diabetes no adulto que necessite de insulina, diabetes na infância e adolescência) e Diabetes Autoimune Latente em Adultos (LADA).

As formas de realização da invenção também providenciam composições farmacêuticas e terapias para o tratamento de disfunção pancreática, incluindo diabetes tipo 1 e 2, com tais composições. Numa forma de realização, estas composições compreendem Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP otimizado, como definido na reivindicação 1. Em outras formas de realização, estas composições incluem Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado e outros agentes que afetam o metabolismo da glicose. Incluídos entre estes outros agentes estão agentes que

estão envolvidos na neogénese de ilhota pancreática e agentes que inibem, bloqueiam ou destroem as células autoimunes que têm como alvo as células de ilhota pancreática. Numa forma de realização, as terapias aqui descritas são praticadas ao administrar uma dose terapêuticamente eficaz e Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, a um mamífero com necessidade de tal terapia. Numa outra forma de realização, as terapias descritas aqui são praticadas ao administrar uma dose terapêuticamente eficaz de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, a um mamífero com necessidade de tal terapia em combinação com outro agente (tal como uma hormona ou composto), que afeta o metabolismo da glicose, incluindo mas não limitado a hormonas ou compostos que são envolvidos em regeneração de células beta, saciedade e esvaziamento gástrico, tal como GLP-1, GIP, análogos de recetores GLP-1, que evitam a destruição de GLP-1 e agentes que inibem, bloqueiam ou destroem as células autoimunes que têm como alvo as células pancreáticas. Nesta última forma de realização, o HIP Otimizado e o outro agente podem ser administrados separadamente ou podem, em primeiro lugar, ser misturados para providenciar uma composição de combinação e administrados simultaneamente.

A análise de microarranjo (do inglês, microarray) de expressão de genes em ratos NOD mostrou a supra-regulação de genes REg especificamente em neogénese de ilhota. Adicionalmente, os genes Reg são conhecidos por supra-regular no desenvolvimento fetal tardio para popular o pâncreas de um humano em desenvolvimento para manter o seu metabolismo de glicose pós-parto. A co-transplantação de tecido fetal com células epiteliais pancreáticas não-endócrinas (NEPEC) mostrou resultar na estimulação de novas estruturas de ilhota da população NEPEC. A supra-regulação

de Reg no material fetal co-transplantado foi provavelmente o estímulo para este efeito.

Os estudos *in vivo* mostraram que HIP1, HIP2 e HIP3, quando introduzidos nos ratos diabéticos, estimularam a diferenciação das células progenitoras dentro do pâncreas para as novas estruturas de ilhotas.

Apesar de eficazes na neogénese de estruturas de ilhotas, permanece a necessidade de otimizar os peptídeos pro-ilhota, incluindo variantes HIP, de modo a melhorar a sua solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade para administração como agentes terapêuticos. As modificações aos peptídeos pro-ilhota, incluindo variantes HIP, que irão diminuir as suas hipóteses de degradação por protease, irão aumentar a sua eficácia reduzindo deste modo a necessidade de dosagem para um efeito terapêutico positivo. Estas modificações resultam no que foi denominado como "Peptídeos pro-ilhota otimizados" ou "HIP Otimizado".

Numa forma de realização, os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, são providenciados pela presente descrição na forma purificada, sintética ou recombinante e são úteis para administração como aqui divulgado para induzir a neogénese de ilhota pancreática.

Adicionalmente, os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, podem ser guardados de forma estável durante longos períodos de tempo. O HIP Otimizado é estável durante meses quando guardado a 20 °C em soro isotónico.

Numa forma de realização específica, os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, são

funcionalmente hiperativos, capazes de exibir maior atividade de uma ou mais das atividades funcionais associadas a REG3A, outros peptídeos HIP e homólogos HIP não humanos, tais como hamster INGAP.

Devido à degeneração das sequências de codificação de nucleótidos, uma variedade de sequências de ADN, as quais codificam as mesmas sequências de aminoácidos ou semelhantes como os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP otimizado, pode ser usada na prática da presente invenção para preparar os vetores de expressão para a produção de Peptídeos pro-ilhota otimizados recombinantes, incluindo variantes de HIP Otimizados. Estas incluem, mas não são limitadas a, sequências de ácido nucleico compreendendo todos ou porções dos Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP otimizado, que são alterados pela substituição de diferentes códons que codificam o mesmo resíduo aminoácido ou um funcionalmente equivalente dentro da sequência, produzindo deste modo uma carga silenciosa. Os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizados, incluindo HIP Otimizado, e derivados do mesmo incluem, mas não estão limitados àqueles que contêm, como sequência primária de aminoácido, todas ou partes das sequências de aminoácidos de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo variantes de HIP Otimizado, incluindo sequências alteradas nas quais os resíduos funcionalmente equivalentes são substituídos por resíduos dentro da sequência que resulta numa alteração silenciosa. Por exemplo, um ou mais resíduos aminoácidos dentro da sequência podem ser substituídos por outro aminoácido de polaridade similar que aja como um equivalente funcional, resultando numa alteração silenciosa. Os substitutos para um aminoácido dentro da sequência podem ser selecionados de outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por

exemplo, os aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Os aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina. Os aminoácidos carregados positivamente (básico) incluem arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos carregados negativamente (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. Os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo derivados de HIP Otimizados, também incluem, mas não estão limitados àqueles contendo, como sequência de aminoácido primária, toda ou parte da sequência de aminoácido do peptídeo pro-ilhota, incluindo HIP, incluindo sequências alteradas nas quais os resíduos aminoácidos são substituídos por resíduos com propriedades químicas similares. Em formas de realização específicas, 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos de HIP Otimizado são substituídos resultando em análogos e/ou derivados de HIP Otimizado.

Também são descritas proteínas quiméricas ou de fusão. Como aqui utilizado, uma "proteína quimérica" ou "proteína de fusão" compreende Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, ou um análogo ou derivado do mesmo ligado operativamente a um peptídeo não pro-ilhota ou polipeptídeo HIP ou um análogo ou derivado dos mesmos. Dentro das proteínas de fusão, o Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP e os polipeptídeos não pro-ilhota ou HIP são "operativamente ligados", isto é, são fundidos *in-frame* entre si. Os polipeptídeos não pro-ilhota ou HIP podem ser fundidos ao N-terminal ou C-terminal do Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP. Por exemplo, a proteína de fusão pode ser HIP Otimizado contendo uma sequência de sinal heteróloga no seu N-terminal. Em certas células hospedeiras (por exemplo, células hospedeiras mamíferas), a expressão e/ou segregação

de HIP Otimizado ou um análogo ou derivado do mesmo pode ser aumentada através da utilização de uma sequência de sinal heterólogo. Ainda em outro exemplo, a proteína de fusão é uma proteína de fusão imunoglobulina HIP Otimizado, na qual a sequência HIP Otimizado é fundida com sequências derivadas de um membro de uma família de proteína de imunoglobulina. A proteína de fusão de imunoglobulina HIP Otimizado pode ser incorporada em composições farmacêuticas e administrada a um paciente para inibir uma resposta imunológica de acordo com a presente descrição.

Os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, para utilização como aqui descrito, podem ser quimicamente modificados para o efeito de melhorar a biodisponibilidade e/ou aumentar a eficácia, solubilidade e estabilidade. Por exemplo, a proteína pode ser ligada de forma covalente ou não covalente a partes de albumina, transferina ou polietilenoglicol (PEG) adicional.

Os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizados, para utilização como aqui debatido, podem ser reproduzidos através de técnicas de ADN recombinante padrão de acordo com os ensinamentos aqui e conhecidos na técnica. Por exemplo, a codificação de fragmentos de ADN para diferentes sequências de polipeptídeos pode ser ligada em conjunto *in-frame* de acordo com técnicas convencionais, por exemplo, ao utilizar terminais rombos ou colantes para ligação, digestão de enzima de restrição para providenciar o terminal adequado, preenchimento de terminais coesivos como adequado, tratamento de fosfatase alcalina para evitar união não desejada e ligação enzimática. Além disso, o gene de fusão pode ser sintetizado através de técnicas convencionais, incluindo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, a amplificação PCR dos

fragmentos do gene pode ser realizada usando iniciadores âncora que são a origem de cadeias secundárias complementares entre dois fragmentos de genes consecutivos que podem subsequentemente ser anelados e reamplificados para gerar uma sequência de gene quimérico. Adicionalmente, estão comercialmente disponíveis muitos vetores de expressão que já codificam uma parte de fusão (por exemplo, um polipeptídeo GST). Um ácido nucleico de codificação HIP Otimizado pode ser clonado num vetor de expressão de modo que a parte de fusão seja ligada *in-frame* para HIP Otimizado. A proteína de fusão pode ser um HIP Otimizado fundido num marcador His ou marcador epítope (por exemplo, V5) para ajudar na purificação e detecção do HIP Otimizado recombinante, ou para mascarar a resposta imune num paciente. As sequências de aminoácido curtas de HIP otimizado tornam também a produção sintética destes valiosos peptídeos prontamente praticável, e uma variedade de instrumentos automatizados para síntese de peptídeos está comercialmente disponível, e os métodos sintéticos para a síntese de peptídeos não requerendo automação são já conhecidos e podem ser usados de acordo com os ensinamentos aqui indicados para preparar HIP Otimizado.

Em algumas formas de realização, os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP Otimizado, podem ser modificados de modo que tenham uma semivida prolongada *in vivo* usando quaisquer métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os fragmentos Fc do IgG humano ou moléculas de polímero inerte, tais como polietilenoglicol (PEG) de elevado peso molecular podem ser ligados ao HIP Otimizado com ou sem um ligador multifuncional através de conjugação específica do local do PEG ao N-terminal ou C da proteína ou através dos grupos amino ípsilon presentes nos resíduos de lisina. A derivação linear ou ramificada que resulta em perda mínima

de atividade biológica será utilizada. O grau de conjugação pode ser monitorizado de perto por SDS-PAGE e espectrometria de massa para garantir uma conjugação adequada das moléculas PEG com HIP Otimizado. O PEG que não reagiu pode ser separado dos conjugados PEG-HIP Otimizado através de exclusão de tamanho ou por cromatografia de troca de iões. Os conjugados de PEG derivatizados podem ser testados em termos de eficácia *in vivo* usando métodos conhecidos daqueles com competência na técnica.

As formas de realização da presente invenção providenciam formulações de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo formulações de HIP Otimizado, e Pro-ilhota otimizada com base em HIP para utilização no tratamento da diabetes e várias outras indicações envolvendo função pancreática diminuída.

Numa forma de realização, um peptídeo pro-ilhota é otimizado através da adição de um grupo amida C-terminal e um grupo acetil N-terminal, bloqueando deste modo eficazmente a atividade proteolítica por essas proteases que reconhecem e degradam extremidades livres de peptídeos no soro e resultando nos compostos de Peptídeos pro-ilhota otimizados.

Numa forma de realização, HIP3, HIP1 e/ou HIP2 é otimizado pela adição de um grupo amida C-terminal e um grupo acetil N-terminal bloqueando deste modo eficazmente a atividade proteolítica dessas proteases que reconhecem e degradam as extremidades livres dos peptídeos no soro e resultando nos compostos HIP Otimizado HIP3Blocked (SEQ ID NO: 5), HIP1Blocked (SEQ ID NO: 6) e HIP2Blocked (SEQ ID NO: 7), respetivamente. Estes grupos de bloqueio adicionados foram preparados por Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPPS). A

premissa fundamental da síntese em fase sólida é que os aminoácidos podem ser unidos num peptídeo de qualquer sequência, se desejado, enquanto uma extremidade da cadeia é ancorada num suporte insolúvel. Como acima mencionado, na SPPS prática, o terminal de carbono do peptídeo está ligado ao polímero. Após a sequência desejada de aminoácidos ter sido ligada em conjunto ao suporte, o reagente pode ser aplicado para clivar a cadeia de peptídeo do suporte e libertar o peptídeo bruto na solução. Todas as reações envolvidas na síntese são realizadas até à conclusão caso possível, de modo a que o produto homogéneo possa ser obtido.

Quando o C-terminal de um peptídeo foi uma amida, o derivado é uma amida peptídica. As amidas peptídicas são derivados extremamente importantes, uma vez que muitas hormonas peptídicas naturalmente ocorrentes estão presentes como a amida. Para sintetizar as amidas peptídicas, foram desenvolvidas resinas de fase sólida que resultam em amidas peptídicas diretamente após clivagem. Quando o N-terminal é um grupo acetil, o peptídeo é unido ao C-terminal para o N-terminal. O N-terminal é então acetilado usando anidrido acético na presença de uma base.

O Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP pode ser usado para tratar qualquer mamífero, incluindo humanos e animais, que sofrem de uma doença, sintoma ou condição relacionada com uma produção ou segregação diminuída de insulina devido à perda de ou função celular beta diminuída ou necessidade de maior produção de insulina que pode ser providenciada para o sujeito através de diferenciação de novas estruturas de ilhota das células progenitoras utilizando compostos HIP Otimizado e métodos de tratamento. Tais doenças e condições incluem diabetes mellitus tipo 1, diabetes tipo 2, pré-

diabetes, glicemia de jejum alterada, hiperinsulinemia de jejum, incluindo mas não limitado a pacientes com diabetes tipo 1a ou pacientes com Diabetes Autoimune Latente em Adulto que podem manifestar anticorpos (anticorpos anti-GAD65, anticorpos anti-ilhota, ou anticorpos anti-insulina) ou aqueles pacientes com diabetes tipo 1 com deficiência de insulina sem autoimunidade dirigida para as células beta (diabetes tipo 1b). Além disso, as formas de realização da presente descrição podem ser realizadas com benefícios terapêuticos para pacientes recém-diagnosticados como tendo diabetes tipo 1, os irmãos e familiares de primeiro grau de pacientes com diabetes tipo 1 e pessoas com anticorpos positivos e outras condições autoimunes que indicam uma predileção da diabetes tipo 1. Numa forma de realização, os peptídeos aqui descritos são providenciados para inverter a diabetes tipo 1 num paciente com necessidade de tal tratamento.

As terapias de combinação e composições relacionadas podem também ser utilizadas como terapias adjuntas à terapia da insulina em diabetes tipo 1 em crianças e adultos, para melhorar as alterações de glicose em pacientes com diabetes, e em pacientes com diabetes não controlada, hipoglicemia não conhecida e hipoglicemia recorrente em diabetes tipo 1.

O Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP e composições relacionadas podem ser usados para tratar pacientes com diabetes tipo 2 recém-diagnosticada, diabetes tipo 2 em crianças e adultos com hiperglicemia, diabetes tipo 2 sendo concorrentemente tratada com insulina, diabéticos orais ou outras terapias diabéticas subcutâneas e diabetes tipo 2 não controlada. Em alguns pacientes, crianças e adultos, as composições aqui descritas podem inverter a diabetes tipo 1

e 2. As composições aqui descritas podem também ser usadas para tratar crianças e adultos com formas atípicas de diabetes e pacientes com as condições de hiperglicemia pós-prandial.

Os Peptídeos pro-ilhota otimizados ou HIP e composições relacionadas também podem ser usados para tratar pacientes que são crianças, bem como, pacientes adultos, em necessidade de perda de peso, redução de triglicéridos, colesterol LDL, incluindo, mas não limitado a conseguir perda de peso ou tratar a obesidade, excesso de peso em paciente com diabetes, bem como aqueles que não têm diabetes tipo 1 ou 2. Numa forma de realização, as composições aqui descritas são usadas para tratar um paciente com obesidade mórbida. Em outras formas de realização, as composições aqui descritas são usadas para tratar um paciente com obesidade mórbida ou pacientes com anorexia, bulimia ou outros distúrbios alimentares.

As terapias otimizadas de agente único e composições relacionadas podem também ser usadas para tratar crianças e adultos com síndrome dismetabólico ou síndrome metabólica, bem como pacientes que exibem as condições de síndromes de dor neuropática secundária para metabolismo de glicose alterado, e aqueles com hipertrigliceridemia com ou sem diabetes, e hiperglicemia pós-prandial. Numa forma de realização, estes peptídeos são providos para tratar síndrome de ovários policísticos numa paciente com necessidade do mesmo.

Outros pacientes que podem beneficiar do Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP incluem crianças e pacientes adultos diagnosticados como tendo distúrbios, tais como hiperglicemia de jejum, pré-diabetes, glicemia em jejum

diminuída, tolerância à glicose diminuída e condições hiperglicémicas no geral.

O Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP e composições relacionadas podem também ser usados para tratar pacientes com síndromes de dor neuropática e neuropatia, não obstante se o paciente é diagnosticado como diabético.

O Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP e composições relacionadas podem também ser usados para tratar pacientes com pancreatite recorrente ou cancro pancreático e podem ser usados em todas as modalidades com o objetivo de atingir novas estruturas de ilhota derivadas das células progenitoras no pâncreas.

Numa forma de realização, o agente que estimula as diferenciação de ilhotas das células progenitoras pancreáticas em estruturas de ilhotas que produzem insulina selecionadas do Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP. Numa outra forma de realização, a combinação de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, e outro agente para estimular a neurogénese celular de ilhota. Este agente adicional pode ser, por exemplo, amilina e/ou um análogo, incluindo mas não limitado a Pramlintide (SYMLIN™), análogos de recetor GLP-1, exendina-4 (EXENATIDE™), Liraglutido (NN2211), GLP-1, GIP, análogos de GLP-1, GLP-1, hamster INGAP, outras hormonas miméticas da incretina, e/ou compostos e agentes de ação similar e agentes que estendem a semivida ou aumentam o nível ou atividade de qualquer um dos compostos e agentes acima, tais como, por exemplo, inibidores da dipeptidil peptidase, que atrasam a degradação de GLP-1. Existem vários miméticos de GLP-1, que atuam através de atividade agonista direta nos recetores GLP-1 ou ao inibir a degradação de GLP-1. Estes agentes são

úteis em certas formas de realização da presente descrição. Os miméticos de GLP-1 podem ser usados em conjunto com HIP e/ou imunoterapia indicada para o tratamento da diabetes tipo 1, e, podem ser usados para melhorar o controle glicémico, aumentar a saciedade, atrasar a absorção de glicose no intestino e levar a uma inversão dos mecanismos subjacentes resultando em diabetes tipo 1. Estes agentes podem evitar a progressão de tolerância de glicose diminuída em diabetes; evitar pré-diabetes, progressão da glicemia em jejum diminuída para tolerância à glicose diminuída e diabetes; inverter diabetes tipo 2 recém-diagnosticada; tratar diabetes tipo 2 e tratar ou evitar o excesso de peso, obesidade, síndrome de ovário policístico e síndromes de dor neuropática.

Agentes e formulações farmacêuticas úteis na prática da presente invenção para conseguir diferenciação de ilhota pancreática das células progenitoras no pâncreas adulto e inclui aquelas descritas para outros efeitos nas seguintes referências, cada uma das quais é aqui incorporada como referência: Rosenberg et al., 1992, Adv. Exp. Med. Biol. 321: 95-104; Mar. 1996, Diabetologia 39(3):256-62; Jul. 1996, Pancreas 13(1):38-46; e Nov. 2004, Ann. Surg. 240(5):875-84; Viniket al., Jun. 1997, Horm. Metab. Res. 29(6):278-93. A estimulação bem-sucedida da regeneração de ilhota ou diferenciação de células progenitoras pancreáticas pode ser mostrada através da produção melhorada e/ou segregação de insulina num paciente.

Numa forma de realização, a amilina ou um análogo de amilina tal como Symlin™ ou Pramlintide é utilizada antes da administração ou em administração concomitante com HIP Otimizado. A amilina pode ser administrada antes da regeneração de ilhotas e continuada através do período de

administração de regeneração de ilhotas, de acordo com os ensinamentos da referência Young et al, 1997, Curr Opin. Endocrin. Diabetes 4: 282-290. Numa forma de realização, a amilina e/ou um análogo, incluindo mas não limitado a pramlintida, é administrada de forma subcutânea para otimizar o controlo glicémico antes da iniciação do HIP Otimizado e pode então estar e ser usado isoladamente ou em conjunto com outras ilhotas que estimulam os peptídeos, tal como HIP Otimizado ou um HIP Otimizado. Numa forma de realização, a amilina ou pramlintida é doseada a 0,3 - 0,8 microgramas por quilograma de peso do paciente. Numa forma de realização, esta dose é administrada de forma subcutânea antes das refeições, por exemplo, QHS e 3 da manhã. Numa forma de realização, a dose terapêutica eficaz é administrada subcutaneamente ou através de um dispositivo/bomba de infusão e/ou um sistema transdérmico, intranasal, bocal, micro-agulha ou encapsulamento oral. Em outra forma de realização, a dose terapeuticamente eficaz é administrada utilizando formulações de libertação prolongada, necessitando de administração por injeção ou outro método de administração não mais frequentemente do que uma vez por semana, uma vez a cada 2 semanas ou uma vez por mês. Como acima notado, em algumas formas de realização, a amilina ou pramlintida é coadministrada com outro agente de estimulação de ilhotas.

Numa forma de realização, o análogo de recetor GLP-1, incluindo exendina-4 ou um análogo de exendina-4 é utilizado no método com HIP Otimizado em doses de 5-10 mcg com refeições. A Exendina-4 pode ser formulada e administrada para efeitos da presente descrição de acordo com os ensinamentos das seguintes referências: Alcantara et al., 1998, Cell Biochem. Funct. 16(1): 51-6; Dupre et al., 2004, J. Clin. Endocrin. Metab. 89(7): 3469-73; Edwards et

al., 1999, Diabetes 48: 86-93; e Xu et al., 1999, Diabetes 48: 2270-76. Numa forma de realização, a exendina-4 é doseada no intervalo de 5-10 microgramas antes das refeições. Numa forma de realização, a exendina-4 é administrada subcutaneamente isolada ou em conjunto com HIP Otimizado e/ou outros peptídeos estimulantes de ilhota. Numa forma de realização, a dose terapeuticamente eficaz é administrada subcutaneamente. Numa outra forma de realização, a administração de exendina-4 é através de sistemas de administração transdérmica, bucal, de encapsulamento oral, intranasal, micro-agulha. Em outra forma de realização, a dose terapeuticamente eficaz é contida numa formulação de libertação prolongada que não requer administração mais frequentemente do que uma vez por semana, uma vez a cada 2 semanas ou uma vez por mês. Numa forma de realização, a exendina-4 é coadministrada com HIP Otimizado ou outra neogénese de célula de ilhota ou agente de transformação de célula progenitora entre pacientes com diabetes tipo 1 ou 2, ou aqueles com obesidade, excesso de peso, síndrome de resistência à insulina, glicemia de jejum alterada, pré-diabetes, síndrome de ovários policísticos, síndrome metabólica ou distúrbios alimentares.

O GIP e o GLP-1 pertencem à família da incretina das hormonas de crescimento (consultar as referências Creutzfeldt, 1979, Diabetologia 16:75-85; Creutzfeldt and Ebert, 1985, Diabetologia 28:565-573; Holst et al., 2001, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 234: 75-85; e Vilsboll et al., Jun. 2003, J. Clin. Endocrin. Metab. 88(6) :2706-13), e numa forma de realização, uma hormona incretina ou análogo com ou sem a utilização concomitante de HIP Otimizado é utilizada no método para estimular diferenciação em ilhotas das células progenitoras no pâncreas adulto.

Em várias formas de realização, o GIP ou um análogo de GIP é utilizado com Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP. O GIP pode ser formulado e administrado para efeitos da presente descrição de acordo com os ensinamentos das seguintes referências Andersen et al., 1978, J. Clin. Invest. 62: 152-161; Creutzfeldt et al., Feb. 1980, Diabetes 29(2): 140-5; Dupré et al., 1973, J. Clin. Endocrin. Metab. 37: 826-828; Ebert et al., 1980, Clinical Gastroenterology 9(3): 679-98; Elahi et al., 1979, Am. J. Physiol. 237: E185-E191, and 1994, Regulatory Peptide 51(1): 63-74; Krarup et al., Jun. 1983, J. Clin. Endocrin. Metab. 56(6):1306-12; Krarup et al., 1987, Metabolism 36(7): 677-82; Krarup et al., 1988, Acta Med. Scand. 223(5):437-41; Lynn et al., 2003, FASEB 17:19-93; Meir et al., 2002, Regulatory Peptides 107:1-3; e Nauk et al., 1993, J. Clin. Endocrin. Metab. 76(4): 912-7.

Numa forma de realização, o GIP é administrado via intravenosa ou subcutânea em combinação com Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, e doseado a 2-10 nanogramas por quilograma de peso do paciente para providenciar uma infusão contínua de 30 minutos por via intravenosa ou subcutânea, com um tempo de administração de 3-5 minutos antes das refeições, antes de deitar e com início às 3 da manhã. Numa forma de realização, o GIP é administrado subcutaneamente antes das refeições, QHS ou 3 da manhã. Numa forma de realização, o GIP é administrado oralmente ou usando um dispositivo de infusão ou sistemas de administração transdérmica, bucal, intranasal ou micro-agulha. Ainda em outra forma de realização, a formulação de libertação prolongada não requer administração mais frequentemente do que uma vez por semana, uma vez a cada 2 semanas ou uma vez por mês. As composições adequadas para administrar GIP são descritas para outros efeitos na

referência Jones et al., 6 Nov. 1989, Diabetes Res Clin. Pract. 7(4):263-9.

Em várias formas de realização, o GLP-1 ou um análogo, ou um agonista recetor GLP-1 ou um inibidor da dipeptidil peptidase-4 é utilizado em combinação com Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, no método para estimular diferenciação de ilhotas das células progenitoras, GLP-1, agonistas recetores GLP-1, análogos de GLP-1 e inibidores DPP-4 podem ser formulados e administrados para efeitos da presente descrição de acordo com os ensinamentos das seguintes referências: Elahi et al., 1994, Regulatory Peptides 51(1): 63-74; Gutniak et al., 1994, Diabetes Care 17:1039-44; Kreymann et al., 1987, Lancet 2: 1300-1304; Larsen et al., 1996, Diabetes 45(Suppl. 2):233A (Abstract); Larsen et al., 2001, Diabetes Care 24(8): 1416-21; List et al., 2004, Am. J. Physiol. Endocrin. Metab. 286(6): E875-81; Lugari et al., 2000, Horm. Metab. Res. 32: 424-428; Marquez et al., Mar. 1998, Cell. Biochem. Funct. 16(1):51-6; Meier et al., March 2004, Critical Care Medicine 32(3):848-851; Meneilly et al., 2003, Diabetes Care 26: 2835-41; Nauk et al., 1996, Diabetologia 39(12):1546-53; Thorens et al., Dec. 1995, Diabetes Metab. 21(5):311-8; Vilsboll et al., 2003, J. Clin. Endocrin. Metab. 88(6): 2706-13; Wang et al., 1997, J. Clin. Invest. 99: 2883-2889; and Zander et al., 2002, Lancet 359: 824-30.

Em várias formas de realização, o GLP-1, um agonista recetor GLP-1 ou um análogo GLP-1 é administrado subcutaneamente ou os inibidores DPP-4 são administrados oralmente em combinação com Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, e doseados no intervalo de 400-800 mg por dia a 8-20 mg por quilograma de peso do paciente. Numa forma de realização, o GLP-1 é administrado oralmente ou

subcutaneamente antes das refeições, QHS. Numa forma de realização, o GLP-1 é administrado usando um dispositivo de infusão subcutânea contínuo a uma taxa de 1-30 ng/quilograma de peso corporal/minuto via sistema transdérmico, bucal ou micro-agulha para providenciar uma infusão contínua de 30 minutos com um tempo de administração intravenosa ou subcutânea tendo início 3-5 minutos antes das refeições, antes do deitar e início às 3 da manhã. Ainda em outra forma de realização, a formulação de libertação prolongada não requer administração mais frequentemente do que uma vez por semana, uma vez a cada 2 semanas ou uma vez por mês.

Numa forma de realização, o Liraglutido (NN2211) é administrado subcutaneamente em combinação com Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, em doses de 10-40 microgramas por peso de corpo em quilogramas. Numa forma de realização, o Liraglutido é administrado subcutaneamente antes das refeições, QHS ou 3 da manhã. Em outra forma de realização, o Liraglutido é administrado usando um dispositivo de infusão ou um sistema transdérmico, bucal ou micro-agulha para providenciar uma infusão contínua de 30 minutos com um tempo de administração intravenosa ou subcutânea tendo início 3-5 minutos antes das refeições, antes do deitar e início às 3 da manhã. Ainda em outra forma de realização, a formulação de libertação prolongada não requer administração mais frequentemente do que uma vez por semana, uma vez a cada 2 semanas ou uma vez por mês.

Numa forma de realização das terapias de combinação, o Liraglutido ou NN2211 é administrado numa dose de cerca de 20 microgramas por kg de peso do paciente, diariamente, em combinação com Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP. Esta dose irá providenciar aos pacientes a capacidade

de reduzir o bolus de insulina antes das refeições em 10-20%, com flutuações reduzidas e glicose, glucagon e triglicéridos pós-prandiais diminuídos. A administração de Liraglutido de acordo com os métodos aqui descritos pode ser usada para melhorar o controlo glicémico, como medido, por exemplo e sem limitação, por hemoglobina A1C, na diabetes tipo 1; para evitar o progresso de tolerância à glicose diminuída na diabetes; para evitar o progresso de glicemia de jejum alterada para tolerância à glicose diminuída e diabetes; para inverter diabetes tipo 2 recém-diagnosticada; e para tratar diabetes tipo 2.

Numa forma de realização da terapia de combinação, o Liraglutido ou NN2211 é administrado numa dose de cerca de 20 microgramas por kg de peso do paciente para um paciente adulto de manhã, cerca de 4 horas antes da alimentação, e na hora de deitar durante 3 semanas consecutivas durante a terapia com Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP. Para pacientes que iniciam o tratamento com níveis de peptídeo C inferiores a cerca de 1,0 ng/ml, os níveis de peptídeo C são monitorizados e quando sobem cerca de 0,5 ng/ml, o anticorpo hOKT3g1 (ala-ala) é administrado durante 12 dias consecutivos.

Nas terapias de combinação, a exendina-4 ou exendina-4 sintética ou outro análogo de GLP-1, agonista recetor GLP-1 ou Inibidor da Dipeptidil Peptidase-4 é administrada antes das refeições isoladamente ou com o Peptídeo pro-ilhota otimizado ou HIP, ou outro agente de diferenciação de ilhota para melhorar o controlo glicémico antes de ou durante o início de terapias de HIP Otimizado. Tais agentes, quando administrados antes de refeições, podem resultar numa redução da necessidade de insulina de, pelo menos, 20% e ajuste adequado de insulina e medicações

diabéticas serão realizadas enquanto o HIP Otimizado é administrado. À medida que o HIP Otimizado e/ou outros agentes são administrados em pacientes tipo 1 e tipo 2, o ajuste cuidado da insulina e outras medicações de diabetes irão ocorrer para proteger contra hipoglicemia à medida que novas células de ilhota são diferenciadas a partir de células progenitoras. Por último, a insulina e medicações para diabetes, incluindo HIP Otimizado, serão reduzidas gradualmente, à medida que o pâncreas é repovoado com novas ilhotas funcionais. Para pacientes que iniciam tratamento com níveis de peptídeos C inferiores a cerca de 1,0 ng/ml, os níveis de peptídeo C são monitorizados e quando são bem acima de 0,5 ng/ml, ocorrerá uma monitorização e ajuste de doses de insulina exógena.

Entre os pacientes com diabetes tipo 1, antes do início dos Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP e/ou outros compostos peptídeos (SYMLIN™, INGAP de hamster, GLP-1, agonistas recetor GLP-1, análogos de GLP-1, inibidores DPP-4 são usados com (antes, durante ou após) terapia imune serão administrados para proteger ilhotas recém-formadas. Por exemplo, o anticorpo hOKT3g1 (ala-ala) é administrado durante 12 dias consecutivos com a sua eficácia demonstrada após o primeiro tratamento até 24 meses, enquanto um anticorpo monoclonal humanizado similar, ChAglyCD3 pode ser administrado durante 6 dias consecutivos, e depois repetido anualmente. O composto GAD65 da Diamyd é administrado em duas injeções subcutâneas, com um mês de intervalo. O DIAPEP277™, uma proteína de choque térmico 60, demonstrou sucesso entre pacientes com diabetes recém-diagnosticada, utilizando injeções subcutâneas de 1 mg com 40 mg de manitol em óleo vegetal no início do estudo, 1 mês e 6 meses. Com base no modulador imune selecionado, a ciclicidade do tratamento será determinada. Em outra forma

de realização, o DIAPEP277™, uma vacina de proteína de choque térmico 60, e vacina IBC-VSO, que é uma forma metabolicamente inativa sintética da insulina concebida para evitar a destruição de células beta pancreáticas, interferência alfa, ou vacinação usando células T reguladoras específicas do antígeno CD4+CD25+ ou um agente similar é usado na terapia de combinação. Em outra forma de realização, os agentes de imunomodulação, incluindo, mas não limitado a, agentes de imunoterapia anti-CD3 e globulina antilinfócito T policlonal, são usados em combinação com HIP Otimizado. Tais agentes também incluem: Sirolimus (Rapamicina), Tacrolimus (FK506), uma proteína de choque térmico 60 (DIAPEP277™), vacina Anti-Descarboxilase do Ácido Glutâmico 65, Micofenolato Mofetil isolado ou em combinação com o agente anti-CD20 Rituximab, Campath-1 H (Anticorpo Anti-CD52) e/ou Vitamina D.

Algumas células autoimunes têm como alvo células beta e têm uma função causativa em algumas doenças e condições tratáveis de acordo com os métodos aqui descritos. Consultar as referências Bach et al., 2001, Ann. Rev. Immun. 19:131-161; Lernmark et al., Endocrin. Metab. Clin. N.Am. 20(3): 589-617; e Mathis et al., Dec. 2001, Nature 414(6865): 792-798.

Os métodos de tratamento anteriores envolvendo a introdução de agentes imunes entre pacientes com diabetes tipo 1, protegem apenas aquelas células de ilhota que ainda não foram destruídas por um ataque imune e não lidam com a necessidade de repovoar o pâncreas com novas estruturas de ilhotas com células beta totalmente funcionais. Estes métodos combinam modulação imune específica e generalizada com o objetivo de reduzir a destruição das células beta e uma metodologia de diferenciação de novas células de

ilhas de células progenitoras dentro do pâncreas adulto.

Os peptídeos da presente descrição podem ser usados com agentes que inibem a atividade de ou bloqueiam ou destroem as células autoimunes que têm como alvo as células beta pancreáticas que produzem insulina, amilina ou glucagon. Tais agentes incluem peptídeos imunomoduladores que param a destruição de células de ilha pancreáticas. Por exemplo, um tal agente é um anticorpo monoclonal que pode atrasar o progresso de perda de células de ilha ou atrasar ou parar o surgimento da diabetes tipo 1. Os anticorpos anti-CD3 constituem uma classe geral de agentes úteis nos métodos aqui descritos. Por exemplo, os anticorpos anti-CD3 adequados para efeitos da presente descrição incluem o anticorpo TRX4 (Ala-Ala e ChAglyCD3) sob desenvolvimento pela TolerRx e o anticorpo humanizado anti-CD3 descrito na referência Herold et al., 30 May 2002, NEJM 346(22): 1692-1698. Numa forma de realização, o anticorpo anti-CD3 humanizado é administrado via intravenosa, 14 dias por ano na dosagem de 1-1,42 µg/kg no dia 1, 5,67 µg /kg no dia 2, 11,3 µg/kg no dia 3, 22,6 µg/kg no dia 4 e 45,4 µg/kg nos dias 5-14. Estas terapias podem ser repetidas anualmente após a utilização 3-6 meses de HIP Otimizado, enquanto a insulina é ajustada à medida que ocorre a formação de novas células de ilha. Durante a fase de tratamento HIP Otimizado, a Vitamina D e a utilização de Pramlintide/Symlin™ podem ser continuadas. Após a descontinuação do Peptídeo pro-ilha otimizado, incluindo HIP, e terapia de insulina, a modulação imune podem ser repetidas anualmente para os anticorpos anti-CD3, apesar de um estudo recente ter descoberto que a sua eficácia continua até 24 meses.

Em outra forma de realização, o composto de imunomodulação

é uma proteína de choque térmico que pode parar ou atrasar a destruição de células de ilhota. Tais proteínas incluem DIAPEP277™, uma proteína de choque térmico sob desenvolvimento pela Develogen AG. Numa forma de realização, o DIAPEP277™ é administrado subcutaneamente ao administrar 1 mg em 40 mg de manitol em óleo vegetal subcutaneamente na linha de base e a um mês, e depois duas vezes em intervalos de 3 meses. Numa forma de realização da terapia de combinação, o Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, é coadministrado com DIAPEP277™ como se segue. O DIAPEP277™ é administrado, em primeiro lugar, subcutaneamente numa dose de cerca de 1 mg, cerca de 30 dias antes do início do Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo terapia com base em HIP. Uma segunda administração de DIAPEP277™ é então realizada aquando (90 dias após a primeira administração) o início da terapia com base em HIP Otimizado.

Em outra forma de realização, o composto imunomodulador é uma Globulina Antilinfócito T Policlonal (ATG). Quatro dosagens de doses ATG são administradas. A primeira dosagem de ATG é 9 mg/kg do peso corporal, de seguida as 3 doses consecutivas de 3 mg/kg serão administradas via intravenosa durante 4 horas. Uma hora antes da primeira administração de ATG, um teste de tolerância cutânea (0,2 ml da solução final) será executado. Numa forma de realização da terapia de combinação, a ATG é administrada antes da utilização do HIP Otimizado. A última dosagem de ATG é administrada um mínimo de 14 dias antes do início do HIP Otimizado. Uma segunda administração de ATG pode ser requerida com base nas medições trimestrais de anticorpos anti-GAD65 e outros marcadores que sugerem ataque autoimune aos 24 meses após o tratamento inicial com ATG. Um tratamento atempado pode ser requerido se existir um aumento significativo em anticorpos

autoimunes diretamente para o pâncreas.

O Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, pode ser administrado via injeção subcutânea, oralmente via vesícula hepática visada, ou outro agente lipossomal, ou via uma infusão subcutânea contínua 24 horas numa dose terapeuticamente eficaz, como acima descrito. Numa forma de realização, a dose diária é cerca de 5 a 20 mg por kg do peso corporal do paciente durante 24 horas. Numa forma de realização, a dose diária é ~600-800 mg. A terapia com base no Peptídeo pro-ilhota otimizado é continuada durante um período 3-6 meses e monitorizada cuidadosamente pela produção do peptídeo C. A imunoterapia será administrada ciclicamente com base no agente imune selecionado. Por exemplo, o DIAPEP277™ é administrado em intervalos de 3 meses durante um total de 6 meses, e será inicialmente administrado 3 meses antes da terapia com base em HIP Otimizado.

Os agentes imunomoduladores úteis nos métodos aqui descritos podem ser formulados, administrados e doseados como conhecido na técnica ou como aqui descrito. As formulações farmacêuticas e protocolos de dosagem e administração para a prática dos métodos aqui descritos são abaixo descritos.

As composições de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, por ex., e sais e esteres farmacêuticamente aceitáveis das mesmas são sinergicamente ou aditivamente eficazes para diferenciar células progenitoras em novas células ilhotas no tratamento da diabetes ou doenças similares quando combinando com vários outros compostos. Estes compostos incluem Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, amilina e/ou um análogo, incluindo mas não limitado por

Symmlin/Pramlintida, GLP-1, agonistas de recetor GLP-1, tais como exendina-4, Liraglutido (NN2211), análogos de GLP-1, inibidores da dipeptidil peptidase-4, GIP, INGAP de hamster, e outras hormonas incretina-miméticas, e/ou compostos que agem de igual modo e agentes, e agentes que prolongam a semivida ou aumentam o nível ou atividade de qualquer um dos compostos acima e agentes, tais como, por exemplo, inibidores da dipeptidil peptidase, que atrasam a degradação de GLP-1, e agentes que inibem, bloqueiam ou destroem as células autoimunes que visam as células beta, incluindo mas limitado a: anticorpos anti-CD3, incluindo hOKT31 (Ala-Ala) e ChAglyCD3, ATG, Sirolimus (Rapamicina), Tacrolimus (FK506), uma proteína de choque térmico 60 (DIAPEP277™), uma vacina Anti-Descarboxilase do Ácido Glutâmico 65 (GAD65), Micofenolato Mofetil sozinho ou em combinação com Daclizumab, o agente anti-CD20 Rituximab, Campath-1 H (Anticorpo Anti-CD52), lisofilina e Vitamina D, vacina IBC-VSO que é uma forma sintética, metabolicamente inativa de insulina concebida para evitar a destruição da célula beta pancreática, e vacinação interferão- α usando células T reguladoras específicas do antígeno CD4+CD25+ ou um agente similar concebido para evitar a destruição de células beta pancreáticas. Nesta última forma de realização, a vacinação interferão- α usando células T reguladoras específicas do antígeno CD4+CD25+ ou um agente similar é usada na terapia de combinação para utilizar células T reguladoras diretamente ou através do uso de imunoterapia anti-CD3.

Os compostos, tais como Sirolimus (Rapamicina), Tacrolimus (FK506), anticorpo TRX4, Anticorpo anti-CD3 humanizado, anticorpo anti-GAD65 da DYAMID™ e DIAPEP277™ são também sinergicamente ou aditivamente eficazes quando adicionadas à utilização de HIP Otimizado ou um agente para diferenciar

as células progenitoras em novas células ilhotas no tratamento da diabetes ou doenças similares.

Uma melhoria num regime terapêutico de fármaco pode ser contida por uma administração combinada de dois agentes com efeito terapêutico, se a interação dos dois ou mais agentes for de tal ordem que o seu efeito combinado reduz a incidência de evento adverso (AE) de cada ou ambos os agentes usados na coterapia. A redução na incidência dos efeitos adversos pode ser um resultado de, por ex., administração de baixas doses de cada ou ambos os agentes usados na coterapia. Por exemplo, se o efeito do fármaco A sozinho for 25% e tiver uma incidência de efeito adverso de 45% quando usado na dose etiquetada; e o efeito do fármaco B sozinho for 25% e tiver uma incidência de efeito adverso de 30% quando usado na dose etiquetada, mas quando os dois fármacos são combinados mais baixo do que as doses etiquetadas de cada, se o efeito geral for 35% e a taxa de incidência adversa for 20%, existe uma melhoria no regime terapêutico do fármaco. As terapias de combinação providas pela presente descrição incluem aquelas tais melhorias de exibição.

Composições Farmacêuticas, Dosagem e Administração

Em formas de realização preferidas, os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP, são administrados numa concentração de cerca de 0,5 a cerca de 5 mg/kg/dia, mais preferencialmente em injeções subcutâneas divididas em humanos. Deste modo, um indivíduo com 60 kg vai potencialmente receber 60 mg/dia divididos em duas a três dosagens de 20 mg administradas após as refeições. Em outras formas de realização preferidas, os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP, podem também ser

administrados via um método de encapsulamento oral com dosagens na ordem de cerca de 0,5 a cerca de 5 mg/kg/dia, preferencialmente oralmente administradas em dosagens divididas após refeições.

Com base nos estudos de intervalo de dosagens (Exemplo 13) utilizando HIP2 e HIP2B Otimizado em variações de dose de 1000 microgramas duas vezes ao dia para 0,1 microgramas por dia administrados via IP a camundongos tornados diabéticos com STZ, o HIP2B pode ser utilizado numa dosagem de aproximadamente 10% daquela de HIP2 e o equivalente de aproximadamente 1 mg/kg comparado à dosagem de 10 mg/kg (600 mg/dia) usada nos ensaios humanos de INGAP derivado de hamster (Figura 23).

Por exemplo, em alguns aspetos, as várias formas de realização são direcionadas para uma composição farmacêutica que compreende um composto, como acima definido, e um portador ou diluente farmacêuticamente aceitável ou uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica que compreende um composto como acima definido.

Os compostos aqui descritos podem ser administrados de forma convencional por qualquer via onde estejam ativos. A administração pode ser sistémica, tópica ou oral, por exemplo, a administração pode ser, mas não é limitado a parenteral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, oral, bocal, ou vias oculares, ou intravaginalmente, por inalação, por injeções *depot* ou por implantes. Deste modo, os modos de administração para os compostos da presente descrição (sejam sozinhos ou em combinação com outros farmacêuticos) podem ser, mas não são limitados a, sublingual, injetável

(incluindo de curta duração, *depot*, implante e formas de grânulos injetados subcutaneamente ou intramuscularmente), ou por uso de cremes vaginais, supositórios, pessários, anéis vaginais, supositórios retais, dispositivos intrauterinos e formas transdérmicas, tais como adesivos e cremes.

Os modos específicos de administração vão depender da indicação. A seleção da via específica de administração e o regime de dose devem ser ajustados ou titulados por um médico de acordo com os métodos conhecidos do médico para obter a resposta clínica ótima. A quantidade do composto a ser administrado é aquela quantidade que é terapeuticamente eficaz. A dosagem a ser administrada vai depender das características do sujeito a ser tratado, por ex., o animal particular tratado, idade, peso, saúde, tipos de tratamento concorrente, se algum, e frequência de tratamentos, e pode ser facilmente determinada por um especialista na técnica (por ex., por um médico).

As formulações farmacêuticas que contêm os compostos da presente descrição e um portador adequado podem ser formas de dosagem sólida que incluem, mas não são limitadas a, comprimidos não revestidos, cápsulas, hóstias, grânulos, comprimidos, pós e grânulos; formas de dosagem tópica que incluem mas não são limitadas a, soluções, pós, emulsões fluidas, suspensões fluidas, semissólidos, unguentos, pastas, cremes, géis e geleias, e espumas; e formas de dosagem parenteral que incluem, mas não são limitadas a soluções, suspensões, emulsões e pó seco; compreendendo uma quantidade eficaz de um polímero ou copolímero da presente descrição. É também conhecido na técnica que os ingredientes ativos podem ser contidos em tais formulações com diluentes, excipientes, desintegrantes, ligantes,

lubrificantes, tensioativos, veículos hidrofóbicos, veículos hidrossolúveis, emulsionantes, soluções-tampão, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes farmacêuticamente aceitáveis e similares. Os meios e métodos de administração são conhecidos na técnica e um técnico pode referir-se a várias referências farmacológicas para orientação. Por exemplo, pode ser consultado Modern Pharmaceutics, Banker & Rhodes, Marcel Dekker, Inc. (1979); e Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, 6th Edition, MacMillan Publishing Co., New York (1980).

Os compostos da presente descrição podem ser formulados durante a administração parenteral por injeção, por ex., por injeção de bolus ou infusão contínua. Os compostos podem ser administrados por infusão contínua subcutaneamente durante um período de cerca de 15 minutos a cerca de 24 horas. As formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem de unidade, por ex., em ampolas ou em recipientes multi-dose, com um conservante adicionado. As composições podem ter várias formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos e podem conter os agentes formulatórios tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

Para administração oral, os compostos podem ser rapidamente formulados ao combinar estes compostos com veículos farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos da técnica. Tais veículos permitem que os compostos aqui descritos sejam formulados como comprimidos não revestidos, comprimidos, drageias, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, suspensões espessas, suspensões e similares, para ingestão oral por um paciente a ser tratado. As preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas ao

adicionar um excipiente sólido, opcionalmente moagem a mistura resultante, e processando a mistura de grânulos, após adicionar auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos não revestidos ou drageias. Os excipientes adequados incluem, mas não são limitados a excipientes tais como açúcares incluindo, mas não limitado a, lactose, sacarose, manitol, e sorbitol; preparações celulose tais como, mas não limitadas a amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma adragante, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica e polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, os agentes de desintegração podem ser adicionados, tais como, mas não limitado a polivinilpirrolidona cruzada, ágar, ou ácido algínico ou um sal do mesmo tal como alginato sódico.

As drageias podem ser providas com revestimentos adequados. Para este efeito, podem ser usadas soluções de açúcar concentrado, que podem opcionalmente conter goma-arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenoglicol, e/ou dióxido de titânio, soluções de laca, e solventes adequados ou misturas de solventes. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos comprimidos não revestidos ou revestimentos de drageias para identificar ou para caracterizar combinações diferentes de doses de composto ativo.

As preparações farmacêuticas que podem ser usadas oralmente incluem, mas não são limitadas a, cápsulas compostas por gelatina, assim como cápsulas suaves e seladas compostas por gelatina e um plastificante, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas podem conter os ingredientes ativos numa admistura com excipiente tal como, por ex., lactose, ligantes com, por ex., amidos e/ou lubrificantes tais como,

por ex., talco ou estearato de magnésio e opcionalmente estabilizadores. Em cápsulas suaves, os compostos ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos gordurosos, parafina líquida, ou polietilenoglicóis. Além disso, os estabilizadores podem ser adicionados. Todas as formulações para administração oral podem ser em dosagens adequadas para tal administração.

Para administração bucal, as composições podem ter a forma de, pelo menos, comprimidos não revestidos ou pastilhas formulados de uma forma convencional.

Para administração por inalação, os compostos para uso de acordo com a presente descrição são convenientemente administrados na forma de uma apresentação de *spray* aerossol de embalagens pressurizadas ou um nebulizador, com o uso de um propulsor adequado, por ex., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada ao providenciar uma válvula para administrar uma quantidade mensurada. Cápsulas e cartuchos de, por ex., gelatina para uso num inalador ou insuflador podem ser formuladas contendo uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada, tal como lactose ou amido.

Os compostos da presente descrição podem também ser formulados em composições retais, tais como supositórios ou clisteres de retenção, por ex., contendo bases de supositório convencionais, tais como manteiga de cacau ou outros glicéridos.

Adicionalmente às formulações previamente descritas, os compostos da presente descrição podem também ser formulados como uma preparação *depot*. Tais formulações de ação prolongada podem ser administradas por implante (por exemplo, subcutaneamente ou intramuscularmente ou por injeção intramuscular).

As injeções *depot* podem ser administradas a cerca de 1 a cerca de 6 meses ou intervalos maiores. Deste modo, por ex., os compostos podem ser formulados com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável) ou resinas de troca de iões, ou como derivados moderadamente solúveis, por exemplo, como um sal moderadamente solúvel.

Na administração transdérmica, os compostos da presente descrição, por exemplo, podem ser aplicados a um gesso, ou podem ser aplicados por sistemas terapêuticos transdérmicos que são subsequentemente fornecidos ao organismo.

As composições farmacêuticas dos compostos também podem compreender portadores de fase sólida ou gel adequados ou excipientes. Exemplos de tais portadores ou excipientes incluem, mas não são limitados a carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina e polímeros tais como, por ex., polietilenoglicóis.

Os compostos da presente descrição podem também ser administrados em combinação com outros ingredientes ativos, tais como, por exemplo, adjuvantes, inibidores de protease, ou outros fármacos compatíveis ou compostos onde tal combinação é vista como desejável ou vantajosa no alcance dos efeitos desejados dos métodos aqui descritos.

Métodos para Preparar HIP Otimizado do Mesmo

Quaisquer técnicas conhecidas na técnica podem ser usadas ao sintetizar e purificar HIP Otimizado, incluindo mas não limitado a, síntese química de novo e purificação por precipitação, adsorção (por ex., cromatografia de coluna, adsorventes de membrana, colunas de fluxo radial, adsorção de lote, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia de troca iônica, adsorventes inorgânicos, adsorventes hidrofóbicos, cromatografia de afinidade de metal imobilizado, cromatografia de afinidade), ou filtração por gel, eletroforese, partição da fase líquida, partição de detergente, extração de solvente orgânico e ultrafiltração. Durante a purificação, a atividade biológica dos Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP, pode ser monitorizada por um ou mais ensaios *in vitro* ou *in vivo*. A pureza do Peptídeo pro-ilhota otimizado pode ser ensaiada por quaisquer métodos conhecidos na técnica, tais como, mas não limitado a, eletroforese de gel. Ver Scopes, supra. Em algumas formas de realização, o Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, usado numa composição aqui descrita pode estar no intervalo de 80 a 100 por cento de mg total de proteína, ou pelo menos 80%, em pelo menos 85%, em pelo menos 90%, em pelo menos 95%, ou em pelo menos 98% de mg total de proteína. Numa forma de realização, o Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, é usado numa composição que é pelo menos 99% da proteína total. Numa outra forma de realização, o Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, é purificado para uma homogeneidade aparente, como ensaiado, por ex., por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil de sulfato sódico. Numa forma de realização, o Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP é sintetizado e testado por HPLC para uma pureza superior a 95%.

Os métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para produzir recombinantemente Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP. Uma sequência de ácido nucleico que codifica Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP pode ser inserida num vetor de expressão para propagação e expressão em células hospedeiras.

Um constructo de expressão, como aqui usado, refere-se a uma sequência de ácido nucleico que codifica um Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, operavelmente associado a uma ou mais regiões reguladoras que permitem a expressão de um HIP Otimizado numa célula hospedeira adequada. "Operavelmente associada" refere-se a uma associação na qual as regiões reguladoras e o Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, a serem expressos são unidos e posicionados de tal modo para permitir a transcrição e por último translação.

As regiões reguladoras que são necessárias para transcrição de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, podem ser providas pelo vetor de expressão. Um codão de iniciação de translação (ATG) pode também ser provido se uma sequência de gene de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, que tem falta do seu codão de iniciação cognato deve ser expressa. Num sistema de constructo hospedeiro compatível, fatores transcricionais celulares, tal como polimérase RNA, vão ligar às regiões reguladoras no constructo de expressão para efetuar a transcrição da sequência do Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, no organismo hospedeiro. A natureza precisa das regiões reguladoras necessárias para a expressão do gene pode variar de célula hospedeira para célula hospedeira. De forma geral, é necessário um promotor que seja capaz de ligar polimérase RNA e promover a transcrição de uma sequência de ácido nucleico

operavelmente associado. Tais regiões reguladoras podem incluir aquelas sequências não-codificadoras 5' envolvidas na iniciação de transcrição e translação, tal como a caixa TATA, sequência de limitação, sequência CAAT e similar. A região não-codificadora 3' para a sequência codificadora pode conter sequências reguladoras de terminação transcricional, tais como centros terminadores e poliadenilação.

Para anexar sequências de ADN com funções reguladoras, tais como promotores, para uma sequência de gene de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, ou para inserir uma sequência de gene de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, no local de clonagem de um vetor, ligantes ou adaptadores que providenciam os locais de restrição compatíveis adequados podem ser ligados às extremidades do cADNs por técnicas bem conhecidas na técnica. A clivagem com uma enzima de restrição pode ser seguida por modificação para criar extremidades rombas ao digerir ou encher em terminais de ADN de cadeia simples antes da ligação. Alternativamente, um local de enzima de restrição desejado pode ser introduzido num fragmento de ADN por amplificação do ADN usando PCR com iniciadores contendo o local de enzima de restrição desejado.

Um constructo de expressão que compreende uma sequência de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, operavelmente associado a regiões reguladoras, pode ser diretamente introduzido em células hospedeiras adequadas para expressão e produção de um peptídeo pro-ilhota, incluindo HIP Otimizado sem clonagem adicional. Os constructos de expressão podem também conter sequências ADN que facilitam a integração de um peptídeo pro-ilhota, incluindo sequência HIP Otimizado num genoma da célula hospedeira, por ex.,

recombinação homóloga. Neste caso, não é necessário usar um vetor de expressão que compreende uma origem de replicação adequada para células hospedeiras adequadas para propagar e expressar Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, nas células hospedeiras.

Uma variedade de vetores de expressão pode ser usada, incluindo mas não limitado a plasmídeos, cosmídeos, fagos, fagemídeos ou vírus modificados. Tais sistemas de expressão hospedeiros representam portadores pelos quais as sequências de codificação de um gene de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células as quais podem, quando transformadas ou transfectadas com as sequências de codificação de nucleótido adequadas, expressar Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, *in-situ*. Estes incluem, mas não são limitados a, microorganismos tais como bactérias (por ex., *E. coli* e *B. subtilis*) transformados com ADN recombinante de bacteriófago, ADN de plasmídeo ou vetores de expressão de ADN de cosmídeo que contêm sequências de codificação de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP; levedura (por ex., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada com vetores de expressão recombinantes que contêm sequências de codificação de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP; sistemas de células de insetos infetadas com vetores de expressão de vírus recombinante (por ex., baculovírus) que contêm sequências de codificação de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP; sistemas de células de plantas infetadas com vetores de expressão de vírus recombinante (por ex., vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinante (por ex., plasmídeo Ti) contendo sequências de

codificação de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP; ou sistemas de células mamíferas (por ex., células COS, CHO, BHK, 293, NS0, e 3T3) com constructos de expressão recombinante contendo promotores derivados do genoma das células de mamíferos (por ex., promotor da metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (por ex., o promotor tardio de adenovírus; o promotor 7.5K do vírus *vaccinia*). De preferência, as células de bactérias tais como *Escherichia coli* e células eucarióticas são usadas para a expressão de um Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, recombinante. Por exemplo, as células de mamíferos tais como células do ovário de hamsters chineses (CHO) podem ser usadas com um elemento promotor portador de vetor do gene de expressão intermediária principal de citomegalovírus para expressão eficaz de uma sequência de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP.

Em sistemas de bactérias, um número de vetores de expressão pode ser vantajosamente selecionado dependendo do uso pretendido para o Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, a ser expresso. Por exemplo, quando pode ser desejável uma grande quantidade de um Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, está a ser produzida, para a geração de composições farmacêuticas de vetores de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, que dirigem a expressão de altos níveis de produtos de proteína de fusão que são prontamente purificados. Os vetores incluem, mas não estão limitados a, vetor de expressão *E. coli* pCR2.1 TOPO (Invitrogen); vetores pIN e similares. Séries de vetores como pFLAG (Sigma), pMAL (NEB), e pET (Novagen) podem também ser usadas para expressar as células estranhas como proteínas de fusão com o peptídeo FLAG, malE-, ou proteína CBD-. Estas proteínas recombinantes podem ser dirigidas para o espaço periplásmico para uma dobra e maturação corretas. A

parte fundida pode ser usada para purificação de afinidade da proteína expressa. A presença de locais de clivagem para proteases específicas como a enteroquinase permite alguém clivar o Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, ou um análogo ou derivado do mesmo. Os vetores pGEX podem também ser usados para expressar as proteínas estranhas como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). No geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem facilmente ser purificadas a partir das células lisadas por adsorção e ligação às *beads* de agarose de glutathione matriz seguido por eluição na presença de glutathione livre. Os vetores pGEX são concebidos para incluir trombina ou locais de clivagem de protease de fator Xa para que o produto do gene alvo clonado pudesse ser libertado da parte GST.

Num sistema de inseto, podem ser usados muitos vetores para expressar os genes estranhos, por ex., vírus da poliedrose nuclear da *Autographa californica* (AcNPV) pode ser usado como um vetor para expressar genes estranhos. O vírus cresce nas células como as células *Spodoptera frugiperda*. Uma sequência de codificação de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, pode ser individualmente clonada em regiões não-essenciais (por ex., o gene de poliedrina) do vírus e colocada sob controle de um promotor AcNPV (por ex., o promotor de poliedrina).

Em células hospedeiras de mamíferos, um número de sistemas de expressão com base em vírus pode ser utilizado. Em casos onde é usado um adenovírus como um vetor de expressão, uma sequência de codificação de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, de interesse pode ser ligada a um complexo de controle transcrição/translação de adenovírus, por ex., o promotor tardio e sequência líder tripartida. Este gene quimérico pode, de seguida, ser inserido no genoma de

adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não-essencial do genoma viral (por ex., região EI ou E3) vai resultar num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, em hospedeiros infectados. Os sinais de iniciação específicos podem também ser requeridos para translação eficaz das sequências de codificação de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, inseridas. Estes sinais incluem o codão de iniciação ATG e sequências adjacentes. Além disso, o codão de iniciação deve estar na fase com o *frame* de leitura da sequência de codificação desejada para garantir translação de todo o inserto. Estes sinais de controlo translacionais exógenos e codões de iniciação podem ser de uma variedade de origens, natural e sintético. A eficiência de expressão pode ser aumentada através da inclusão de elementos de realce de transcrição, terminadores de transcrição e similares.

Adicionalmente, uma estirpe de célula hospedeira pode ser escolhida a qual modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto de gene na forma específica desejada. Tais modificações, (por ex., glicosilação) e processamento (por ex., clivagem) de produtos de proteína podem ser importantes para a função da proteína. As diferentes células hospedeiras têm mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-translacional e modificação de proteínas e produtos de genes. As linhas celulares adequadas ou sistemas hospedeiros podem ser escolhidas para garantir a modificação correta e processamento da proteína estranha expressa. Para este efeito, as células hospedeiras eucarióticas que possuem a maquinaria celular para o processamento adequado do transcrito principal e modificação pós-transcricional do produto de gene, por ex.,

glicosilação e fosforilação do produto de gene, podem ser usadas. Tais células hospedeiras de mamíferos incluem, mas não são limitadas a PC12, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, NS0 (uma linha celular de mieloma de murino que não produz de forma endógena quaisquer cadeias de imunoglobulina), CRL7030, e células HsS78Bst. A expressão num sistema bacteriano ou de levedura pode ser usada se as modificações pós-translacional forem consideradas não-essenciais para uma atividade desejada de HIP Otimizado.

Durante a produção a longo prazo, de rendimento elevado de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, é preferida uma expressão estável em células. As linhas celulares que expressam de forma estável Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, podem ser concebidas ao usar um vetor que contém um marcador selecionável. Através de exemplo mas não limitativo, após a introdução dos constructos de expressão, as células criadas podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias num meio enriquecido, e de seguida são alteradas para um meio seletivo. O marcador selecionável no constructo de expressão confere resistência à seleção e pode, dependendo do constructo vetor e célula hospedeira utilizada, permitir às células integrar de forma estável o constructo de expressão nos seus cromossomas e deixar crescer em cultura e serem expandidas em linhas celulares. Tais células podem ser cultivadas durante um período longo de tempo quando os Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP são expressos continuamente.

Um número de sistemas de secção podem ser usados, incluindo mas não limitado a, resistência a antibióticos (marcadores como Neo, que confere resistência à geneticina ou G-418; Zeo, para resistência à Zeocina; e Bsd, para resistência à

blasticidina); resistência a antimetabolito (marcadores como Dhfr, que confere resistência ao metotrexato; gpt, que confere resistência ao ácido micofenólico; e hidro, que confere resistência à higromicina. Adicionalmente, as linhas celulares mutantes incluindo, mas não limitadas a, tk-, hgprt-, ou aprt- podem ser usadas em combinação com vetores com os genes correspondentes por timidina quinase, hipoxantina, guanina ou adenina fosforibosil transferase. Os métodos habitualmente conhecidos na técnica do ADN recombinante podem ser aplicadas de forma rotineira ao clone recombinante desejado, 150:1.

As células recombinantes podem ser cultivadas sob condições padrão de temperatura, tempo de incubação, densidade ótica e composição do meio. No entanto, as condições para crescimento de células recombinantes podem ser diferentes daquelas para expressão de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP. As condições de cultura modificadas e meio também podem ser usadas para melhorar a produção de Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP. Quaisquer técnicas conhecidas na técnica podem ser aplicadas para estabelecer as condições ótimas para produzir Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP.

Uma alternativa à produção de Peptídeos pro-ilhota otimizados, incluindo HIP através de técnicas recombinantes ou purificação de fontes naturais é a síntese de peptídeo. Por exemplo, um HIP Otimizado total, ou uma proteína correspondente a uma porção de HIP Otimizado, pode ser sintetizado através do uso de um sintetizador de peptídeo. A síntese de peptídeo convencional ou outros protocolos sintéticos bem conhecidos na técnica pode ser usada.

As proteínas com a sequência aminoácido do Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HIP, podem ser sintetizadas por síntese de peptídeos de fase sólida. Durante a síntese, os aminoácidos n - α -protegidos com cadeias laterais protegidas são adicionados passo-a-passo a uma cadeia de polipeptídeo crescente ligada pelo seu C-terminal a um suporte polimérico insolúvel, isto é, *beads* de poliestireno. As proteínas são sintetizadas ao ligar um grupo amino de um aminoácido n - α -desprotegido a um grupo α -carboxil de um aminoácido n - α -protegido que foi ativado ao reagí-lo com um reagente tal como diciclohexilcarbodiimida. A fixação de um grupo amino livre ao carboxil ativado leva à formação da ligação peptídeo. Os grupos de proteção n - α mais usados incluem Boc, que é ácido lábil e Fmoc, o qual é a base lábil. Os pormenores das químicas adequadas, resinas, grupos protetores, aminoácidos protegidos e reagentes são bem conhecidos na técnica e não são deste modo descritos em pormenor.

A purificação do Peptídeo pro-ilhota otimizado, incluindo HPLC é conseguida usando procedimentos convencionais, tal como HPLC preparativa usando permeação de gel, partição e/ou cromatografia de troca iónica. A escolha de matrizes e soluções-tampão adequadas é bem conhecida na técnica e não é, deste modo, aqui descrita em pormenor.

Com a descrição detalhada acima dos reagentes e métodos da invenção, os seguintes Exemplos são providenciados para ilustrar vários aspetos da invenção.

EXEMPLO 1

Atividade HIP *In vitro*. Os estudos *in vitro* foram realizados no Human Islet Laboratory da Universidade da

Pensilvânia. A ilhota pancreática humana e frações ductais foram cultivadas ao longo de 10 dias e depois tratadas num estudo cego. Os métodos de radioimunoensaio foram usados para medir os níveis de insulina nas culturas pancreáticas humanas tratadas com um peptídeo *scrambled* que serve como um controlo negativo, HIP3, HIP1, HIP2 e um INGAP derivado de hamster servindo como controlo positivo. Os peptídeos foram sintetizados pela Bachem BioScience (95% de pureza, para investigação).

As culturas duplicadas foram tratadas no dia 10 e dia 12 e depois lisadas para deteção do conteúdo de insulina após 1 semana de tratamento com peptídeos HIP, controlo e INGAP. Durante a cultura de 10 dias, a produção de insulina diminuiu e após tratamento com peptídeos HIP, a insulina foi novamente produzida.

O gráfico da fração ductal como mostrado na Fig. 1 demonstra os níveis de insulina no eixo y como medido pelo radioimunoensaio após incubação em cultura com tecido ductal pancreático humano. O gráfico de fração de ilhota indica níveis de insulina após incubação no tecido de ilhota pancreática humana. Os níveis de insulina de base são significativamente mais elevados na fração ilhota na linha de base nas frações ductais na linha de base.

O tecido ductal e de ilhota foram separados usando o método de Ricordi. A cultura de célula ductal e ilhota não foi totalmente homogénea em natureza. Os estudos também sugerem que as células progenitoras, que são o alvo para HIP, sejam encontradas nas culturas de ilhota e ductal. Os estudos foram repetidos com descobertas similares mostradas no seguinte gráfico, com tanto quanto um aumento de 4 vezes

nos níveis de insulina por radioimunoensaio entre tecido ductal humano cultivado com HIP 2.

Os estudos repetidos confirmaram o aumento em insulina em culturas ductais predominantemente humanas e culturas de ilhotas, com os níveis de insulina de base consistentemente cerca de 1/3 inferiores na linha de base das culturas ductais comparativamente com as culturas de ilhotas, com aumentos similares em conteúdo de insulina após incubação com peptídeos HIP comparados com um controlo negativo.

EXEMPLO 2

Estudos *in vivo*. HIP3, HIP1 e HIP2 foram alvo de estudos *in vivo* em camundongos. Os estudos mostraram que estas variantes HIP, quando introduzidas em camundongos diabéticos, estimulam diferenciação em células progenitoras dentro do pâncreas em novas estruturas de ilhotas. Foi desenvolvido um novo modelo A da diabetes no camundongo (Rosenberg et al., 2004). O número de pacientes foi selecionado para obter um número suficiente de animais diabéticos para o estudo e os animais foram atribuídos aleatoriamente aos grupos de estudo. Todos os animais foram doseados através de injeções intraperitoneais duas vezes por dia (manhã e tarde) durante 28 dias consecutivos. A hora da administração da dose permaneceu consistente (± 2 horas) durante a fase de dosagem. Após confirmação de que o camundongo era diabético (glicose do sangue superior a 16,7 mmol/L (300 mg/dL) durante, pelo menos, 1 semana, os camundongos foram doseados.

Os camundongos foram injetados peritonealmente com estreptozocina a 40 mg/kg em solução-tampão de citrato, pH 4.5, em 5 dias consecutivos numa tentativa de os tornar

diabéticos. Os camundongos tinham de ter uma glicose no sangue superior a 16,7 mmol/L (300 mg/dL) durante, pelo menos, 1 semana, para serem considerados diabéticos. Se o nível da glicose no sangue em qualquer animal subisse acima de 400 mg/dl, o animal era tratado com insulina. A cada 3 dias, à mesma hora a cada dia, era realizado um golpe na cauda e uma gota de sangue era recolhida. As medições de glicose foram determinadas usando um medidor de glicose. As atribuições de grupo e níveis de dose eram os seguintes na Tabela 1:

Tabela 2

Grupo	Tratamento	Nível de Dose	Volume de Dose	Número de Animais
1	Portador	0	100 µl	6
2	HIP3	250 µg	100 µl	6
3	HIP1	250 µg	100 µl	6
4	HIP2	250 µg	100 µl	6

Os critérios de avaliação do estudo incluem o seguinte: alterações na glicose; alterações nos requisitos de insulina; e histologia de pâncreas *post mortem*.

Alterações nos Requisitos de Insulina. As reduções significativas nos requisitos de insulina e a taxa de diminuição dos requisitos de insulina foram observadas entre os camundongos tratados com HIP, como mostrado na Fig. 2. Os camundongos tratados com HIP 2 ficaram totalmente livres de insulina ao dia 21.

Alterações nos Níveis de Glicose. Existiu uma redução média na glicose a partir da linha de base comparado aos controlos em todos os grupos tratados com HIP e esta redução foi significativa em todos os grupos tratados com HIP, como mostrado na Fig. 3. Existiu uma glicose média mais baixa em 14,7% entre HIP 1 e controlo, uma glicose

média mais baixa em 29,4% entre HIP 2 e controlo, e uma glicose média mais baixa em 57,3% entre HIP3 e o grupo de controlo. Os dados indicam a taxa significativamente mais rápida de declínio nos requisitos de insulina entre os grupos de camundongos tratados com HIP comparados aos camundongos diabéticos de controlo. Existiram números significativos maiores de ilhotas após o tratamento HIP observado nos pâncreas de camundongo, que foram seccionados e analisados em cada camundongo estudado. Os pâncreas foram analisados por um histologista que analisou os espécimes com os dados seguintes na Tabela 3.

Tabela 3

	Total Ilhotas (% de aumento)	Massa de Ilhota Total (μm^2) (% de aumento)
Placebo	280	854364
HIP2	454 (62%)	2161782 (153%)
HIP3	410 (46%)	1703513 (99%)

A diferença no número de ilhotas entre HIP e placebo foi estatisticamente significativa ($p=0,022$). Existiu um aumento ainda mais profundo na área de ilhota entre os camundongos tratados com HIP e o grupo tratado com placebo. A área de ilhota no grupo tratado com HIP2 foi de $360,297 \mu\text{m}^2$ comparado a $142,394 \mu\text{m}^2$ no grupo tratado com placebo com $283,918 \mu\text{m}^2$ no grupo tratado com HIP3 ($p=0,05$), como mostrado na Fig. 4A; A Fig. 4B mostra que o HIP2B aumenta o número de ilhotas nos camundongos diabéticos, (a) as imagens representativas de imunomarcagem de insulina em camundongos tratados com placebo e HIP, (b) as ilhotas marcadas com insulina são definidas em amarelo para diferenciar estas estruturas das células sanguíneas auto-fluorescentes.

A marcação imunofluorescente para insulina foi também realizada em pâncreas de camundongos demonstrando que é maior o grau de marcação de insulina nos camundongos tratados com HIP, como mostrado na Fig. 5. Este tecido de pâncreas de camundongo foi colhido e fixo em 4% de PFA, bloqueado e seccionado. Objetiva 10X, 1.6 optivar.

EXEMPLO 3

O exemplo seguinte descreve métodos exemplares para sintetizar e purificar HIP e HIP Otimizado.

A síntese de peptídeo HIP foi realizada pelo procedimento de fase sólida geral de Merrifield (Merrifield, R.B. 1963, J.Am.Chem.Soc. 85:2149-2154) usando química de proteção Fmoc padrão (Fields, G.B. and Noble, R.L. 1990, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 161-214).

O peptídeo protegido com ligação de resina foi clivado e desprotegido pelo tratamento com ácido trifluoroacético (TFA) na presença de absorvedor para resultar num produto bruto. Foi obtido o produto de peptídeo purificado através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC).

A derivação dos peptídeos com polietilenoglicóis (PEG) pode consistir da introdução de unidades PEG discretas num alcance de peso molecular de 300 a 43 000.

Exemplo A: Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH₂ (HIP2B) (SEQ ID NO: 7). Começando com a resina Rink amide, resina 4-[2', 4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi, os aminoácidos protegidos com Fmoc são introduzidos sequencialmente e acoplados usando HOBt e DCC (N-hidroxibenzotriazol e

diciclohexilcarbodiimida). A desproteção Fmoc da resina original e o grupo de proteção Fmoc de cada aminoácido foram atingidos com 20% de piperidina em dimetilformamida. Após a remoção do grupo de proteção Fmoc do aminoácido N-terminal, lle, o peptídeo protegido unido à resina foi acetilado com 20% de anidrido acético em cloreto de metileno. A desproteção dos grupos de cadeia lateral e clivagem do peptídeo da resina foram atingidas com 95% de ácido trifluoroacético com 2,5% de água e 2,5% de triisopropilsilano. Após o tratamento de uma hora, o peptídeo foi precipitado da solução de clivagem com dietiléter, filtrado e seco.

Purificação. O produto bruto foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC) num suporte C-18 usando 0,1% de TFA em água e 0,1% de TFA em acetonitrilo como soluções-tampão A e B respectivamente. Um gradiente crescente de solução-tampão B foi usado para eluir o produto. Foi atingida uma troca de TFA residual ao reaplicar as frações do produto numa coluna C-18 HPLC, lavando com 0,1 M de NH_4OAc aquoso e eluindo o produto com um gradiente de 1% de ácido acético em água e acetonitrilo como a fase móvel. As frações do produto puro foram reunidas e liofilizadas. A identidade e homogeneidade do peptídeo foram confirmadas por análise composicional de aminoácido, HPLC analítica e análise espectral de massa.

Exemplo B: IGLHDPTQGTEPNG (HIP2) (SEQ ID NO: 4) comparativo. Começando com a resina Fmoc-Gly-Wang, a sequência de peptídeo foi reunida como no Exemplo A. O terminal amino não foi acetilado de modo a prover o peptídeo com um amino livre desbloqueado e terminal carboxil. O produto purificado foi isolado como no Exemplo A.

Exemplo C: (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂)₂ (HIP2B CysDimer) (SEQ ID NO: 19) comparativo. A síntese do peptídeo na sua forma tiol livre foi como descrito no Exemplo A. O produto bruto foi oxidado para formar dímero ao dissolver cerca de 2 g de peptídeo com 2 ml de ácido acético e diluição com ~500 ml de água destilada, o pH foi ajustado a ~8.2 ao adicionar 20% de solução NH₄OH gota a gota. A solução foi deixada a agitar durante a noite à temperatura ambiente. A reação não atingiu a finalização durante a noite. Para concluir a reação, 1% de solução de ferrocianeto de potássio foi adicionado até persistir uma cor verde amarelada permanente. A reação foi considerada terminada como determinado pelo teste Ellman e a análise HPLC. A solução do peptídeo oxidado foi depois agitada com 3-5 g de resina de troca iônica AG-1 X2 (forma cloreto) durante 30 minutos, filtrada e o pH ajustado até ~5 com ácido acético à purificação HPLC.

Exemplo D: (IGLHDPTQGTEPNGC)₂ (HIP2 Cys Dimer) (SEQ ID NO: 13) comparativo. Começando com a resina Fmoc-Cys(Trt)-Wang, a sequência de peptídeo foi preparada como no Exemplo 2. A precipitação de éter do produto bruto, oxidação para dímero e purificação HPLC foram atingidas como descrito no Exemplo C.

Exemplo E: Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂ (HIP2B Cys) (SEQ ID NO: 16) comparativo. A síntese e purificação da sequência primária monomérica são atingidas como no Exemplo A.

O exemplo seguinte descreve um método exemplar para preparar HIP bloqueados. Os peptídeos bloqueados HIP foram preparados através de síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS). A premissa fundamental da síntese em fase sólida é

que os aminoácidos podem ser reunidos num peptídeo de qualquer sequência desejada enquanto uma extremidade da cadeia é ancorada a um suporte insolúvel. Como acima mencionado, em SPPS prática, o terminal carboxil do peptídeo é associado ao polímero. Após a sequência desejada de aminoácidos ter sido ligada em conjunto no suporte, um reagente pode ser aplicado para clivar a cadeia de peptídeo do suporte e libertar o peptídeo bruto na solução. Todas as reações envolvidas na síntese são realizadas para conclusão se possível, para que o produto homogêneo possa ser obtido.

Quando o C-terminal de um peptídeo é um amido, o derivado é um amido peptídico. Os amidos peptídicos são derivados extremamente importantes uma vez que muitas das hormonas peptídicas que ocorrem de forma natural estão presentes como o amido. Para sintetizar os amidos peptídicos, as resinas em fase sólida foram desenvolvidas, as quais resultam em amidos peptídicos diretamente após clivagem. Quando o N-terminal é um grupo acetil, o peptídeo é unido a partir do C-terminal ao N-terminal. O N-terminal é de seguida acetilado usando anidrido acético na presença de uma base.

Os derivados de aminoácido-Fmoc são usados para criar a sequência. Após a sequência desejada de aminoácidos ter sido ligada em conjunto ao suporte, o peptídeo é acetilado, filtrado e seco. A resina peptídica acetilada é de seguida clivada com Ácido trifluoroacético (TFA) contendo absorvedores para libertar o peptídeo do suporte, assim como todos os grupos de proteção. A purificação é de seguida executada no material bruto usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Exemplo F: Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH₂ (HIP2B Cys-PEG) (SEQ ID NO: 25) comparativo. A forma purificada monomérica do peptídeo do Exemplo 5 (1.1 equivalente) foi dissolvida em solução-tampão de acetato (0.1 M, pH=6.5). Uma solução (1 equivalente) de polietilenoglicóis derivado de maleimida (PEG maleimida) foi preparada em água destilada e adicionada à solução peptídica com agitação. O pH da solução resultante foi ajustada a ~6.5 com solução NH₄OH diluída, agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos, acidificada com algumas gotas de ácido acético e purificada por HPLC.

Exemplo G: IGLHDPTQGTEPNGC(PEG) (HIP2 Cys-PEG) (SEQ ID NO: 22) comparativo. Começando com resina Fmoc-Cys(Trt)-Wang, a síntese e purificação da sequência primária são como descritas no Exemplo B. A derivação com PEG maleimida seguida por purificação HPLC é como no Exemplo F.

Exemplo H: (PEG)-IGLHDPTQGTEPNG (PEG-HIP2) (SEQ ID NO: 91) comparativo. A sequência peptídica unida à resina primária foi preparada como no Exemplo 2. Após a desproteção Fmoc do N-terminal lle, a resina peptídica protegida foi derivada com ácido carboxílico PEG usando HOBT e DCC como agentes de união. A clivagem e purificação do (PEG)-peptídeo da resina foi como descrito no Exemplo A.

EXEMPLO 4

O exemplo seguinte ilustra os farmacocinéticos da administração intramuscular e subcutânea de HIP1, que é clivado em HIP2.

Os farmacocinéticos de administração HIP com 20 ratos, com 5 ratos por via de administração, foram avaliados. De modo

igual às descobertas de INGAP derivado do hamster, a via intramuscular (IM) providenciou uma melhor concentração de sangue do material, mas determinações de semivida foram abaixo de 30 minutos por medições ELISA, como mostrado na Figura 6.

A via subcutânea (SQ) de administração mostrou uma semivida ligeiramente maior, como mostrado na Figura 7, mas os níveis detectados pelo ELISA foram menores do que a via IM. A via IM providencia uma semivida ligeiramente maior no sangue do que por SQ.

EXEMPLO 5

O exemplo seguinte mostra a estabilidade do peptídeo HIP2B num estudo de congelação-descongelação.

Procedimento Experimental. O estudo foi iniciado com dois grupos de oito amostras cada. Um grupo foi mantido a 4-8 °C e o outro a 25 °C, como parte de um estudo de estabilidade de 2 meses. Cada amostra contém 4,57 miligramas de HIP2B em 5 microlitros de água destilada. Uma amostra de cada grupo de temperatura é removida e colocada num congelador a menos 20 °C, para armazenamento, a cada sete dias até poder ser executada a análise LC/MS. Uma série de amostras foram avaliadas após 1, 2 e 3 semanas no estudo de estabilidade face a uma amostra de controlo de HIP2B que foi preparada no início do estudo e armazenada a -20 °C. Após três semanas de teste de estabilidade em cada uma das temperaturas acima descritas, todas as amostras foram inalteradas como determinado por LC/MS e por isso consideradas estáveis a 1, 2 e 3 semanas. Estes estudos de estabilidade de congelação-descongelação sugerem que uma mudança de carbono que ocorre na junção de Pro-Asn na

sequência HIP quando é armazenada em sulfóxido de dimetil (DMSO), a sequência permanece estável durante vários meses quando armazenada em soro isotónico a -20 °C.

EXEMPLO 6

O HIP Otimizado Demonstra uma Estabilidade Peptídica Aumentada nas Protéases de Soro *In Vitro* Durante o Tempo (T).

Os peptídeos foram incubados em plasma humano a 37 °C. As incubações de amostra foram executadas durante um período de 1 hora. Os pontos temporais individuais de 1, 5, 10, 30 e 60 minutos foram usados para seguir as reações. A desativação de protéases de plasma de cada ponto temporal, foi atingida ao aquecer as amostras a 100 °C durante 1 minuto. Depois da análise, as amostras tratadas com plasma foram avaliadas através de cromatografia de fase reversa em série com um espectrómetro de massa, HPLC/LC-MS, face às amostras de controlo.

Plasma Tratado com HIP e peptídeos com HIP Otimizado foram avaliados durante 1, 5, 10, 30 e 60 minutos. Para cada ponto temporal 0,70 ml de plasma foi pipetado num tubo de teste de 10 ml. Para cada um foi adicionado 0,30 ml de uma solução stock de HIP ou peptídeo de HIP Otimizado (1,66 mg/ml) preparada no fosfato salino tamponado. As amostras de plasma/peptídeo foram incubadas a 37 °C para cada ponto temporal seguido por aquecimento a 100 °C para inativar a atividade proteolítica das protéases de plasma. Após inativação, as amostras foram diluídas com 1 ml de H₂O, centrifugadas e o líquido sobrenadante removido para análise.

As amostras foram analisadas numa coluna de fase reversa C-18 (50 mm x 2,0 mm) usando 0,07% de TFA em H₂O como solução-tampão A e 0,07% de TFA em acetonitrilo como solução-tampão B. Um gradiente linear de 98% A/2% B progredindo para 30% A/70% B durante 10 min. foi usado a uma taxa de fluxo de 0,4 ml/min. O eluente foi monitorizado por UV a um comprimento de onda de 220 nm e por espectroscopia de massa. As comparações de perfis cromatográficos de peptídeos tratados com plasma (37 °C) face às amostras de referência do peptídeo e controlos de plasma foram usadas para determinar a estabilidade relativa de peptídeo para o tratamento de plasma.

Controlos

T = 0: Plasma (0,7 ml) mais solução stock de peptídeo (0,3 ml), aquecer a 100 °C durante 1 min., adicionar 1 ml de H₂O, centrifugar.

Controlo de fundo de plasma: 0,7 ml de plasma mais PBS (0,3 ml), aquecer a 100 °C durante 1 min., adicionar 1 ml de H₂O, centrifugar. Peptídeo de referência tratado com calor: Solução stock peptídica (0,3 ml) mais 0,7 ml de PBS, aquecer a 100 °C durante 1 min., adicionar 1 ml de H₂O. Peptídeo de referência sem calor: Solução stock peptídica (0,3 ml), adicionar 0,7 ml de PBS mais 1 ml de H₂O.

Resultados.

HIP2 (IGLHDPTQGTEPNG) (SEQ ID NO: 4) (Comparativo) A prova de proteólise por surgimento de um novo componente (\approx 5%) é evidente após apenas 1 min. de incubação em HIP2. O novo componente continua a aumentar com o passar do tempo. Aos 30 min., representa \approx 50% e aos 60 min. a concentração é \approx

70%. O principal metabolito é identificado como GLHDPTQGTEPNG (SEQ ID NO: 92), indicando a perda principal de isoleucina N-terminal. Além disso, existem provas da presença de uma pequena quantidade de HDPTQGTEPNG (SEQ ID NO: 93) resultando na perda de IGL.

HIP2B (Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH₂) (SEQ ID NO: 7) A forma amido C N-acetilado do HIP2 parece ser totalmente estável para as proteases de plasma após 1 hora de incubação a 37 °C.

HIP3 (IGLHDPTQGTEPNGE) (SEQ ID NO: 3) (Comparativo) As Proteólises de HIP3 são mais lentas relativamente àquelas de HIP2. Após 60 min., a concentração original de HIP3 é ≈ 50%. O principal metabolito é identificado como HDPTQGTEPNG (SEQ ID NO: 93), indicando uma perda de IG.

HIP3B (Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH₂) (SEQ ID NO: 5) A forma bloqueada de HIP3 é totalmente estável até 1 hr de incubação no plasma.

HIP2B Cys-Dimer (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂)₂ (SEQ ID NO: 19) (Comparativo). Este composto parece estar estável nas proteases de plasma durante, pelo menos, 1 hora. No entanto, o tratamento de aquecimento a 100 °C das amostras incubadas, assim como o controlo T = 0, indica a conversão do material original a um aduto cistina cuja estrutura é Ac-IGHDPTQGTEPNGC(C)-NH₂ (SEQ ID NO: 94) (Comparativo) A conversão parece dever-se ao deslocamento por cisteína, do plasma, quando as amostras são aquecidas a 100 °C.

HIP2B Cys-PEG (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH₂) (SEQ ID NO: 22). Este constructo molecular elevado é estável para as proteases do plasma até uma 1 hora.

Resultados. A proteólise dos peptídeos HIP2 e HIP2B no plasma são mostrados na Fig. 8. Os resultados do HIP2 mostraram o aparecimento de um novo componente (~5%) após apenas 1 minuto de incubação em plasma. Este novo componente continua a aumentar com o passar do tempo e representa o metabolito principal é identificado como a sequência HIP2 com a perda, em primeiro lugar, da isoleucina N-terminal e, em segundo lugar, a perda dos primeiros três aminoácidos. HIP2B surgiu totalmente estável para as proteases de plasma após 1 hora de incubação a 37 °C. As formas bloqueadas de HIP2 e HIP3 referidas como HIP2B e HIP3B são claramente mais estáveis para as proteases de plasma durante mais de 1 hora relativamente às estruturas não bloqueadas. Os derivados de Dímero e PEG do HIP2B são também muito estáveis.

EXEMPLO 7

Utilizando uma técnica de crescimento de uma linha celular humana imortalizada estabelecida das células epitelioides pancreáticas humanas conhecidas como PANC-1, o impacto *in vitro* do impacto dos HIP e HIP Otimizados na produção de insulina foi avaliado. Esta linha celular demonstra a capacidade em diferenciar em outros tipos de células pancreáticas após a sinalização adequada. Por isso, as células PANC-1 foram usadas como um substituto para as células progenitoras que ocorrem naturalmente do pâncreas.

As células Panc-1 foram inoculadas em frascos T75 e meio DMEM contendo 10% de soro bovino fetal. As células foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 horas e de seguida tratadas com HIP na concentração final de 167 nM. Este tratamento foi executado uma vez por dia durante quatro dias. No quinto dia, as células foram partidas para obter

lisados celulares. Nestes extratos celulares, os níveis de proteína total foram determinados, e 50 microgramas da proteína total foram usados para executar a análise *western blot*. As amostras contendo 50 microgramas de proteínas foram diluídas em solução-tampão de carregamento com ou não 5% do agente redutor beta-mercaptoetanol, e carregadas em cada poço do gel. Após a eletroforese e transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose, a presença da insulina foi detetada ao usar como um anticorpo principal, o anticorpo anti-insulina de galinha policlonal (ab14042, diluição de 1/2000), e como anticorpo secundário o anti-galinha conjugado anti-coelho policlonal (diluição 1/1000 para o gel NIT e 1/2000 para o gel PANC-1).

A Fig. 9 é a análise *Western Blot* que demonstra a expressão da insulina humana das células PANC-1 em resposta à incubação com HIP otimizado. O painel abaixo com etiqueta A demonstra bandas para insulina nas células Panc-1 quando as amostras foram carregadas em condições não-redutoras. Os resultados indicam que HIP2, HIP2B e HIP2 dimerizado estimulam mais produção de insulina do que HIP2 PEGuilado ou controle. Em condições redutoras, as ligações dissulfureto que ligam a cadeia de dois polipeptídeos na insulina são reduzidas e, por isso, a cadeia é separada e nesta condição, o anticorpo de insulina não reage à insulina. Em contraste às condições não-redutoras, a molécula de insulina é completa e é reconhecida pelo anticorpo.

A Fig. 9B mostra a proteína total contida nas mesmas membranas como na Fig. 9A. A determinação dos níveis da proteína total via marcação Ponceau demonstra que as diferentes vias contêm uma quantidade similar de proteínas. Os níveis de proteína total nas células NIT-1 e PANC-1

foram determinados, e 50 microgramas da proteína total foram usados para executar a análise *western blot*. As amostras contendo 50 microgramas de proteínas foram diluídas em solução-tampão de carregamento com ou não 5% do agente redutor beta-mercaptoetanol, e carregada em cada poço do gel.

A marcação Ponceau demonstra que as diferenças em expressão de insulina respondem a HIP diferentes e os HIP Otimizados não estão relacionados com a quantidade de proteína carregada nos poços. Também a falta de sinal para insulina, por exemplo, a membrana nas condições redutoras, não é atribuída a uma falta de proteína.

EXEMPLO 8

Efeitos de peptídeos HIP e HIP Otimizados na morfologia celular de linhas celulares PANC-1. As células foram tratadas com HIP e Peptídeos HIP otimizados durante quatro dias. Na Fig. 10A, captada no dia 7 com um aumento de 200X, podem ser vistas diferenças morfológicas entre a condição de controlo e as células tratadas com HIP e HIP Otimizados com células mais histologicamente diferenciadas, em particular nas células tratadas com HIP2B. A Fig. 10B mostra as alterações da morfologia celular durante 7 dias, com o controlo na parte superior, HIP2 ao meio e HIP2B na parte inferior. As fotos foram captadas nos dias 1, 2, 3, 5 e 7 com um aumento de 200X. Com as células tratadas com controlo não parece surgir nenhuma alteração, as células tratadas com HIP2 e HIP2B desviam-se significativamente da sua aparência inicial. A Fig. 10C demonstra o progresso das alterações morfológicas quando o HIP2 Dímero e HIP2 PEG são tratados em culturas de células PANC-1. No geral, as células tratadas com controlo não parecem sofrer nenhuma

alterações visuais significativas, as células tratadas com HIP2 e HIP2B desviam-se significativamente da sua aparência inicial.

EXEMPLO 9

Atividade HIP 2B na Cultura de Tecido Pancreático Humano. O Human Islet Laboratory da Universidade da Pensilvânia demonstrou o impacto de HIP e Peptídeos HIP otimizados em culturas de células ductais pancreáticas. A fração ductal das células pancreáticas humanas foi cultivada durante 10 dias numa matriz de colagénio e depois tratadas dia sim, dia não com HIP2B. As células foram etiquetadas com marcação anticorpo dupla para CK19, um marcador de tecido ductal, e marcação DAPI para mostrar núcleos e insulina. Como mostrado na Fig. 11, as células sofreram alterações morfológicas que induziram a expressão de insulina em células de outro modo negativas de insulina.

EXEMPLO 10

Dados Piloto do Impacto de HIP e Peptídeos HIP Otimizados em Modelos Diabéticos Não Obesos.

Consistente com os dados nos camundongos tratados com STZ (acima) de massa, área e número da ilhota aumentados, o modelo camundongo NOD piloto demonstrou provas preliminares do potencial para HIP Otimizado para providenciar melhor eficácia em termos de neogénese de ilhotas como mensurado pelos níveis peptídeo C em camundongos após tratamento com HIP durante 39 dias.

O modelo diabético não obeso (NOD) é usado como um modelo para a diabetes autoimune tipo 1. Esta forma de diabetes é

a mais desafiante no sentido de que os danos subjacentes ao pâncreas e à sua produção de insulina se devem ao ataque autoimune. Por isso, no sentido de mostrar uma neogénese de ilhota definitiva nesta forma de diabetes, deve ser usado um agente de imunotolerância em combinação com HIP. O modelo de camundongo NOD é um modelo extremamente difícil, porque muitos dos camundongos apenas se tornam transientemente diabéticos e entram em remissão, enquanto os outros desenvolvem diabetes grave. O tempo de intervenção neste modelo de camundongo transgénico é difícil de determinar.

Num estudo preliminar que utiliza o agente de imunotolerância, lisofilina (LSF) sob desenvolvimento, três camundongos NOD que se tornaram diabéticos e foram aleatorizados para placebo mais LSF, HIP2 mais LSF e HIP2B mais LSF. Como mostrado na Fig. 12, do grupo que recebeu LSF no momento adequado, os dois tratados com HIP responderam com níveis de glicose estavelmente melhorados durante o estudo comparado com o camundongo NOD tratado apenas com LSF que tem elevações graduais em glicose durante todo o estudo. Apesar de não ser um estudo estatisticamente significativo, estes dados providenciam provas muito significativas para obter a combinação de um agente de imunotolerância e HIP para diabetes tipo 1.

EXEMPLO 11

Impacto de HIP2B e HIP2 no Recetor HIP. Os seguintes conjuntos de estudos demonstram que HIP2B é tão eficaz como HIP2 na interação com o recetor de membrana citoplasmática para HIP e tráfego desde o recetor até ao núcleo. O recetor para o Peptídeo pro-ilhota Humano foi etiquetado usando um método anticorpo duplo numa linha celular pancreática

humana. O primeiro anticorpo foi um policlonal de coelho e o segundo é uma cabra anti-coelho etiquetado com tinta fluorescente Cy3.

Estas células crescem normalmente em meio livre de soro e quando tratadas com tripsina, são destabilizadas e tornadas competentes para serem submetidas a alterações de desenvolvimento. As células foram cultivadas em meio sem soro (SFM) com e sem HIP, e em meio sem soro com tripsina (TSFM). Isto serve para mostrar que simplesmente ao destabilizar, não ativa as alterações de desenvolvimento.

Quando tratadas com HIP sob condições estáveis, não resultam nenhuma alteração. Quando tratadas com HIP sob condições competentes de desenvolvimento, o recetor etiquetado responde à presença de HIP ao ser encapsulado pela membrana citoplasmática e ao mover para a membrana nuclear onde os sinais para diferenciação são recebidos.

Quando tratadas com HIP sob condições estáveis, não resultam nenhuma alteração. Quando tratadas com HIP sob condições competentes de desenvolvimento, o recetor etiquetado responde à presença de HIP ao ser encapsulado pela membrana citoplasmática e ao mover para a membrana nuclear onde os sinais para diferenciação são recebidos.

A Fig. 13 mostra as células PANC-1 tratadas com tripsina e incubadas em meio sem soro diferenciadas em agregados de célula ilhota. O recetor HIP é supra-regulado durante a diferenciação de células pancreáticas humanas e parece interagir com HIP2 e o HIP2B interage com o recetor HIP. O HIP2 e HIP2B Otimizado estimulam o tráfego do recetor HIP na membrana citoplasmática no núcleo das células que

estimulam a diferenciação de células progenitoras pancreáticas em novas ilhotas que produzem insulina.

A Fig. 14 mostra anticorpo recetor HIP coelho anti-humano etiquetado com Cy3 em (A) TSFM apenas e (B) TSFM com 150 μ M (HIP2B Otimizado) durante 48 horas. O HIP estimula a proteína ligada à membrana do recetor a ser absorvida pela membrana citoplasmática e transportada para a membrana nuclear.

A Figura 15 demonstra análises imunofluorescentes repetidas do impacto de HIP2B Otimizado no recetor HIP (EXTL3). Os painéis superiores são indicados pela marcação imunofluorescente Cy3 de EXTL3 (vermelho). No painel inferior de imagens, a imunomarcação Cy3 de EXTL3 foi sobreposta com a marcação DAPI (azul) dos núcleos. As células cresceram num meio de crescimento padrão como um controlo e comparadas às células que cresceram num meio sem soro (SFM) na presença ou ausência de HIP. As setas amarelas demonstram exemplos da expressão de superfície de EXTL3 crescidas em meio de crescimento padrão. Os limites da célula são bem definidos indicando a expressão de superfície de EXTL3 na membrana de plasma. As setas amarelas delimitam os limites da célula enquanto os núcleos são mostrados em azul. As imagens do meio são células que cresceram em SFM. O EXTL3 está localizado no citoplasma como indicado pela marcação Cy3 citoplasmático. As setas verdes mostram a falta de marcação na posição dos núcleos. As setas verdes na imagem inferior do crescimento das células em SFM demonstram uma marcação DAPI azul intenso dos núcleos indicando uma falta de EXTL3 no núcleo. Na imagem superior do crescimento das células em SFM e HIP, a presença de imunomarcação EXTL3 no núcleo indicado pelas setas azuis sugere uma translocação de EXTL3 no núcleo. Na

imagem inferior do crescimento das células em SFM e HIP, as setas azuis indicam a posição dos núcleos. Na imagem inferior existe uma sobreposição da marcação EXTL3-Cy3 e marcação DAPI nuclear que corrobora a localização de EXTL3 (setas azuis). Escala = 20 μ m em todas as imagens.

A Figura 16 mostra que o HIP2B Otimizado melhora a translocação (EXTL3) do recetor HIP a partir da membrana citoplasmática para o núcleo nas células PANC-1. A análise *western blot* dos níveis HIP (EXTL3) e as frações nucleares isolaram nos pontos temporais indicados. A análise *western blot* demonstra que os níveis nucleares mais altos do recetor HIP (EXTL3) foram observados às 6 horas após cultura em SFM sem HIP. A adição de HIP2 e HIP2B no meio de cultura melhorou a translocação nuclear EXTL3, demonstrado por níveis nucleares mais elevados desta proteína aos 30 minutos. Estas comparações demonstram que na presença de HIP, existe melhoria no tempo de translocação de EXTL3 a partir do compartimento citoplasmático até ao núcleo e que a translocação nuclear EXTL3 pode ser modulada pela presença de HIP. São repetidos os resultados *western blots* usando estas células e pontos temporais.

EXEMPLO 12

Num estudo aleatório controlado com placebo de HIP2, HIP2B v. placebo, oitenta (80) camundongos foram tratados com STZ para induzir diabetes. Os camundongos foram monitorizados até atingirem um nível de hiperglicemia consistente com o surgimento da diabetes. Os níveis de glicose de linha de base para a intervenção nos camundongos tinham como média 300 \pm 6 mg/dL e não existiam diferenças estatisticamente significativas nos níveis de glicose entre os grupos de intervenção HIP e o grupo de placebo ($p=0.301$).

Após 36 dias, todos os camundongos tratados com HIP estavam sem insulina e as glicoses tinham tendência para descer significativamente como comparado com o grupo de placebo. Os camundongos aleatoriamente selecionados foram sacrificados durante o decorrer do estudo da imunohistoquímica dos seus pâncreas. As análises de peptídeo C no soro são efetuadas. Após 39 dias de intervenção, os camundongos remanescentes serão testados diariamente para níveis de glicose e a saúde no geral para os 60 dias seguintes.

A avaliação preliminar demonstra que o tratamento HIP resulta numa redução de 38,7% como comparado com o placebo ($p < 0.05$). Além disso, a estabilização de HIP2 para formular HIP2B não diminuiu a atividade *in vivo*.

Como mostrado na Figura 17, o tratamento com HIP resultou em níveis de glicose que foram 116 mg/dL mais baixos do que com placebo ($\downarrow 38,7\%$ $p < 0.05$). Todos os camundongos tratados com HIP saíram da insulina. 56% (9/16) de camundongos tratados com HIP tinham os níveis de glicose a < 230 mg/dL. 9% (1/11) de camundongos tratados com placebo tinham os níveis de glicose a < 230 mg/dL. HIP 2B é significativamente mais estável *in vitro* em soro a 37 graus. HIP 2B tem uma semivida mais longa também em soro. As modificações a HIP 2 para formar HIP 2B não diminuíram a atividade *in vivo*.

Para avaliar o potencial terapêutico de HIP2B, foi utilizado um modelo de camundongo de diabetes induzida por STZ. Sessenta camundongos C57BL/6J foram injetados intraperitonealmente com STZ a 50 mg/kg em solução-tampão de citrato, pH 4.5, durante 5 dias consecutivos para torná-los diabéticos. Os camundongos foram aleatorizados no

estudo quando o nível de glicose no sangue era de ≥ 200 mg/dl durante dois dias consecutivos. A glicose no sangue foi monitorizada diariamente usando uma gota de sangue recolhida de um golpe efetuado na ponta da cauda. As medições de glicose foram determinadas usando um medidor de glicose. Se o nível de glicose no sangue em qualquer animal subiu para ≥ 324 mg/dL, o animal foi tratado com insulina (1 Unidade por dia, insulina glargina, intramuscularmente) até a glicose no sangue cair abaixo dos 324 mg/dL. Um registo foi mantido da dosagem de insulina, para que as comparações do requisito de insulina possam ser executadas. 3 animais adicionais não foram tratados com STZ e foram usados para estabelecer valores de linha de base não diabéticos.

Os animais foram atribuídos em três grupos, como mostrado na Tabela 4. Os animais diabéticos foram injetados intraperitonealmente duas vezes ao dia (manhã e noite) durante 39 dias consecutivos com o controlo portador, HIP2 (300 μ g) ou HIP2B (300 μ g). Os camundongos de cada uma das vertentes do tratamento (Grupos 1-3) foram sacrificados no Dia 39. Na noite anterior ao sacrifício, todos os camundongos foram colocados em jejum com um nível de glicose de manhã medido antes do sacrifício, o que foi considerado como um nível de glicemia de jejum. Os grupos de animais remanescentes foram mantidos com uma intervenção não médica a partir do Dia 40-60. Receberam as medições de glicose de manhã, diariamente, e administração de insulina quando adequado. Os critérios de avaliação do estudo incluíam o seguinte: 1) alterações na glicose do sangue e 2) alterações nos requisitos de insulina.

Tabela 4: Aleatorização de camundongos diabéticos devido a STZ

Grupo	Tratamento	Dosagem	Nível de Dose	Volume de Dose	Número de Animais
1	Portador	2 injeções IP diariamente X 39 dias	0	100 µl	20
2	HIP2	2 injeções IP diariamente X 39 dias	300 µg	100 µl	20
3	HIP2B	2 injeções IP diariamente X 39 dias	300 µg	100 µl	20

Durante o decorrer do estudo, HIP2 e HIP2B tiveram uma diminuição significativa nos níveis de glicose de sangue a partir do grupo de controlo. No entanto, não existiu diferença no nível de glicose do sangue dos dois grupos HIP. A Figura 17 mostra que no dia 36, as Modificações a HIP2 para formar HIP 2B não diminuíram a atividade *in vivo*. O tratamento com HIP resultou em níveis de glicose que foram 116 mg/dL mais baixos do que com placebo ($\downarrow 38,7\%$ $p < 0.05$). Todos os camundongos tratados com HIP foram retirados da insulina. Cinquenta e seis (56) % (9/16) de camundongos tratados com HIP tinham os níveis de glicose a < 230 mg/dL.

A Figura 17 é um gráfico que mostra os níveis de glicose diários médios num Modelo de Camundongo Diabético por STZ após administração de HIP2, HIP2B e placebo. O nível de glicose de linha de base média foi de $300 \text{ mg/dL} \pm 2 \text{ mg/dL}$ sem diferenças significativas entre os grupos tratados com placebo ou HIP ($p = 0.301$).

A Figura 18 é um gráfico que mostra os níveis de glicose diários médios entre grupos de camundongos tratados com HIP2B (verde) e controlo (púrpura) e placebo. Os declives

das linhas de cada grupo (Figura 18) representam a taxa de alteração nos níveis de glicose, que se referem à "velocidade de regeneração". O tratamento com HIP2B resultou na taxa de queda (velocidade de regeneração) nos níveis de glicose de -0,602 como comparado com a taxa de aumento dos níveis de glicose dentro do grupo tratado com placebo com uma taxa de aumento em glicose de +0,381 durante o decorrer do estudo a partir dos dias 1-39.

A Figura 19 mostra as diferenças na glicose entre o dia 1 e dia 38 do estudo que compara HIP2B, HIP2 e placebo. A Figura 19 mostra o controlo de glicose melhorado entre os destinatários de HIP2B Otimizado (amarelo), grupos tratados com HIP2 (verde) e controlo (azul) de camundongos no início e fim da intervenção. O grupo de controlo teve um aumento médio desde a linha de base de 28,9 mg/dL a 334,6 mg/dL. Os grupos HIP2B e HIP2 tinham reduções significativas desde a linha de base com uma glicose não em jejum média de 235,3 mg/dL no grupo HIP2B ($p=0.024$ desde o controlo) e 231,6 mg/dL no grupo HIP2 ($p=0.029$ desde o controlo).

A Figura 20 mostra os níveis de glicemia de jejum no final do estudo entre os grupos de tratamento. O grupo de tratamento com HIP2B Otimizado teve uma glicemia de jejum no final do estudo de 106,7 mg/dL \pm 0,58 mg/dL ($p=0.046$) comparado com os controlos tratados com placebo com uma glicemia de jejum média de 258,00 \pm 84,5 mg/dL. Os camundongos tratados com HIP2 não bloqueado têm uma glicemia de jejum média de 115,3 mg/dL \pm 16,5 mg/dL ($p=0.050$) comparado com o grupo tratado com placebo.

A Figura 21 demonstra os resultados de teste de tolerância à glicose executado nos animais após o decorrer do tratamento e antes do sacrifício. O HIP 2B Otimizado é

significativamente mais estável *in vitro* no soro a 37 graus. O HIP 2B Otimizado tem uma semivida mais longa também em soro. As modificações a HIP 2 para formar HIP 2B não diminuíram a atividade *in vivo*.

Exemplo 13

Para avaliar o potencial terapêutico e dose eficaz mais baixa de HIP2B, necessário para melhorar significativamente o controlo glicémico, foi realizado um estudo de resposta a dose utilizando o modelo de camundongo com diabetes induzida por STZ.

A Figura 22 mostra os resultados de uma análise de resposta à dose de HIP2B realizada para avaliar e comparar os efeitos do HIP2B Otimizado no controlo de glicose quando administrado em dosagens distintas num modelo de diabetes em camundongos para determinar a dosagem potencial mais baixa que produz a eficácia máxima. Este estudo era um estudo aleatório para determinar o impacto de cinco concentrações de HIP2B no controlo glicémico e atenuação de diabetes no modelo de camundongo tratado com STZ. Os grupos de tratamento variam entre um máximo de 1000 microgramas BID até 0,1 microgramas BID de HIP2B Otimizado em 100 µl de soro isotónico. Os seis grupos de estudo são listados em baixo:

Artigo teste	Dosagem equivalente no Homem (60 kg)	Dose/dia camundongo = mg/kg/dia (peso do camundongo ~20 gramas)
1	100 mg kg dia	1000 mcg 100 µl BID=2 mg dia = 100 mg kg dia
2	10 mg kg dia	100 mcg 100 µl BID=0,2 mg dia = 10 mg kg dia

3	1 mg kg dia	10 mcg 100 µl BID=0,02 mg dia = 1 mg kg dia
4	0,1 mg kg dia	1 mcg 100 µl BID=0,002 mg dia = 0,1 mg kg dia
5	0,01 mg kg dia	0,1 mcg 100 µl BID=0,0002 mg dia = 0,01 mg kg dia
6	Placebo de soro	Placebo de soro 100 µl BID

Os níveis de glicose foram verificados diariamente nos camundongos a ~0900-1100, independentemente dos padrões de alimentação nos camundongos. Devido às variações de glicose potenciais no momento das medições de glicose diárias, os valores de glicose média durante cinco dias foram calculados diariamente em cada grupo de tratamento. O impacto das concentrações de HIP2B foi avaliado por 1) os níveis de glicose média e 2) extensão na qual as concentrações diferentes de HIP2B atenuaram o desenvolvimento de toxicidade de glicose como determinado pelas excursões glicémicas entre os grupos de intervenção comparado ao grupo de controlo.

A Figura 22 mostra o estudo de resposta de dosagem realizado em camundongos tratados com STZ e confirma que a eficiência entre os camundongos diabéticos tratados com 10, 100 e 1000 microgramas BID é equivalente. A menos de 1 mg/kg de dosagem existe um sinal de eficácia diminuída em camundongos que correspondem a níveis de dosagem de 0,1 e 0,01 mg/kg.

O HIP2B Otimizado é distinto de muitas formas das terapias tradicionais, tais como insulina para o tratamento da diabetes. O HIP2B inicia uma cascata de sinalização que leva à neogénese de ilhota. Em contraste à insulina, na qual a eficácia da resposta é medida em primeiro lugar pela sua capacidade imediata de diminuir a glicose, a resposta

farmacodinâmica de qualquer agente de neogénese de ilhota é medida durante dias e semanas. Deste modo, a eficácia dos agentes de neogénese de ilhotas, tais como HIP2B e INGAP, pode ser avaliada não apenas pela restauração a longo prazo do controlo glicémico após a dosagem diária repetida, mas também pela atenuação de hiperglicemia, e/ou a taxa na qual é atingida a euglicemia. Todos os grupos de tratamento HIP aproximam-se da euglicemia.

A resposta de atenuação de dose foi calculada como a alteração na glicose média com a maior resposta atingida igual à máxima extensão para a qual a diabetes é atenuada. Nesta avaliação, comunicamos a alteração na resposta por dose de unidade como calculado pela diferença nas excursões glicémicas máximas em cada grupo de tratamento durante todo o estudo, comparado ao das excursões glicémicas do grupo de controlo. O grupo de controlo não tem atenuação de doença e atingiu 100% de indução de doença. A extensão para a qual as doses de HIP2B atenuam este efeito é descrita como a % de atenuação da doença em cada grupo de tratamento relativamente ao grupo de placebo.

A Figura 23 mostra o impacto de concentração distinta de HIP2B na atenuação da diabetes. Cada um dos três níveis de tratamento mais alto atenuou a gravidade da diabetes para a mesma extensão. A dosagem de tratamento mais baixa de HIP (0,1 e 1 micrograma por dia de BID administrado) não demonstrou como ótima a resposta como fizeram as três dosagens mais altas.

Em níveis de dosagem de 0,1 e 1 microgramas BID, a resposta de HIP2B demonstrou atenuação da doença face ao placebo. Como a concentração de HIP2B aumentou para 10 microgramas BID, a maior eficácia e atenuação de diabetes resultaram.

Em níveis de dose de 1000, 100 e 10 microgramas BID, a diabetes foi atenuada entre 60-70% do estado da doença máximo observada no grupo de placebo. A partir destes resultados, concluímos que o nível de dose mais baixa de HIP2B que irá providenciar eficácia ótima neste intervalo de 1-10 microgramas BID em camundongos ou dose humana equivalente de 0,5-1,0 mg/kg em humanos (30-60 mg BID). Esta dose é cerca de 1/10 da dosagem usada nos ensaios INGAP de Fase 2B (600 mg/dia).

Exemplo 14

Um estudo farmacocinético foi realizado para confirmar a melhoria na biodisponibilidade que foi conseguida com a estrutura HIP2B Otimizado. A biodisponibilidade absoluta e estudo farmacodinâmico foram realizados em ratos Sprague Dawley após administração de dose intravenosa e subcutânea de HIP2 (Figura 24), HIP2B Otimizado e INGAP. O objetivo foi determinar a absorção, biodisponibilidade absoluta e níveis de plasma de HIP2, HIP2B Otimizado e INGAP em ratos machos após duas vias diferentes de administração.

Seis Grupos de cinco ratos machos Sprague Dawley foram administrados com HIP2, HIP2B ou INGAP por vias intravenosa e subcutânea, como se segue na tabela abaixo.

Grupo	Via de administração	Artigo teste	Conc. Nom. (mg/ml)	Vol. Dose (ml/kg)	Nível Nom. Dose (mg/kg)
1	Subcutânea	HIP2	2	2	4
2	Intravenosa	HIP2	2	2	4
3	Subcutânea	HIP2B	2	2	4

4	Intravenosa	HIP2B	2	2	4
5	Subcutânea	INGAP	2	2	4
6	Intravenosa	INGAP	2	2	4

Dez amostras de plasma de sangue em série (0,03 ml cada) foram recolhidas do cateter de veia jugular de cinco animais por grupo aos 5, 10, 15, 30 minutos, 45 minutos seguido pelas amostras às 1, 2, 3, 8 e 24 horas após dose. O plasma foi recolhido em tubos que continham EDTA. Após a recolha, as amostras foram mantidas refrigeradas em embalagens frias antes da centrifugação e transferidas para tubos de microcentrifugadora pré-etiquetados para armazenamento a -70 °C ou abaixo.

As amostras de plasma de rato de 200 µl cada foram adicionadas ao tubo de microcentrifugadora que continha 1 ml de acetonitrilo (0,07% de ácido trifluoroacético, TFA) e agitado com um misturador vórtex durante 1 min., seguido por uma centrifugação para remover as proteínas de plasma precipitadas. A solução sobrenadante foi removida e evaporada, usando um Speed Vac para secagem. Ao tubo de microcentrifugadora que contém o granulado seco foi adicionado 200 µl de 20:80 acetonitrilo: água (contendo 0,07% de TFA). A amostra foi centrifugada para remover qualquer material insolúvel e a solução sobrenadante transferida para frascos analíticos para análise LC/MS MS. O espectrómetro de massa foi calibrado para detetar o íão/iões produto mais abundantes observados para cada uma das amostras de referência respectivas de HIP2B (M=286.0), HIP2 (M=287.1) e INGAP (M=212.2, 356.1, 373.9). As amostras de plasma de HIP2B Otimizado, HIP2 e INGAP foram analisadas numa coluna de fase reversa C-18 (50 mm x 2.0 mm, Varian Pursuit XRS3) usando 0,07% de TFA em H₂O como solução-tampão A e 0,07% de TFA em acetonitrilo como solução-tampão

B. O gradiente linear de 98% A/2% B, progredindo para 100% B durante 9 minutos, foi usado a uma taxa de fluxo de 0,4 ml/min.

Os seguintes controlos de plasma foram tratados como acima descrito e usados para definir uma curva de concentração padrão:

- *Blank Plasma* como um controlo de fundo
- Cinco amostras de plasma padrão contendo $6,7 \times 10^4$, $6,7 \times 10^3$, $6,7 \times 10^2$, 67 e 6,7 ng/ml de HIP2B, HIP2 e INGAP

As amostras de dosagem retidas de HIP2B Otimizado, HIP2 e INGAP foram também analisadas por LC/MSMS para determinar a concentração de cada um do tempo de injeção. A análise confirmou a concentração, dentro do erro experimental, a ser 2 mg/ml. Todos os animais parecem normais, todas as vezes pós-dosagem e após cada via de administração. HIP2 e INGAP: Após administração intravenosa ou subcutânea de HIP2, os níveis muito baixos de HIP2 foram observados apenas em cinco segundos após dosagem com todas as amostras subsequentes estando abaixo do limite de quantificação. Após a administração intravenosa ou subcutânea de INGAP, todas as amostras de plasma medidas estavam abaixo do limite inferior de quantificação. Como resultado, os parâmetros farmacocinéticos de plasma para HIP2 e INGAP, após administração de dose intravenosa e subcutânea, não podem ser calculados.

Após administração intravenosa de HIP2B, as concentrações de plasma HIP2B rejeitaram de uma forma monofásica, com uma semivida de plasma de fase terminal média de 0,19 horas (11 minutos). O C_{\max} médio foi de 8237 ng/ml que ocorreu no

primeiro ponto temporal de amostragem de 5 minutos. O C_0 médio foi estimado ser 18805 ng/ml. O $AUC_{0-\infty}$ médio foi de 2231 ng*hr/ml. A remoção de plasma média aparente foi de 1,9 l/hr/kg com um volume médio aparente de distribuição de 0,48 l/kg.

Após administração subcutânea de HIP2B Otimizado, o HIP2B diminuiu numa forma monofásica com uma semivida de plasma de fase terminal média de 0,34 horas (20 minutos). O $AUC_{0-\infty}$ médio foi de 1932 ng*hr/ml. O Cl/F médio aparente foi de 2,1 l/hr/kg com uma média aparente de V_z/F de 1 l/kg. A biodisponibilidade subcutânea absoluta de HIP2B foi de 87%. A Figura 25 mostra que os farmacocinéticos de administração subcutânea de HIP2B Otimizado, os níveis de plasma de HIP2B Otimizado foram detetáveis até 2 horas com um $t_{1/2}$, e de ~20 minutos.

As concentrações de plasma INGAP foram indetetáveis em qualquer ponto temporal, indicando que o INGAP é rapidamente removido e/ou metabolizado.

Os níveis de plasma de HIP2B otimizado são significativamente mais altos relativamente a HIP2 ou INGAP após administração subcutânea. Com base nos perfis de plasma cromatográficos LC/MS multi-pico observados. O HIP2B Otimizado é muito menos provável de ser rapidamente metabolizado *in vivo*, em comparação ao HIP2 e INGAP. A biodisponibilidade de HIP2B é 87%.

A Figura 24 mostra a análise LC/MS MS das amostras de HIP2B Otimizado, HIP2 e INGAP derivadas do plasma de rato como parte de uma análise PK na qual HIP2B, HIP2 e INGAP foram administrados em dose por injeção via subcutânea ou intravenosa em 4 mg/kg.

Após administração subcutânea, os níveis de HIP2B foram detetáveis até 1,5 hr. O $T_{1/2}$ é aproximadamente 0,5 hr. Níveis muito baixos de HIP2 foram detetados aos 5 minutos sem detecção subsequente após 5 minutos. Com base no perfil cromatográfico LC/MS multi-pico observado de HIP2B otimizado é menos rapidamente metabolizado *in vivo* em comparação com HIP2.

As concentrações de INGAP foram indetetáveis em qualquer ponto temporal indicando que o INGAP é rapidamente removido e/ou metabolizado.

A tabela em baixo resume estes dados.

Análise PK comparativa

Peptídeo	Via	Dose (mg/	C ₀ (ng/ml)	C _{máx} (ng/ml)	t _{máx} (h)	C _{1h} (ng/ml)	AUC _(0-x) (ng*h/ ml)	T _{1/2} (h)	F
HIP2B	SQ	4	na	2739	0,167	611,5	1932	0,34	0,87
	IV	4	18805	8237	0,083	114	1614,3	0,19	na
HIP2	SQ	4	na	32	0,083	0	2,7	0,02	0,01
	IV	4	18805	29	0,083	0	441,9	0,02	na
INGAP	SQ	4	na	0	na	0	0,0	< 0,025	0,00
	IV	4	18805	0	na	0	439,5*	< 0,025	na
n=5; na, não aplicável,									
* extrapolado									

Concluimos que os níveis de plasma de HIP2B otimizado são significativamente mais altos relativamente a HIP2 ou INGAP após administração subcutânea.

Os níveis de plasma de HIP2B são significativamente mais altos relativamente a HIP ou INGAP após administração IV. Após injeção intravenosa, o HIP2B otimizado mostra uma depleção dependente de tempo com concentrações não detetáveis durante 45 min. O $T_{1/2}$ demora aproximadamente 9 minutos. O HIP2 foi observado apenas no ponto temporal de 5 minutos e INGAP não foi detetado em qualquer ponto temporal, indicando que ambos são rapidamente removidos e ou metabolizados.

Apesar de a presente invenção ter sido descrita em pormenor considerável com referência a determinadas formas de realização da mesma, outras versões são possíveis.

Lisboa, 27 de Março de 2015

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> CureDM, Inc. Levetan, Claressa S.

<120> COMPOSIÇÕES E PROCEDIMENTOS DE UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS PRO-ILHOTA
E SEUS ANÁLOGOS

<130> 132163.00502

<150> US 60/969,019

<151> 2007-08-30

<150> US 60/979,526

<151> 2007-10-12

<150> US 60/991,964

<151> 2007-12-03

<150> US 61/031,479

<151> 2008-02-26

<160> 94

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 528

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgctgcctc ccatggccct gccagtgta tcttgatgc tgctttcctg cctcatgctg	60
ctgtctcagg ttcaagggtga agaaccccag aggggaactgc cctctgcacg gatccgctgt	120
cccaaaggct ccaaggccta tggctccac tgctatgcct tgtttttgc accaaaatcc	180
tggacagatg cagatctggc ctgccagaag cggccctctg gaaacctggt gtctgtgctc	240
agtggggctg agggatcctt cgtgtcctcc ctggtgaaga gcattggtaa cagctactca	300
tacgtctgga ttgggctcca tgacccaca cagggcaccg agcccaatgg agaagggttg	360
gagtggagta gcagtgatgt gatgaattac ttgcatggg agagaaatcc ctccaccatc	420
tcaagccccc gccactgtgc gagcctgtcg agaagcacag catttctgag gtggaaagat	480
tataactgta atgtgaggtt accctatgtc tgcaagttca ctgactag	528

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 2

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 3

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 4

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> LOCAL
 <222> (1)..(1)
 <223> ACILAÇÃO

<220>
 <221> AMIDAÇÃO
 <222> (15)..(15)

<400> 5

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> (1)..(1)
<223> ACILAÇÃO

<220>
<221>AMIDAÇÃO
<222> (15)..(15)

<400> 6

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
1 5 10 15

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> (1)..(1)
<223>ACILAÇÃO

<220>
<221> AMIDAÇÃO
<222> (14)..(14)

<400> 7

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DISULFID
<222> (15)..(15)

<400> 11

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DISULFID
<222> (17)..(17)

<400> 12

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
1 5 10 15

Cys

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DISULFID
<222> (15)..(15)

<400> 13

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 14

<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> {1}..(1)
<223>ACILAÇÃO

<220>
<221>AMIDAÇÃO
<222> {16}..(16)

<400> 14

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> {1}..(1)
<223>ACILAÇÃO

<220>
<221>AMIDAÇÃO
<222> {16}..(16)

<400> 15

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> {1}..(1)
<223>ACILAÇÃO

<220>
<221>AMIDAÇÃO
<222> {15}..(15)

<400> 16

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> {1}..(1)
<223>ACILAÇÃO

<220>
<221> DISULFID
<222> {16}..(16)

<220>
<221>AMIDAÇÃO
<222> {16}..(16)

<400> 17

Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Gln	Gly	Thr	Glu	Pro	Asn	Gly	Glu	Cys
1				5					10					15	

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> {1}..(1)
<223>ACILAÇÃO

<220>
<221> DISULFID
<222> {16}..(16)

<220>
<221>AMIDAÇÃO
<222> {16}..(16)

<400> 18

Trp	Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Gln	Gly	Thr	Glu	Pro	Asn	Gly	Cys
1				5					10					15	

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> {1}..(1)
<223>ACILAÇÃO

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> LOCAL
<222> (1)..(1)
<223> ACILAÇÃO

<220>
<221> LOCAL
<222> (16)..(16)
<223> PEGUILAÇÃO

<220>
<221> AMIDAÇÃO
<222> (16)..(16)

<400> 23

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> LOCAL
<222> (1)..(1)
<223> ACILAÇÃO

<220>
<221> LOCAL
<222> (16)..(16)
<223> PEGUILAÇÃO

<220>
<221> AMIDAÇÃO
<222> (16)..(16)

<400> 24

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DISULFID
<222> (15)..(15)

<220>
<221>AMIDAÇÃO
<222> (15)..(15)

<400> 19

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> (16)..(16)
<223>PEGUILAÇÃO

<400> 20

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> (16)..(16)
<223>PEGUILAÇÃO

<400> 21

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>LOCAL
<222> (15)..(15)
<223>PEGUILAÇÃO

<400> 22

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> LOCAL
<222> (1)..(1)
<223> ACILAÇÃO

<220>
<221> LOCAL
<222> (16)..(16)
<223> PEGUILACÃO

<220>
<221> AMIDAÇÃO
<222> (16)..(16)

<400> 23

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> LOCAL
<222> (1)..(1)
<223> ACILACÃO

<220>
<221> LOCAL
<222> (16)..(16)
<223> PEGUILACÃO

<220>
<221> AMIDAÇÃO
<222> (16)..(16)

<400> 24

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> LOCAL
<222> (1)..(1)
<223> ACILAÇÃO

<220>
<221> LOCAL
<222> (15)..(15)
<223> PEGUILAÇÃO

<220>
<221> AMIDAÇÃO
<222> (15)..(15)

<400> 25

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 26

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 27

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser
1 5 10 15

<210> 28
<211> 175
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Leu Ile Leu Leu Cys Gln Val Gln Gly Glu Glu Thr Gln Lys Glu
 20 25 30
 Leu Pro Ser Pro Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly
 35 40 45
 Ser Pro Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Met Asp Ala
 50 55 60
 Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val Leu
 65 70 75 80
 Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Arg Ser Ile Ser
 85 90 95
 Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly
 100 105 110
 Ser Glu Pro Asp Gly Asp Gly Trp Glu Trp Ser Ser Thr Asp Val Met
 115 120 125
 Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Lys Asn Pro Ser Thr Ile Leu Asn Pro Gly
 130 135 140
 His Cys Gly Ser Leu Ser Arg Ser Thr Gly Phe Leu Lys Trp Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Asn Cys Asp Ala Lys Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Lys Asp
 165 170 175

<210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
 1 5 10

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
 1 5 10 15

<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> Pan troglodytes
<400> 31

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly
1 5 10 15

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus
<400> 32

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser
1 5 10 15

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 33

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly
1 5 10 15

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 34

Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly
1 5 10 15

<210> 35
<211> 16
<212> PRT
<213> Bos taurus
<400> 35

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala Gly
1 5 10 15

<210> 36
<211> 16
<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 36

Trp Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala Asp
1 5 10 15

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> *Ovis aries*

<400> 37

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala Gly
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pan troglodytes*

<400> 38

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mesocricetus auratus*

<400> 39

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 40

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 41

Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 42

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 43

Trp Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 44

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
1 5 10 15

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 45

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 46

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 48

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 49

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
1 5 10

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<400> 50

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
1 5 10

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Ovis aries

<400> 51

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
1 5 10

<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<400> 52

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly
1 5 10 15

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 53

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly
1 5 10 15

<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 54

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly
1 5 10 15

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 55

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Ser Glu Pro Asp Ala Gly
1 5 10

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<400> 56

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala Asp
1 5 10 15

<210> 57
<211> 15
<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 57

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala Gly
1 5 10 15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10 15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Asp
1 5 10 15

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 60

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 61

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 63
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 63

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 64

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
 1 5 10

<210> 65
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 65

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
 1 5 10

<210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

<400> 66

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
 1 5 10

<210> 67
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 67

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp
 1 5 10

<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 69

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 70
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70

Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Arg Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 71
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 71

Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Ser Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 72
<211> 14
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 72

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 73

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 74

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 74

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gly Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 75

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg
1 5 10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Ala Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Tyr Glu Pro Asn Arg
 1 5 10

<210> 79
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 79

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg
 1 5 10

<210> 80
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mesocricetus auratus
 <400> 80

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 81
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 81

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
 1 5 10

<210> 82
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 82

Ile Gly Leu His Asp Leu Ser Leu Gly Ser Leu Pro Asn Glu
 1 5 10

<210> 83
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 83

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Ala Asn Ala
 1 5 10

<210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 84

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 85
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp
1 5 10

<210> 86
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 86

Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Lys Gln Leu Trp Gln Trp
1 5 10

<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<400> 87

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 88

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
1 5 10

<210> 89
<211> 14
<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 89

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
1 5 10

<210> 90

<211> 14

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 90

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
1 5 10

<210> 91

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> LOCAL

<222> (1)..(1)

<223> PEGUILAÇÃO

<400> 91

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 92

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 94

<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220> LOCAL
<221>
<222> (1)..(1)
<223> ACILAÇÃO

<220> AMIDAÇÃO
<221>
<222> (15)..(15)

<220>
<221> LOCAL
<222> (15)..(15)
<223> ADUTO DE CISTEÍNA

<400> 94

Ile Gly His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys Cys
1 5 10 15

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- US 2007087971 A **[0002]**
- US 60969019 B **[0272]**
- US 60979526 B **[0272]**
- US 60991964 B **[0272]**
- US 61031479 B **[0272]**

Literatura não-patente citada na descrição

- ROSENBERG et al. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1992, vol. 321, 95-104 [0114]
- *Diabetologia*, March 1996, vol. 39 (3), 256-62 [0114]
- *Pancreas*, July 1996, vol. 13 (1), 38-46 [0114]
- *Ann. Surg.*, November 2004, vol. 240 (5), 875-84 [0114]
- VINIK et al. *Horm. Metab. Res.*, June 1997, vol. 29 (6), 278-93 [0114]
- YOUNG et al. *Curr. Opin. Endocrin. Diabetes*, 1997, vol. 4, 282-290 [0115]
- ALCANTARA et al. *Cell Biochem. Funct.*, 1998, vol. 16 (1), 51-6 [0116]
- DUPRE et al. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 2004, vol. 89 (7), 3469-73 [0116]
- EDWARDS et al. *Diabetes*, 1999, vol. 48, 86-93 [0116]
- XU et al. *Diabetes*, 1999, vol. 48, 2270-76 [0116]
- CREUTZFELDT. *Diabetologia*, 1979, vol. 16, 75-85 [0117]
- CREUTZFELDT ; EBERT. *Diabetologia*, 1985, vol. 28, 565-573 [0117]
- HOLST et al. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2001, vol. 234, 75-85 [0117]
- VILSBOLL et al. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, June 2003, vol. 88 (6), 2706-13 [0117]
- ANDERSEN et al. *J. Clin. Invest.*, 1978, vol. 62, 152-161 [0118]
- CREUTZFELDT et al. *Diabetes*, February 1980, vol. 29 (2), 140-5 [0118]
- DUPRÉ et al. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 1973, vol. 37, 826-828 [0118]
- EBERT et al. *Clinical Gastroenterology*, 1980, vol. 9 (3), 679-98 [0118]
- ELAHI et al. *Am. J. Physiol.*, 1979, vol. 237, E185-E191 [0118]
- *Regulatory Peptide*, 1994, vol. 51 (1), 63-74 [0118]
- KRARUP et al. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, June 1983, vol. 56 (6), 1306-12 [0118]
- KRARUP et al. *Metabolism*, 1987, vol. 36 (7), 677-82 [0118]
- KRARUP et al. *Acta Med. Scand.*, 1988, vol. 223 (5), 437-41 [0118]
- LYNN et al. *FASEB*, 2003, vol. 17, 19-93 [0118]
- MEIR et al. *Regulatory Peptides*, 2002, vol. 107, 1-3 [0118]
- NAUK et al. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 1993, vol. 76 (4), 912-7 [0118]
- JONES et al. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 06 November 1989, vol. 7 (4), 263-9 [0119]
- ELAHI et al. *Regulatory Peptides*, 1994, vol. 51 (1), 63-74 [0120]
- GUTNIAK et al. *Diabetes Care*, 1994, vol. 17, 1039-44 [0120]
- KREYMANN et al. *Lancet*, 1987, vol. 2, 1300-1304 [0120]
- LARSEN et al. *Diabetes*, 1996, vol. 45 (2), 233A [0120]
- LARSEN et al. *Diabetes Care*, 2001, vol. 24 (8), 1416-21 [0120]
- LIST et al. *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.*, 2004, vol. 286 (6), E875-81 [0120]
- LUGARI et al. *Horm. Metab. Res.*, 2000, vol. 32, 424-428 [0120]
- MARQUEZ et al. *Cell Biochem. Funct.*, March 1998, vol. 16 (1), 51-6 [0120]
- MEIER et al. *Critical Care Medicine*, March 2004, vol. 32 (3), 848-851 [0120]
- MENEILLY et al. *Diabetes Care*, 2003, vol. 26, 2835-41 [0120]
- NAUK et al. *Diabetologia*, 1996, vol. 39 (12), 1546-53 [0120]
- THORENS et al. *Diabetes Metab.*, December 1995, vol. 21 (5), 311-8 [0120]
- VILSBOLL et al. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 2003, vol. 88 (6), 2706-13 [0120]
- WANG et al. *J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 99, 2883-2889 [0120]
- ZANDER et al. *Lancet*, 2002, vol. 359, 824-30 [0120]
- BACH et al. *Ann. Rev. Immun.*, 2001, vol. 19, 131-161 [0127]
- LERNMARK et al. *Endocrin. Metab. Clin. N. Am.*, vol. 20 (3), 589-617 [0127]
- MATHIS et al. *Nature*, December 2001, vol. 414 (6865), 792-798 [0127]
- HEROLD et al. *NEJM*, 30 May 2002, vol. 346 (22), 1692-1698 [0129]
- *Modern Pharmaceuticals*. Marcel Dekker, Inc, 1979 [0142]
- Goodman & Gilman's *The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*. MacMillan Publishing Co, 1980 [0142]
- MERRIFIELD, R.B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0186]
- FIELDS, G.B. ; NOBLE, R.L. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1990, vol. 35, 161-214 [0186]

Reivindicações

1. Um peptídeo pro-ilhota selecionado a partir do grupo que é composto por um peptídeo HIP1 (SEQ ID NO: 3), peptídeo HIP2 (SEQ ID NO: 4), peptídeo HIP3 (SEQ ID NO: 2), peptídeo REG3A de humano (SEQ ID NO: 30), peptídeo REG3G de humano (SEQ ID NO: 81), peptídeo REG1A de humano (SEQ ID NO: 67), peptídeo REG1B de humano (SEQ ID NO: 2), peptídeo REG3A de humano (SEQ ID NO: 85), peptídeo INGAP de hamster (SEQ ID NO: 27, 32, 39 ou 46), peptídeo REG2 de hamster (SEQ ID NO: 72), peptídeo REG3G de hamster (SEQ ID NO: 80), peptídeo REG1 de rato (SEQ ID NO: 69), peptídeo PAP/REG3B de rato (SEQ ID NO: 74), peptídeo PAP3 de rato (SEQ ID NO: 75), peptídeo REG3G de rato (SEQ ID NO: 79), peptídeo REG1 de camundongo (SEQ ID NO: 70), peptídeo REG2 de camundongo (SEQ ID NO: 71), peptídeo REG3A de camundongo (SEQ ID NO: 33, 40, 47 ou 53), peptídeo REG3B de camundongo (SEQ ID NO: 77), peptídeo REG3G de camundongo (SEQ ID NO: 78), peptídeo REG3S de camundongo (SEQ ID NO: 82), peptídeo REG4 de camundongo (SEQ ID NO: 86), peptídeo PTP de bovino (SEQ ID NO: 83), peptídeo REG3 de rato da Noruega (SEQ ID NO: 34, 41, 48 ou 54), peptídeo de chimpanzé de acordo com a SEQ ID No 31, peptídeo de chimpanzé de acordo com a SEQ ID NO: 38, peptídeo de chimpanzé de acordo com a SEQ ID NO: 45, peptídeo de chimpanzé de acordo com a SEQ ID NO: 52, peptídeo de chimpanzé de acordo com a SEQ ID NO: 60, peptídeo de bovino de acordo com a SEQ ID NO: 35, peptídeo de bovino de acordo com a SEQ ID NO: 42, peptídeo de bovino de acordo com a SEQ ID NO: 49, peptídeo de bovino de acordo com a SEQ ID NO: 55, peptídeo de bovino de acordo com a SEQ ID NO: 88, peptídeo de canino de acordo com a SEQ ID NO: 36, peptídeo de canino de acordo com a SEQ ID NO: 43, peptídeo de canino de acordo com a SEQ ID NO: 50, peptídeo de canino de acordo com a SEQ ID NO: 56, peptídeo de ovino

de acordo com a SEQ ID NO: 37, peptídeo de ovino de acordo com a SEQ ID NO: 44, peptídeo de ovino de acordo com a SEQ ID NO: 51, peptídeo de ovino de acordo com a SEQ ID NO: 57, em que o peptídeo e pro-ilhota compreendem uma modificação de otimização, e em que a dita modificação de otimização é um grupo amida C-terminal e um grupo acetil N-terminal.

2. O peptídeo da reivindicação 1, em que o dito peptídeo compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 25.

3. Uma composição farmacêutica que compreende um excipiente farmacêutico e o peptídeo pro-ilhota como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 2, numa quantidade terapeuticamente eficaz.

4. Uma composição farmacêutica da reivindicação 3, em que a dita quantidade terapeuticamente eficaz é de 0,5 a 5 mg/kg/dia.

5. Uma composição farmacêutica da reivindicação 3, em que a dita quantidade terapeuticamente eficaz é de 60 a 180 mg/kg/dia.

6. O peptídeo pro-ilhota como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 2 para usar na estimulação de neogénese de ilhota ou estimulação de regeneração de célula de ilhota pancreática.

7. O peptídeo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 2 para utilizar de acordo com a reivindicação 6, em que o dito peptídeo destina-se à

administração em combinação com um agente de regeneração de célula de ilhota pancreática, opcionalmente selecionado de peptídeos de pro-ilhota humano, análogos de peptídeo pro-ilhota humano, amilina, pramlintida, exendina-4, GIP, GLP-1, agonistas de recetor GLP-1, análogos GLP-1, peptídeo de INGAP de hamster, liraglutido, e inibidor da dipeptidil peptidase.

8. O peptídeo de pro-ilhota como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 2 para utilização no tratamento de uma patologia associada à função pancreática diminuída num paciente.

9. O peptídeo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 2 para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a patologia associada à função pancreática diminuída é selecionada de diabetes tipo 1, surgimento recente de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes autoimune latente de adulto, pré-diabetes, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída, síndrome de resistência à insulina, síndrome metabólica/síndrome dismetabólica, excesso de peso, obesidade, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, distúrbios alimentares, ciclos não ovulatórios e síndrome de ovários policísticos.

10. O peptídeo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 2 para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o dito peptídeo destina-se à administração em combinação com um agente que inibe, bloqueia ou destrói as células autoimunes que têm como alvo as células endócrinas pancreáticas, opcionalmente selecionadas de um ou mais dos seguintes agentes: anticorpos anti CD-3 incluindo hOKT3 γ 1 (Ala-Ala)

(teplizumab); ChAglyCD3 que visam a resposta imune e bloqueiam especificamente os linfócitos T que provocam a morte de células beta na diabetes tipo 1; o antígeno linfócito T citotóxico-4 lg (Abatacept); Sirolimus (Rapamicina) sozinho ou em combinação com Tacrolimus (FK506) ou IL-2 (rapamune); Rapamune sozinho ou em combinação com Proleucina (aldesleucina); uma proteína de choque térmico 60 (DIAPEP277), uma vacina Anti-Descarboxilase do Ácido Glutâmico 65 (GAD65); lisofilina, vacina IBC-VSO, interferão-alfa, vacina usando células T reguladoras específicas de antígeno CD4+CD25+; vacina de células dendríticas supressoras da diabetes, GSK189075, diazóxido e estatinas incluindo atorvastatina utilizados como um agente para preservar a função das células beta, Micofenolato de Mofetil sozinho ou em combinação com Daclizumab; o agente anti-CD20, Rituximab; Campath-1H (Anticorpo Anti-CD52), lisofilina; globulina antilinfócito T policlonal (ATG/Timoglobulina), fator de estimulação de colônia de granulócito, Neulasta (Pegfilgrastim), Vitamina D, 25-hidroxi e 1,25-hidroxivitamina D suplementar, vacina IBC-VSO, que é uma forma sintética, metabolicamente inativa de insulina concebida para evitar a destruição de células beta pancreáticas; interferão-alfa; uma vacina usando células T reguladoras específicas de antígeno CD4+CD25+ ou qualquer agente ou agentes concebidos para suprimir o ataque imune sobre as células beta dentro das ilhotas de Langerhans, Prochymal (Células Estaminais de Adulto Humano), o agente Anakinra anti-inflamatório e o agente anti-inflamatório, Deoxispergualina, um agente anti-inflamatório que bloqueia a produção de citocina pró-inflamatória e inibe as células T e células B.

Lisboa, 27 de Março de 2015

Resumo

As formas de realização relacionam-se com peptídeos pro-ilhota, preferencialmente HIP, que exibem maior estabilidade e eficácia, e métodos para utilização dos mesmos para tratar uma patologia associada à função pancreática diminuída, incluindo diabetes tipo 1 e tipo 2 e sintomas da mesma.

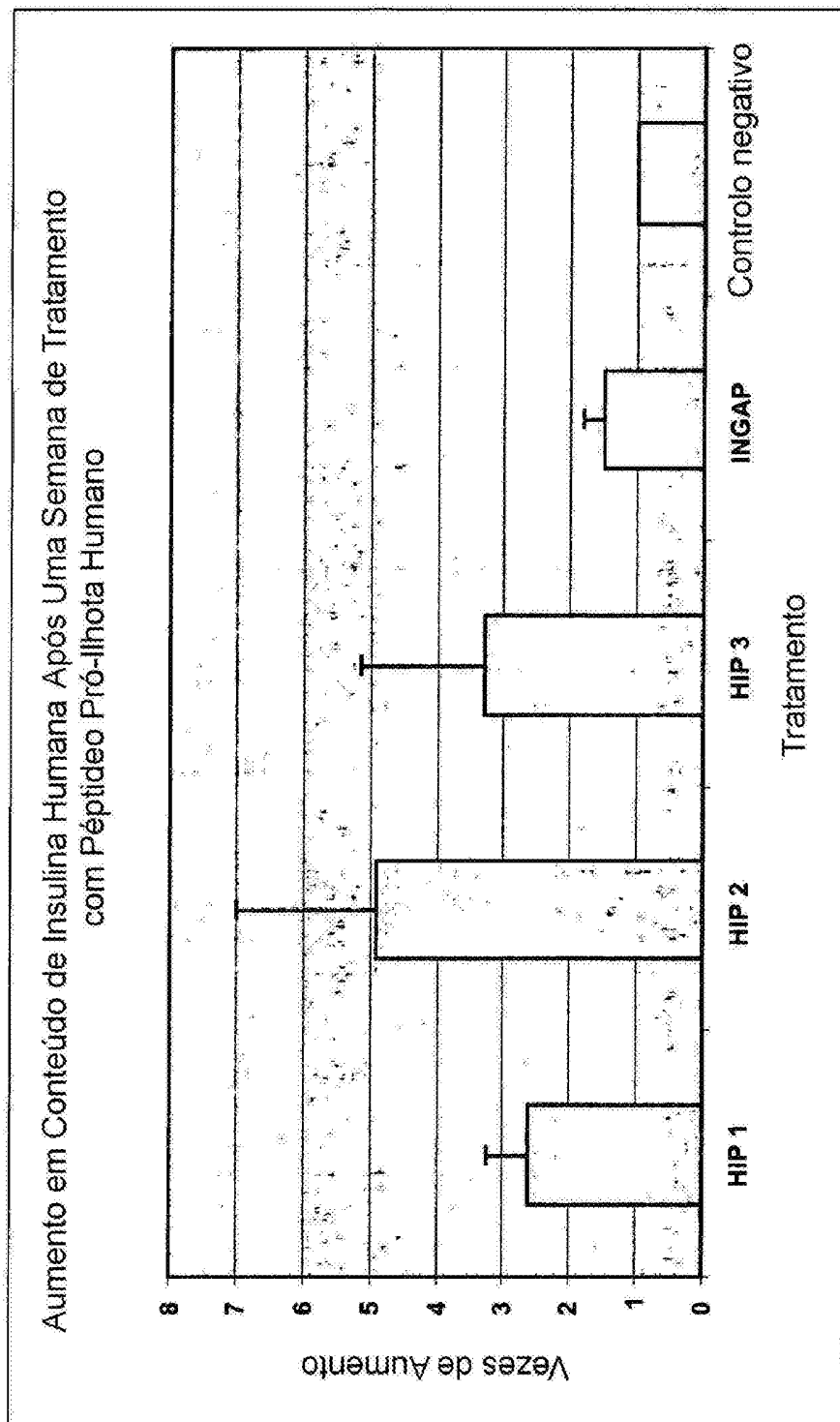


Fig. 1

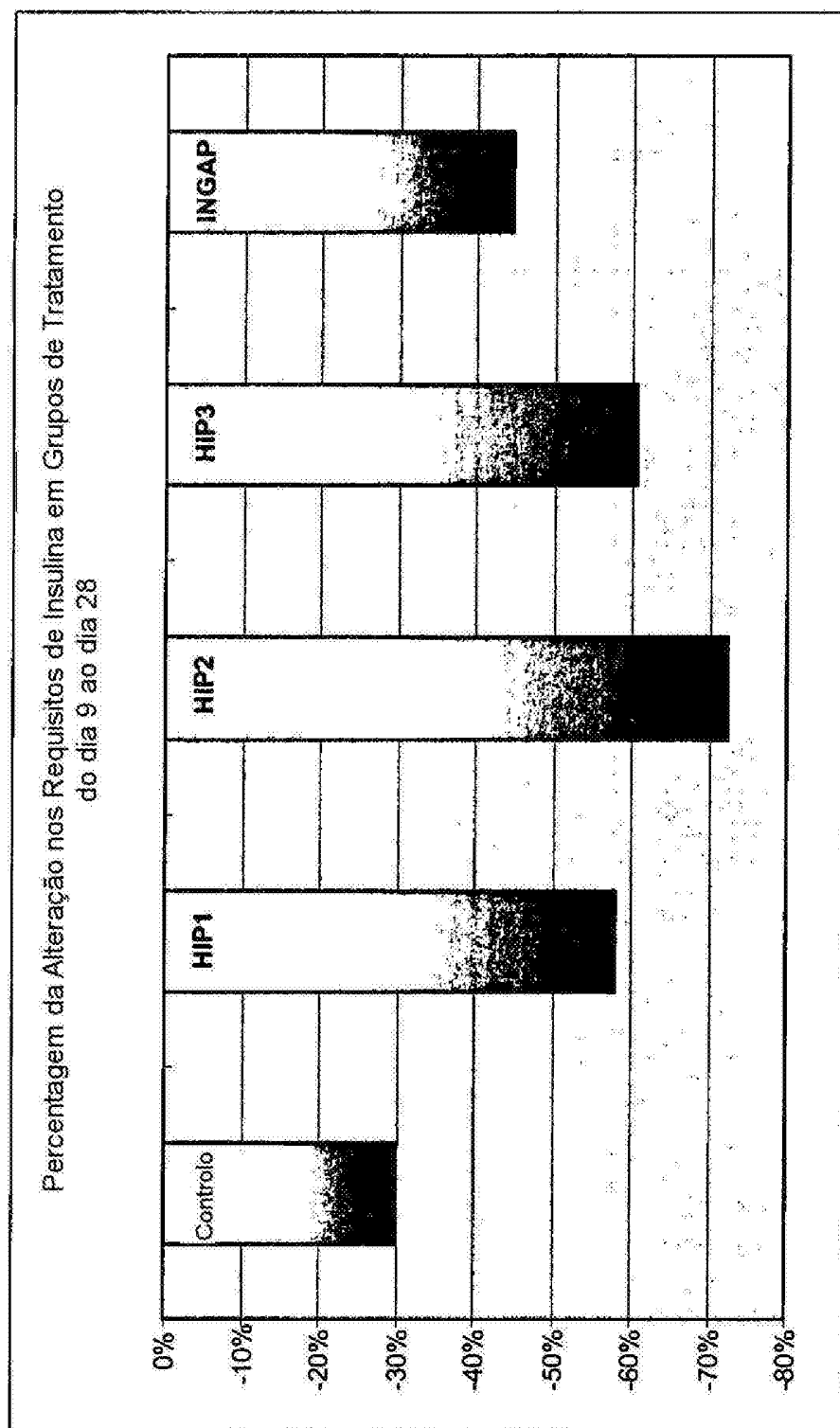


Fig. 2

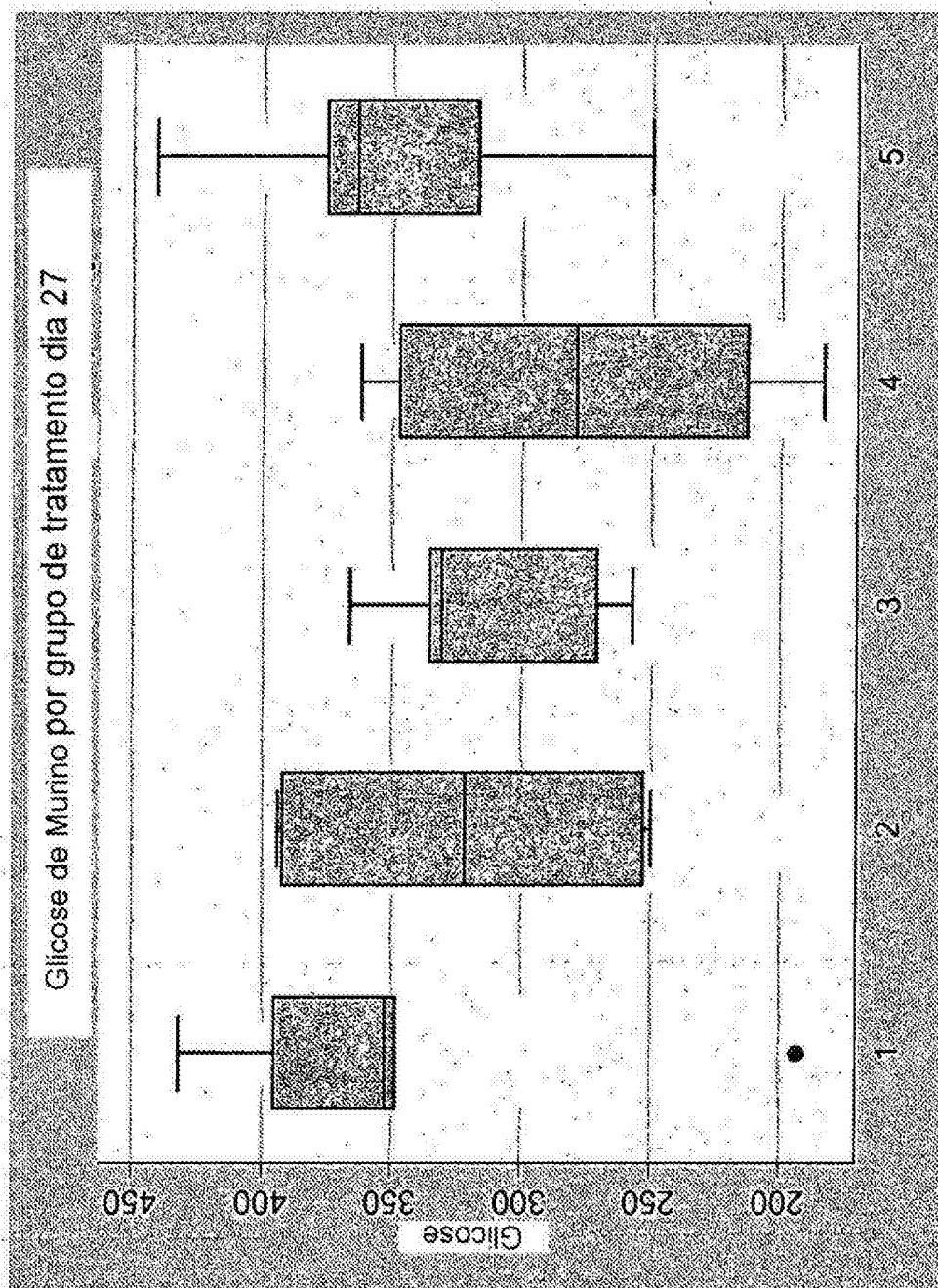


Fig. 3

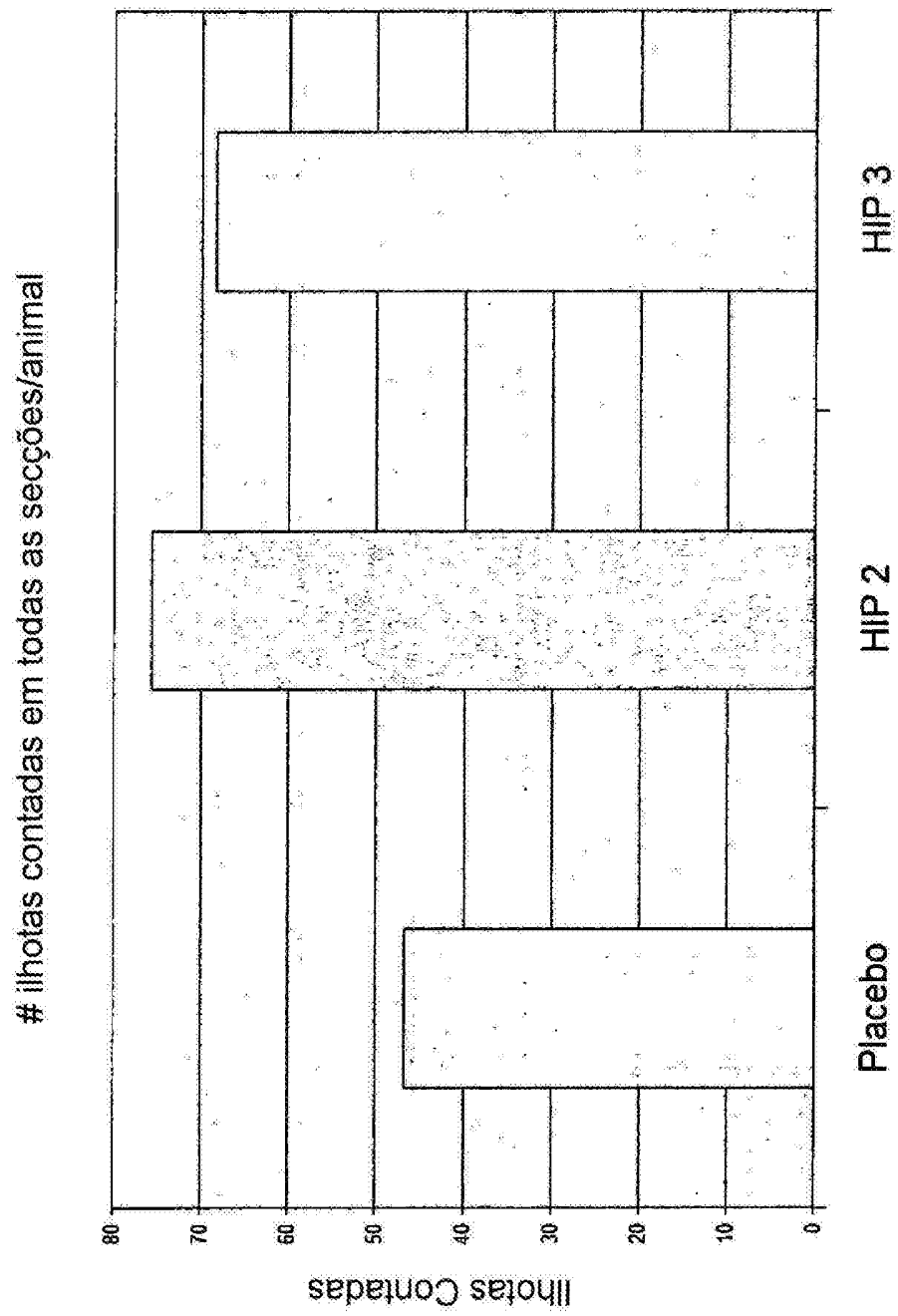


Fig. 4A

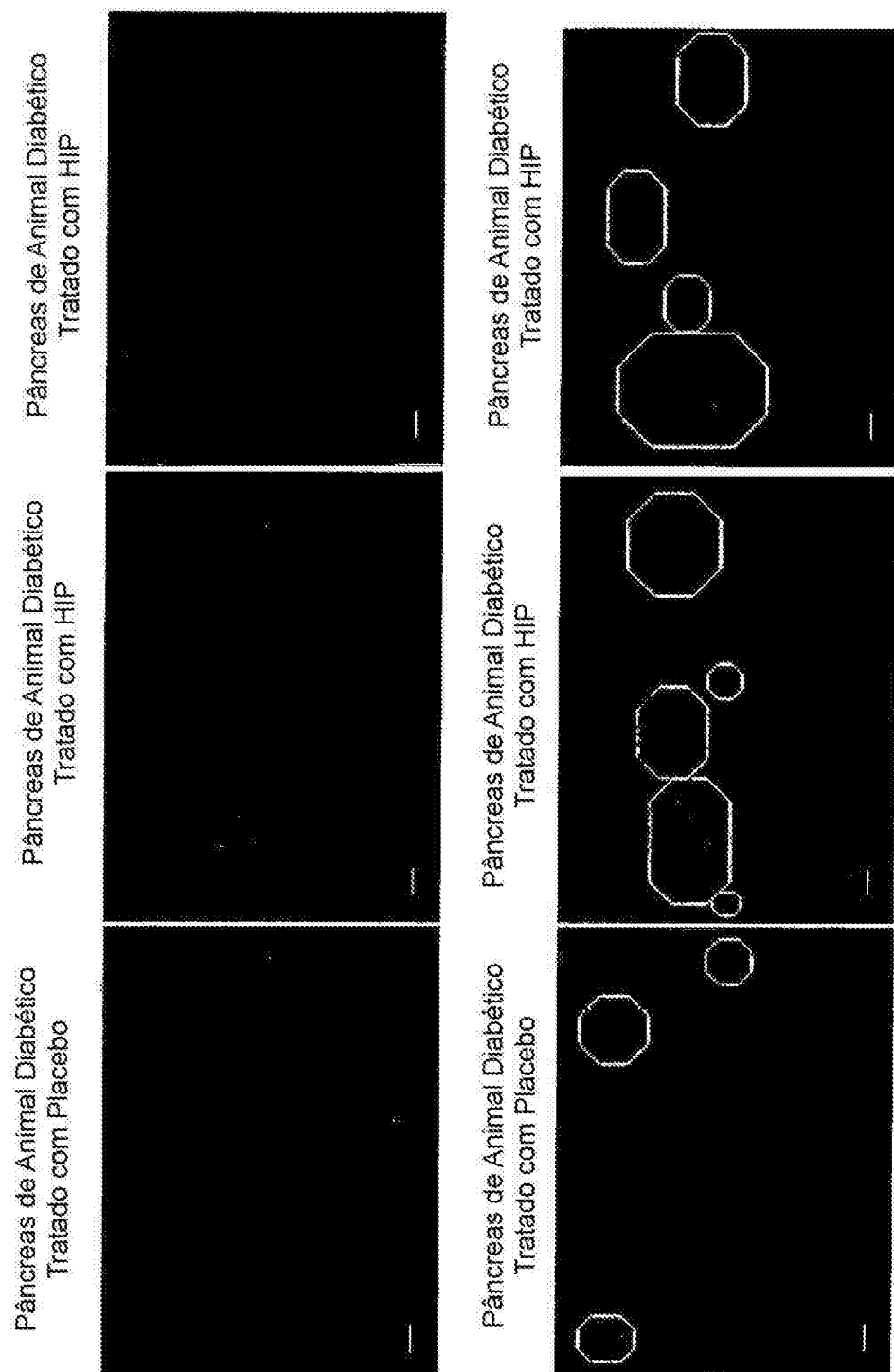
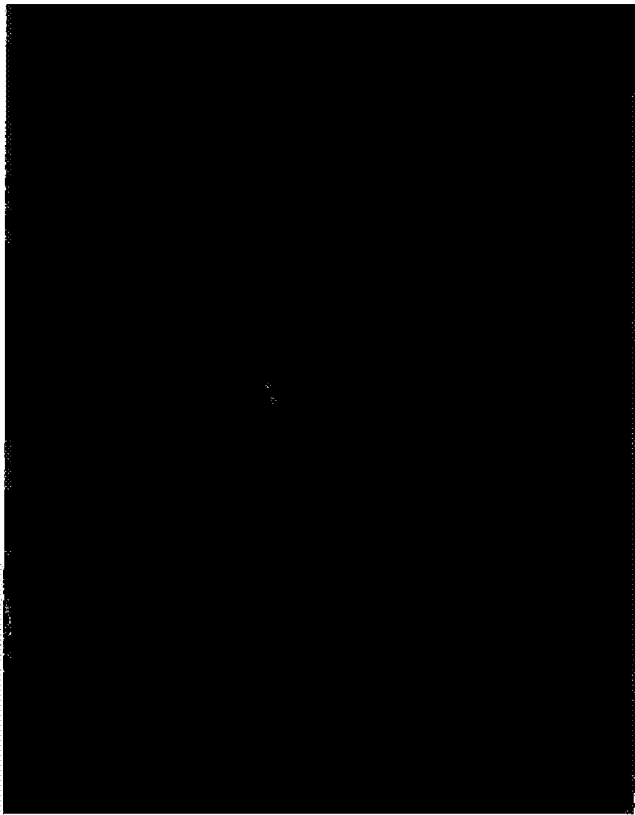


Fig. 4B



Controlo



Tratamento com HIP

Fig. 5

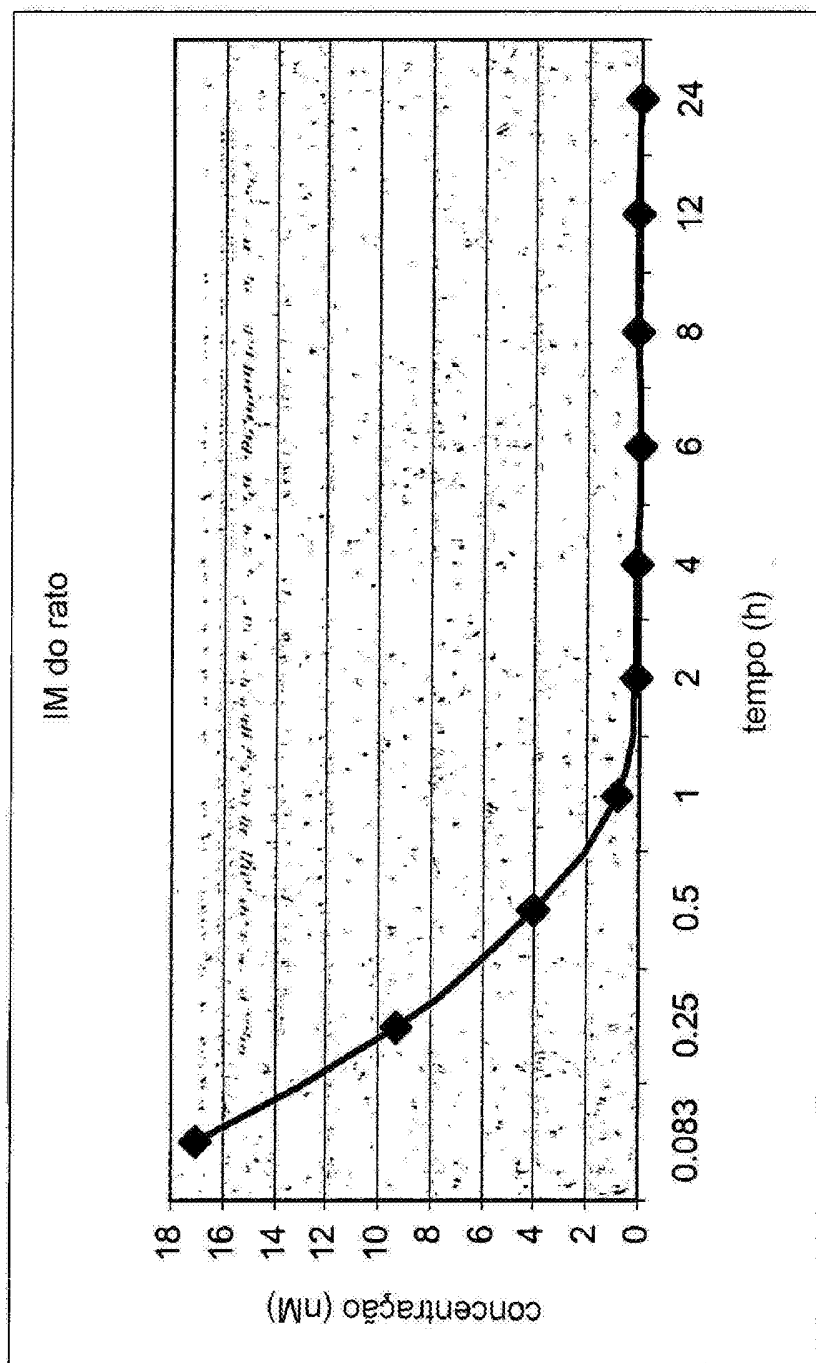


Fig. 6

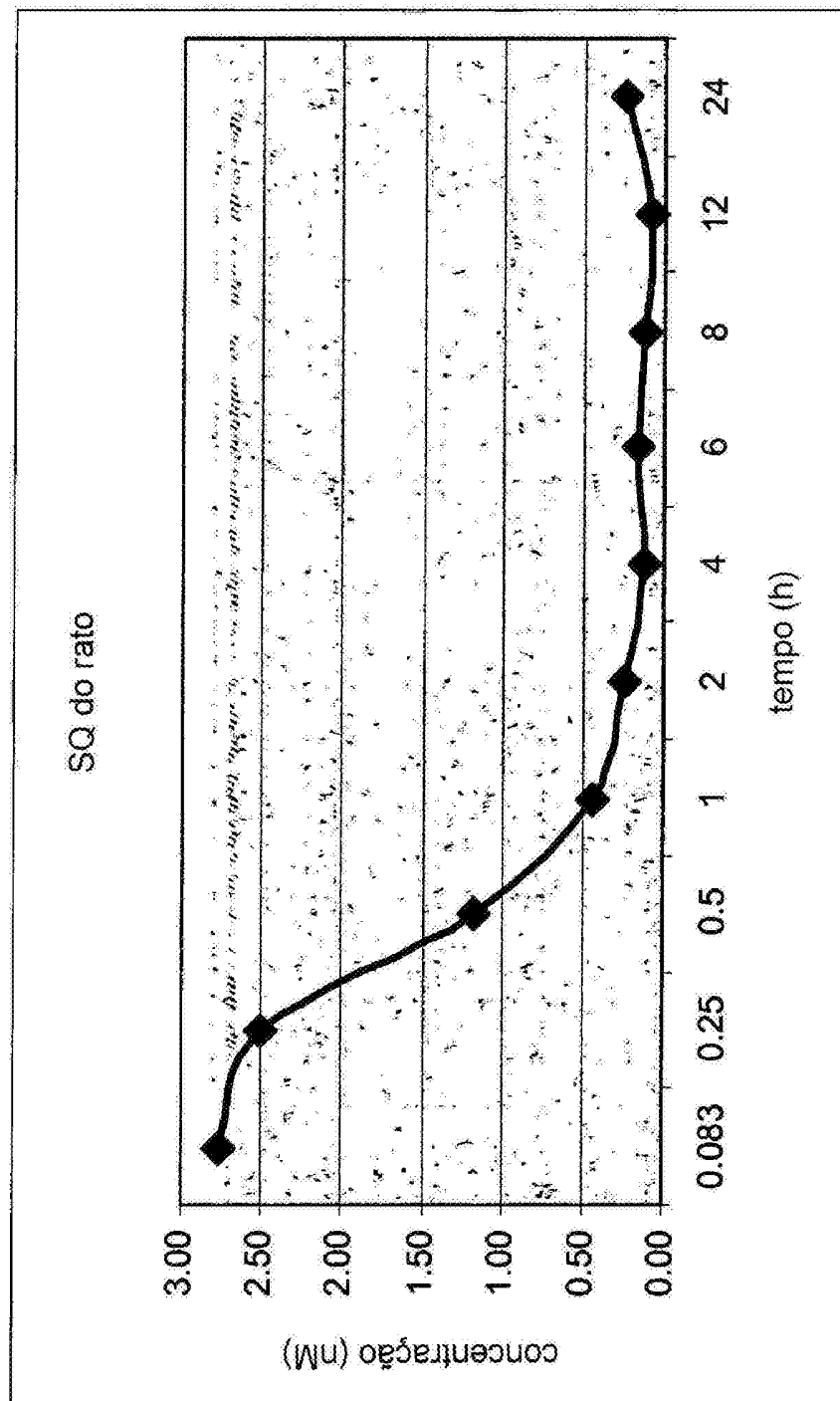


Fig. 7

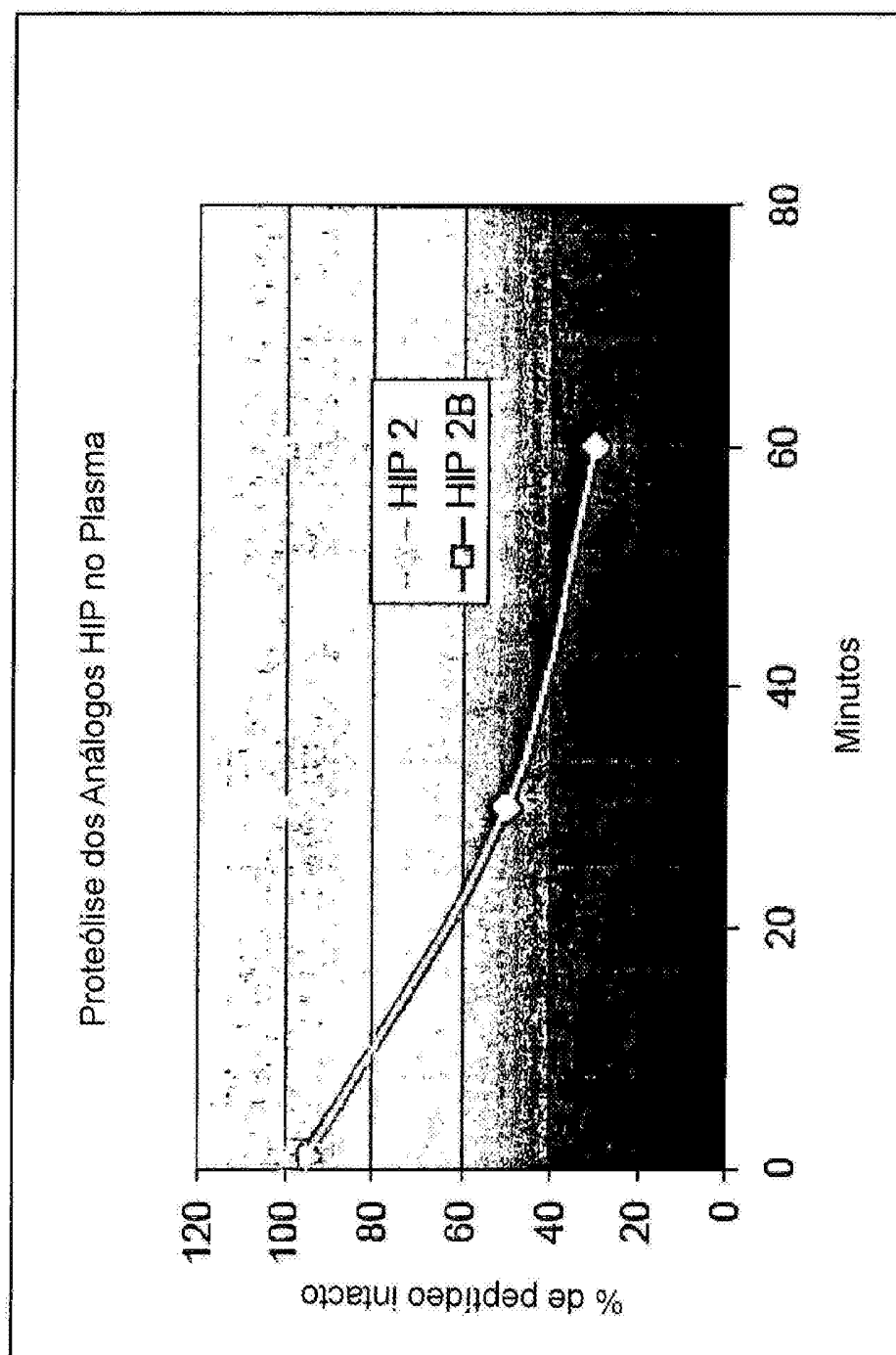


Fig. 8

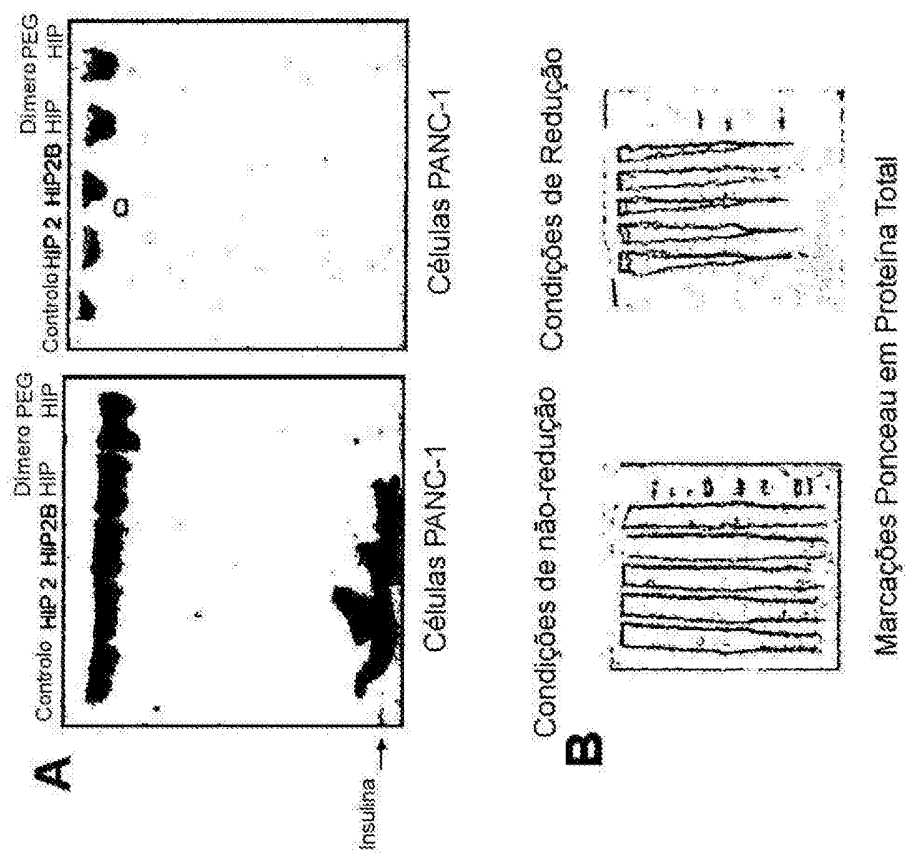


Fig. 9

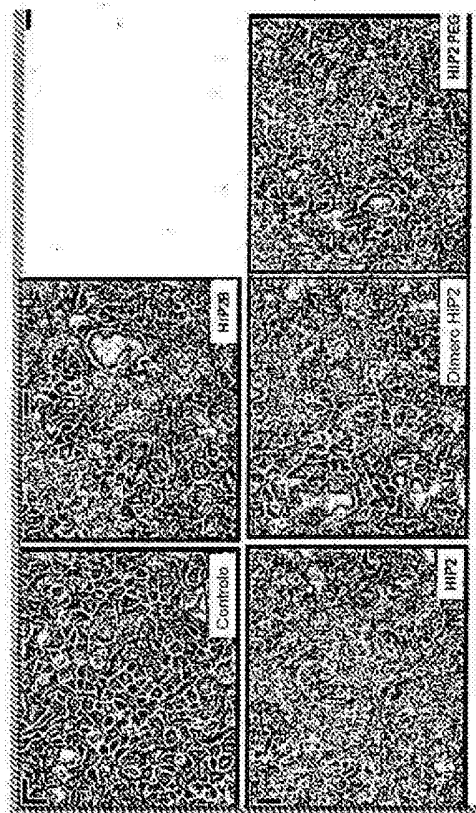


Fig. 10A

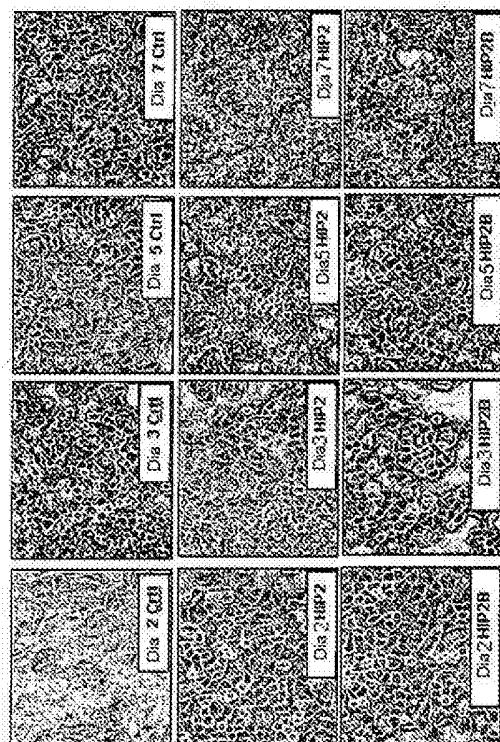


Fig. 10B

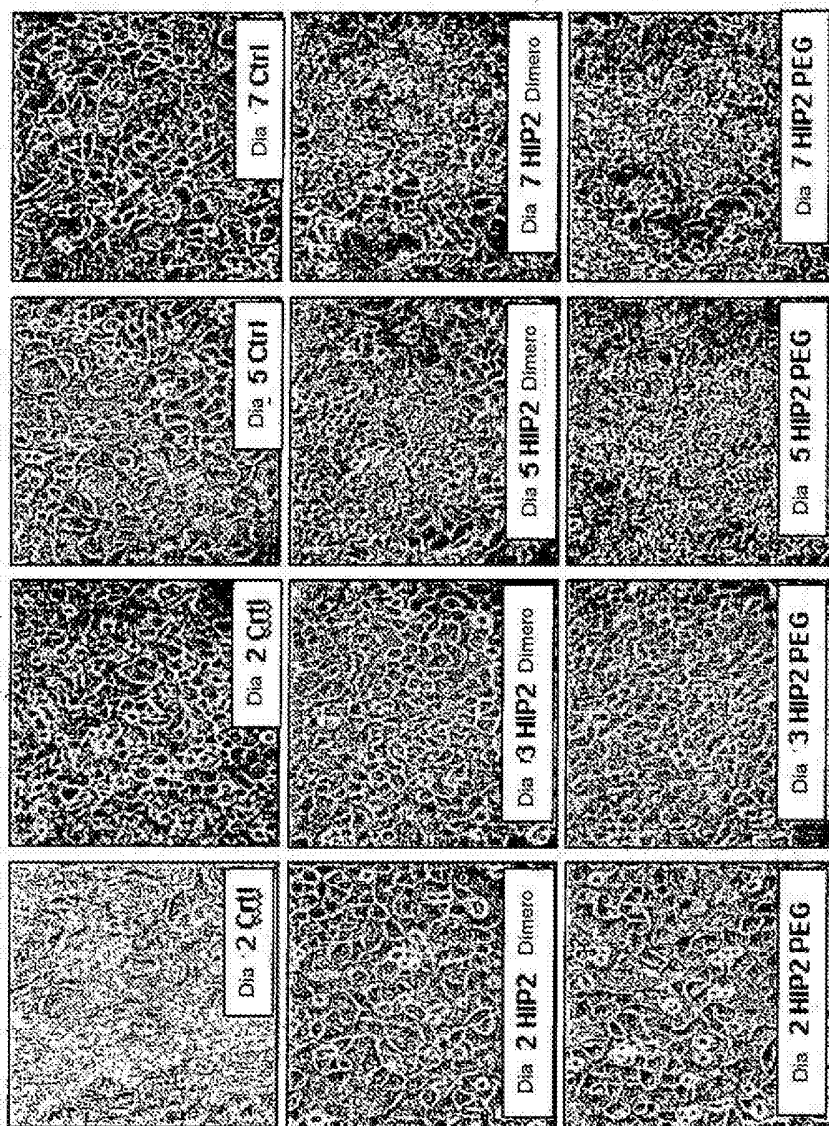


Fig. 10C

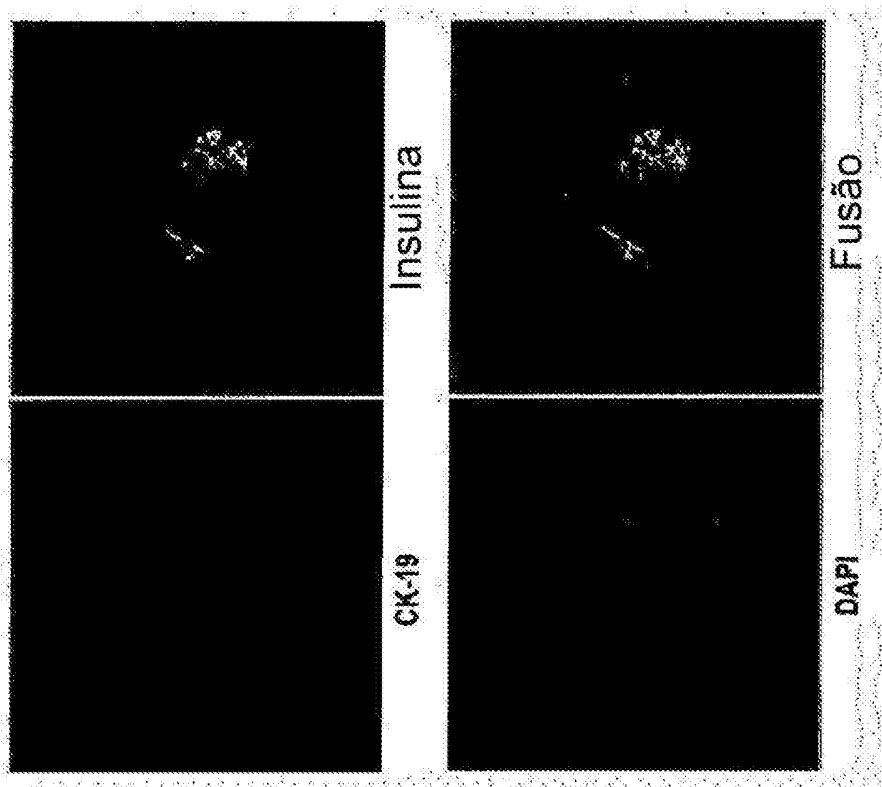


Fig. 11

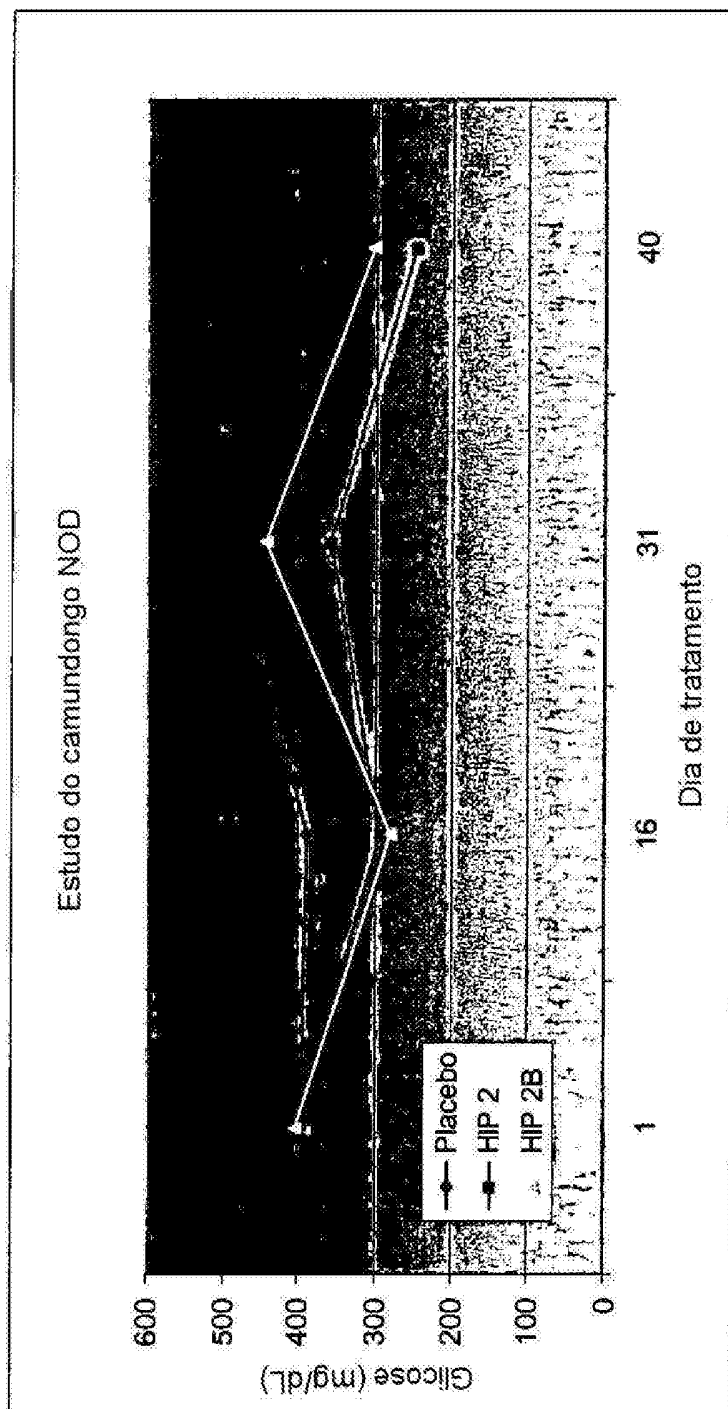


Fig. 12

Translocação do Recetor HIP após Estimulação do HIP e HIP Otimizado

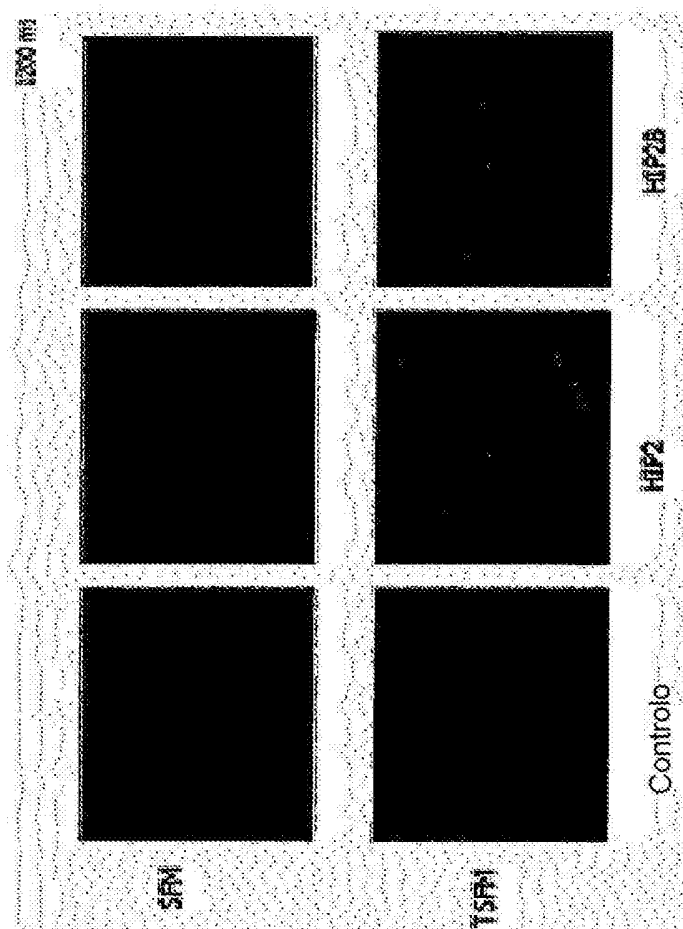


Fig. 13

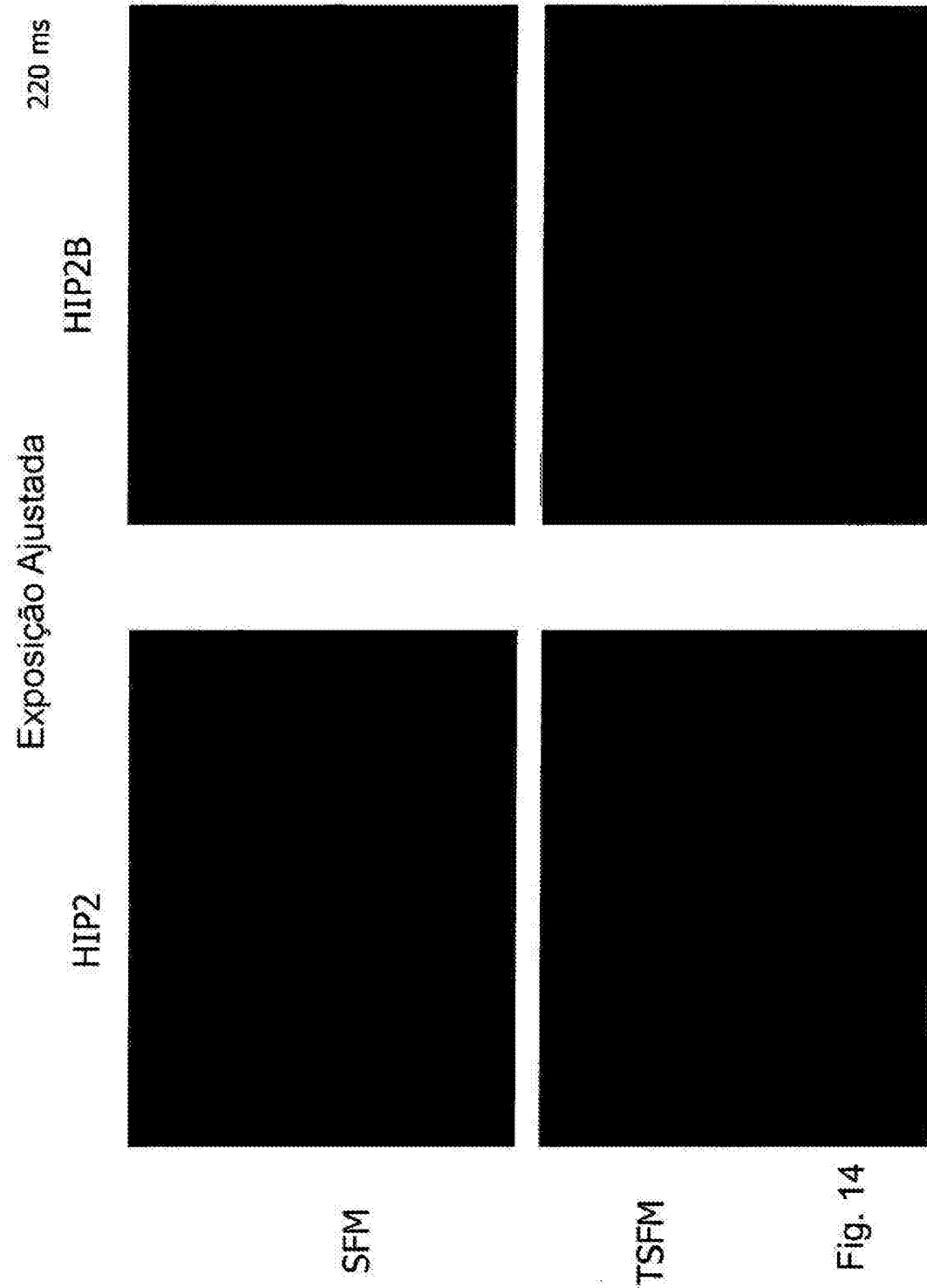


Fig. 14

Translocação do receptor HIP da membrana citoplasmática para núcleo após
estímulo com Peptídeos HIP2 Otimizados

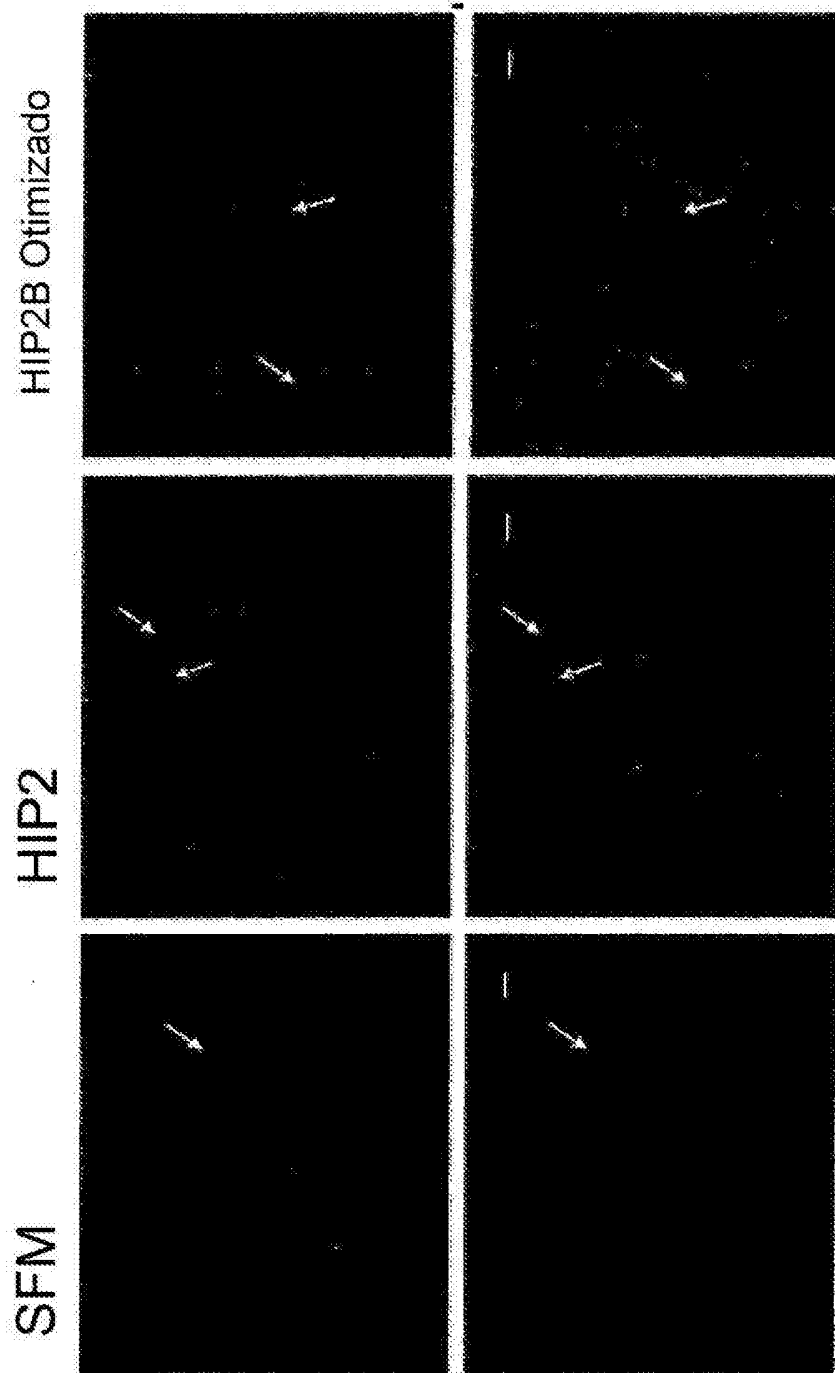


Fig. 15

Impacto de HIP2B Otimizado no tempo de translocação
do citoplasma para núcleo

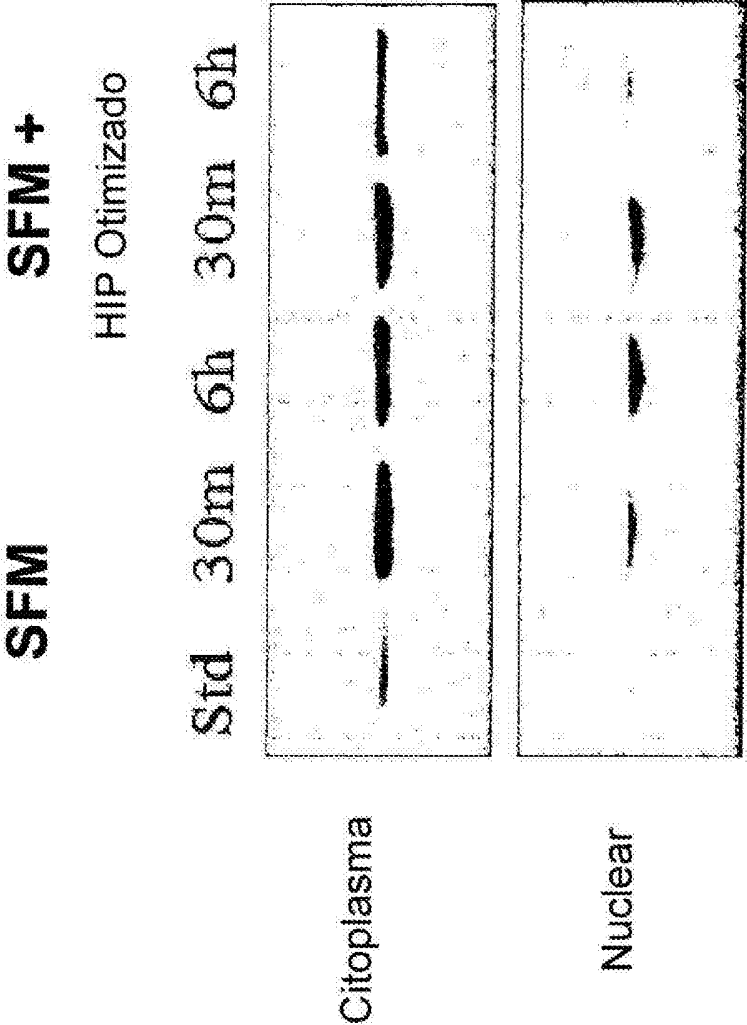


Fig.16

Modelo de Camundongo Diabético STZ HIP2 e HIP 2B vs Placebo Níveis de Glicose Diários Médios

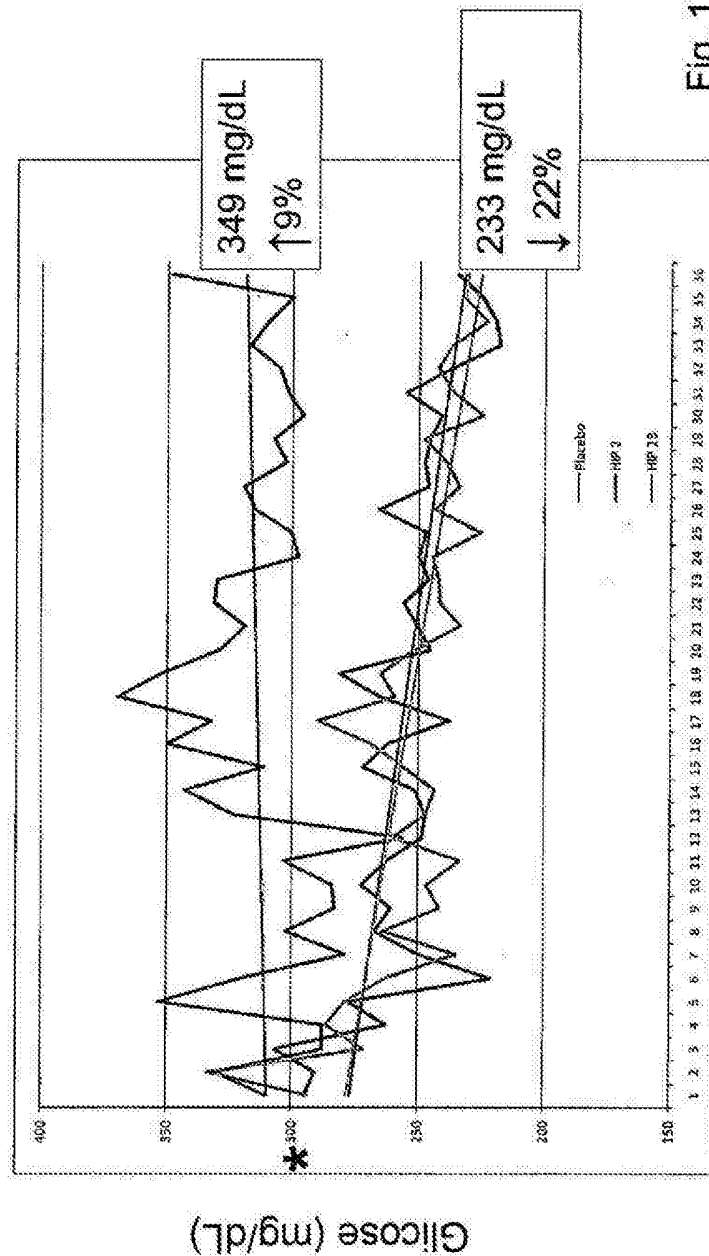


Fig. 17

Dias de tratamento

* Glicose de linha de base média 300 +/- 2% mg/dL sem diferenças significativas entre grupos (p=0,301)

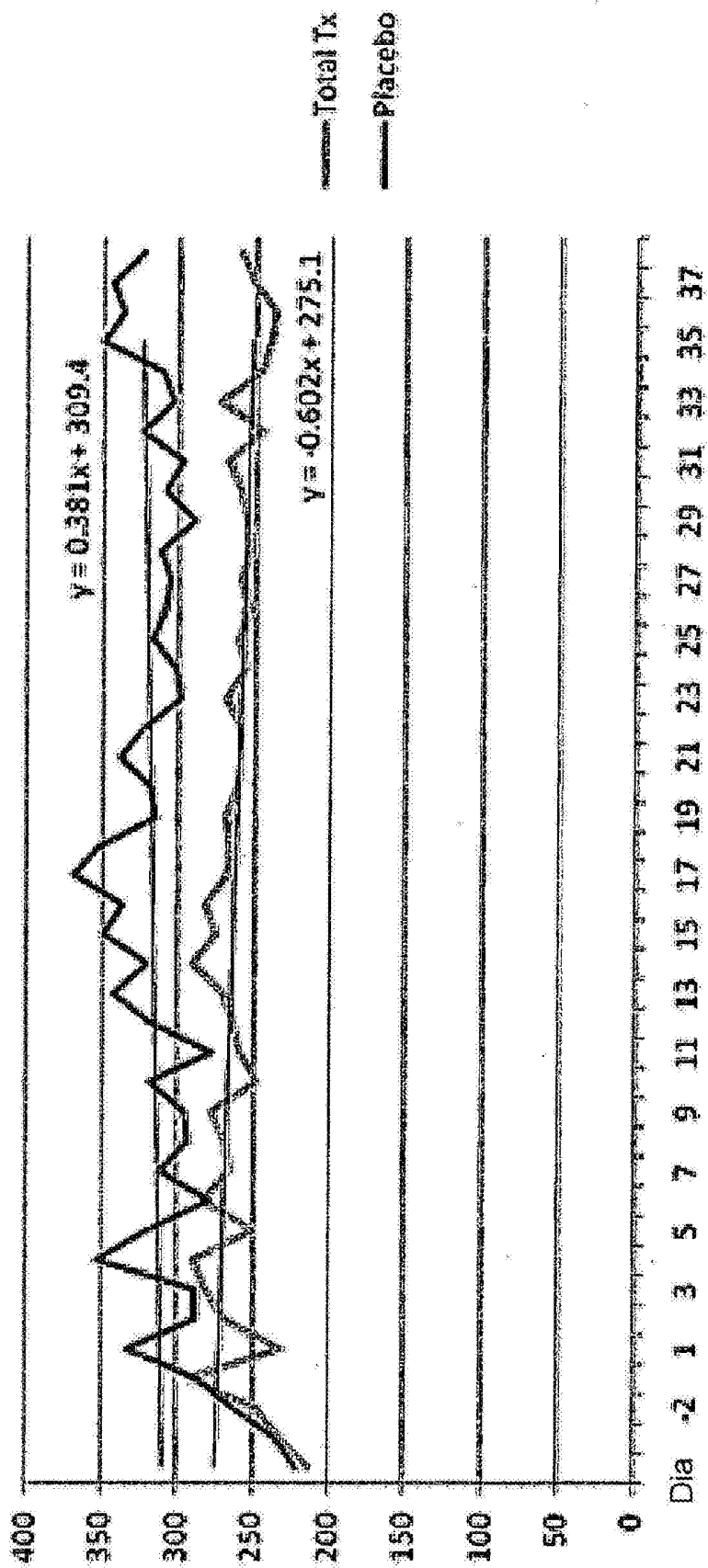


Fig. 18

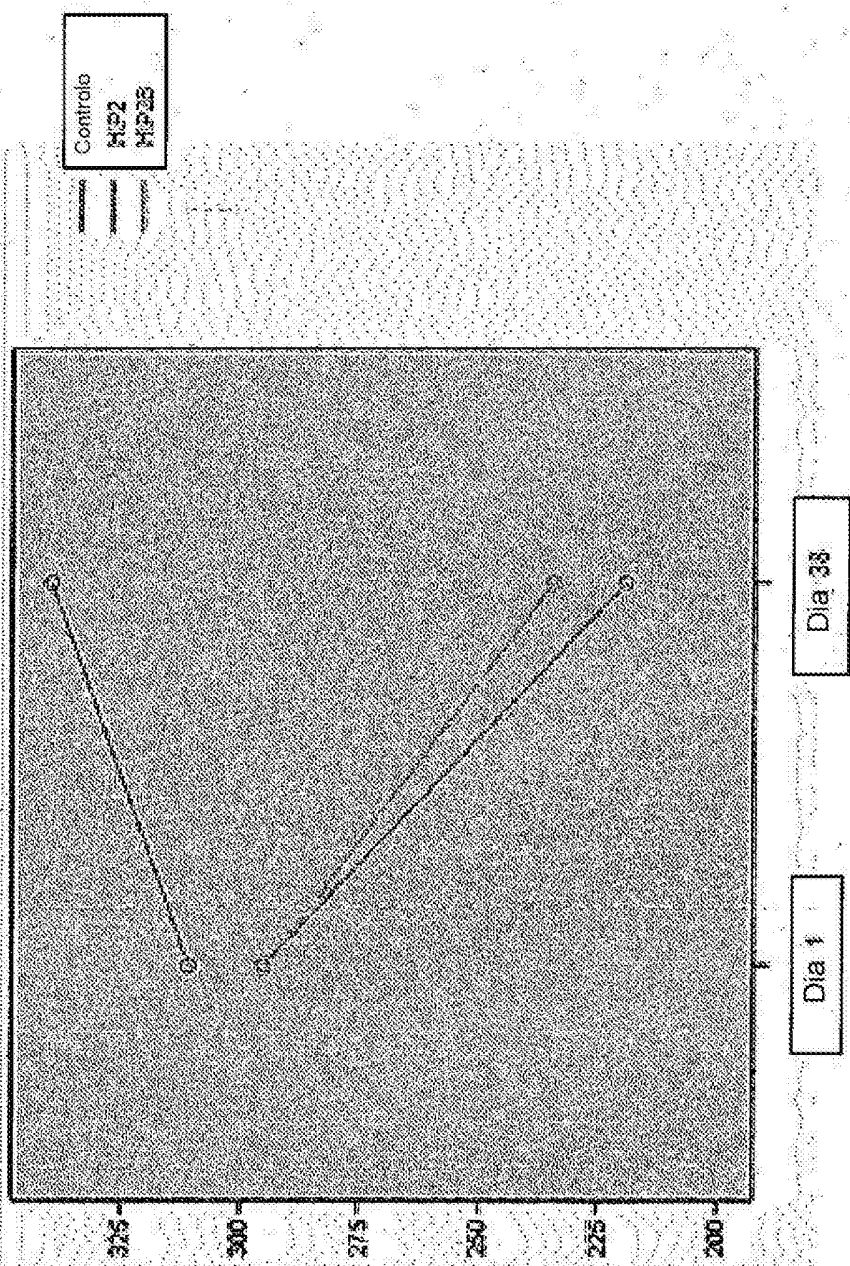


Fig. 19

Níveis de (mg/dL) glicemia de jejum após tratamento com HIP2B Otimizado

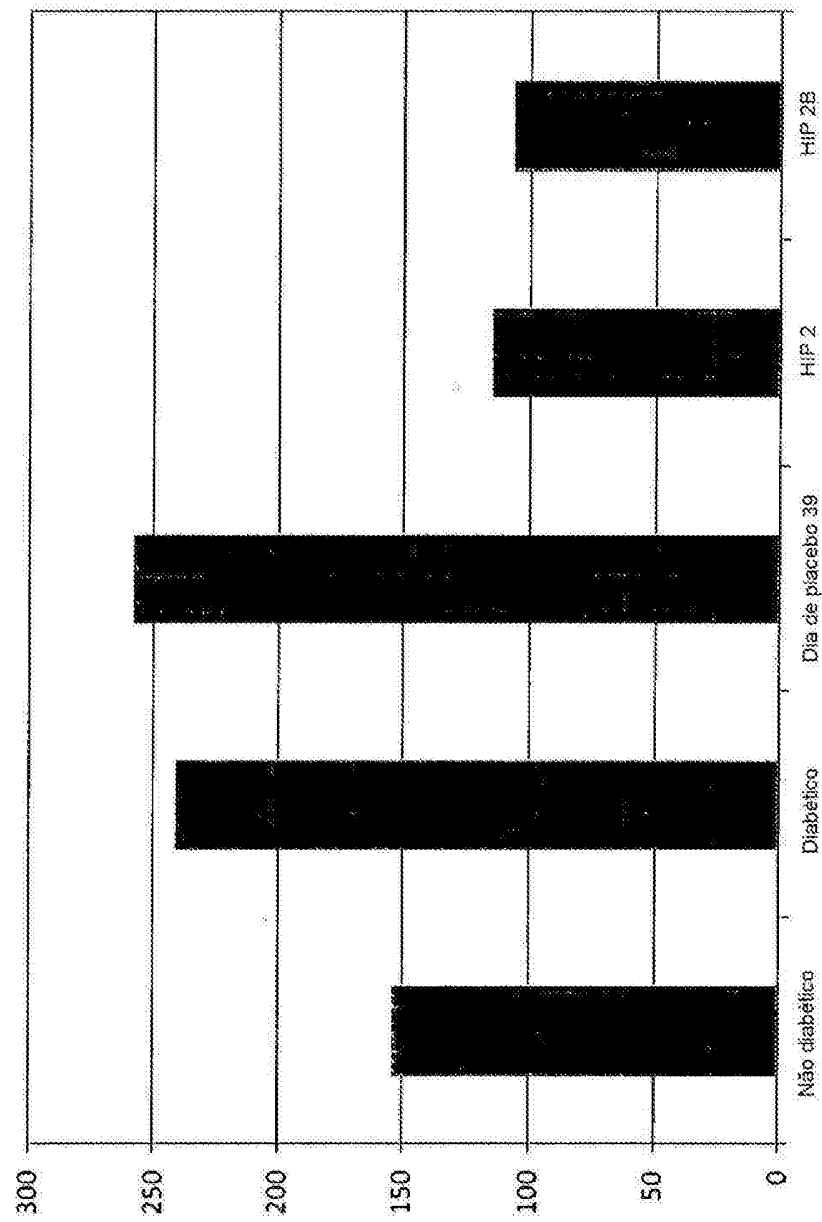


Fig. 20

Resultados de Teste de Tolerância à Glicose após administração do HIP2B Otimizado

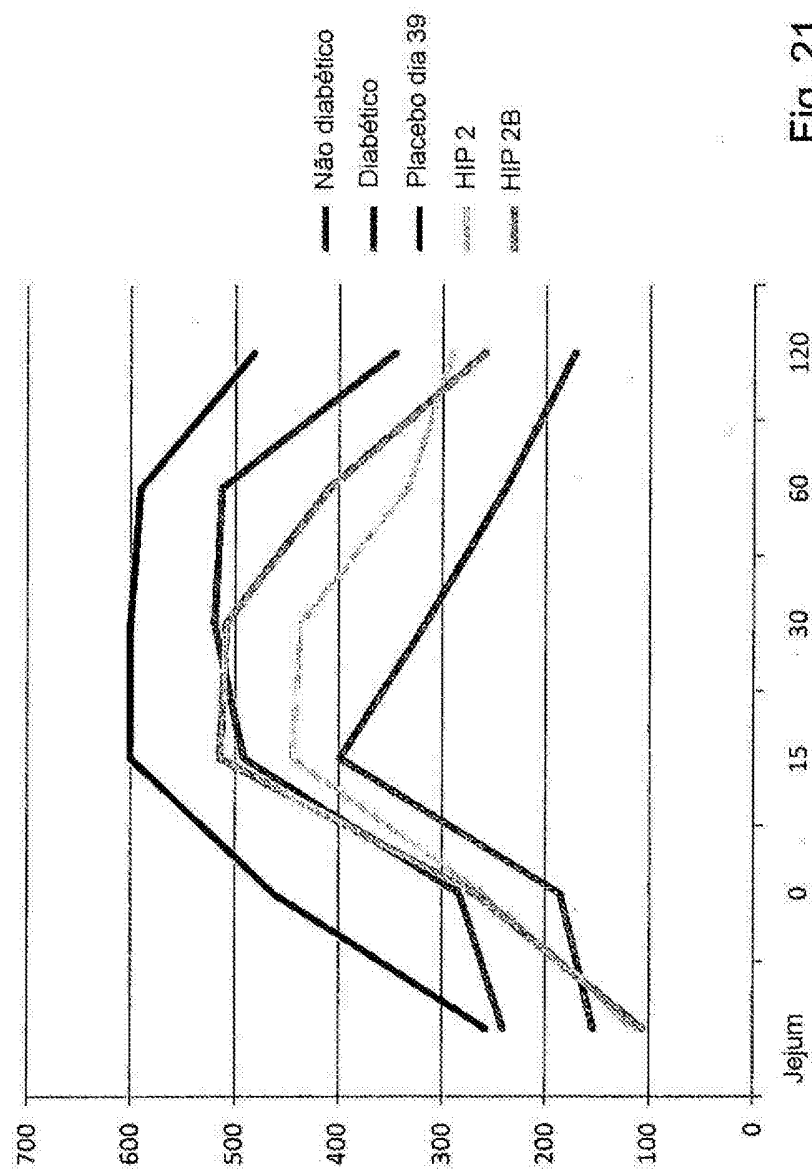


Fig. 21

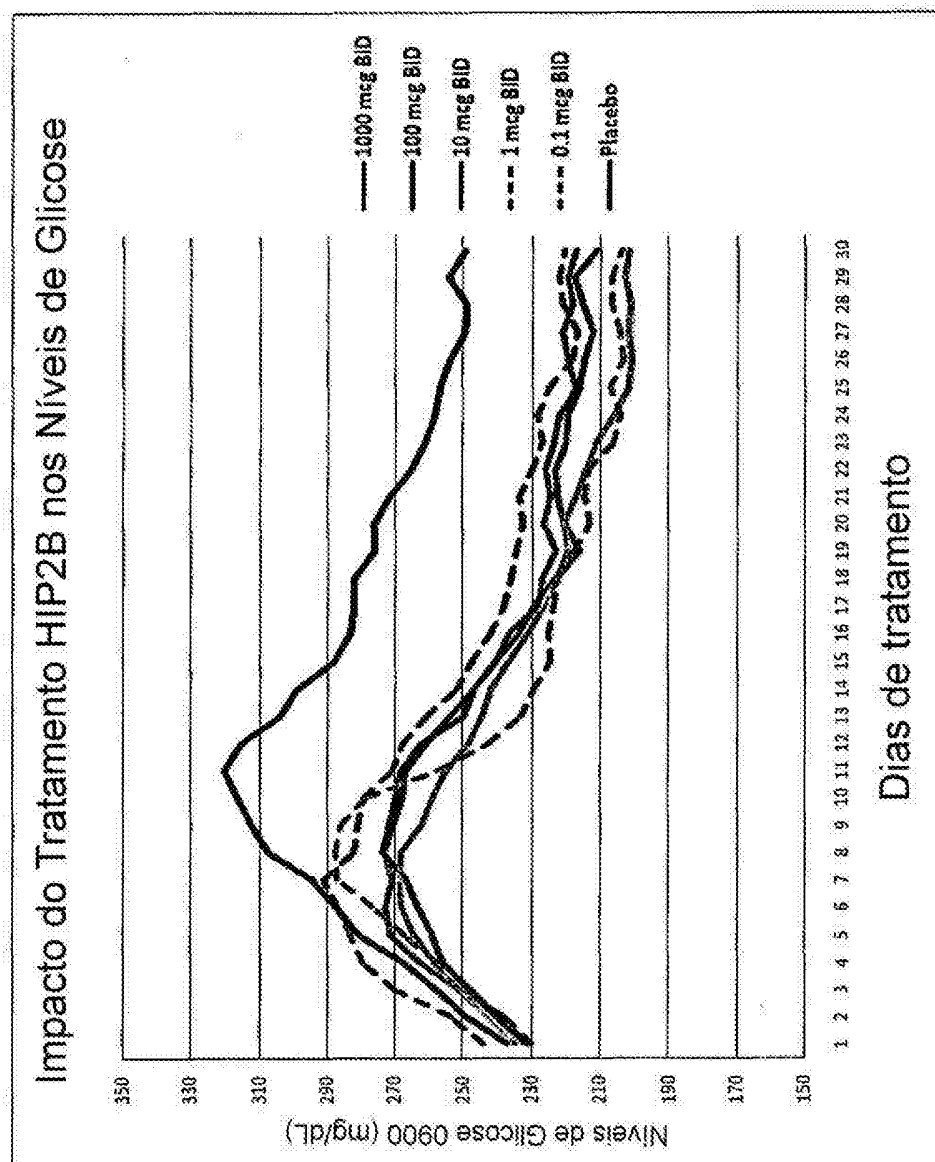


Fig. 22

Impacto das Concentrações de HIP2B na Atenuação da Diabetes

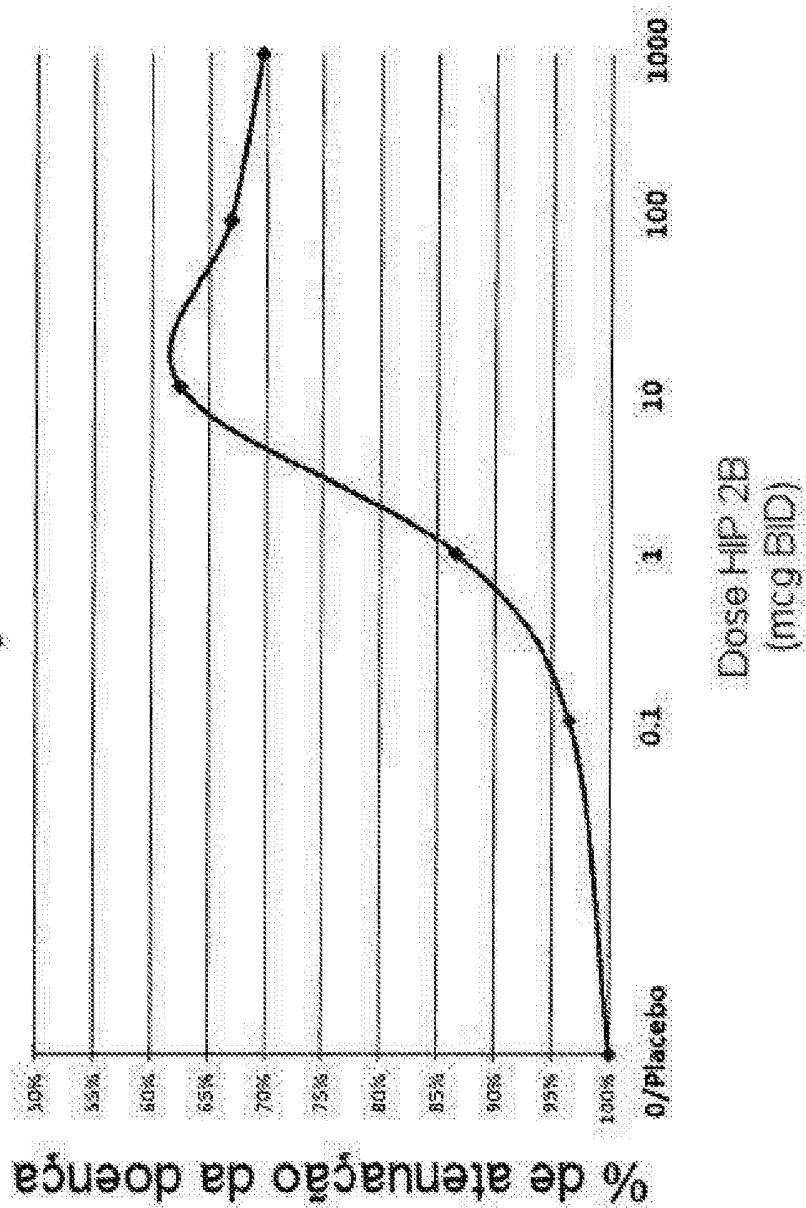


Fig. 23

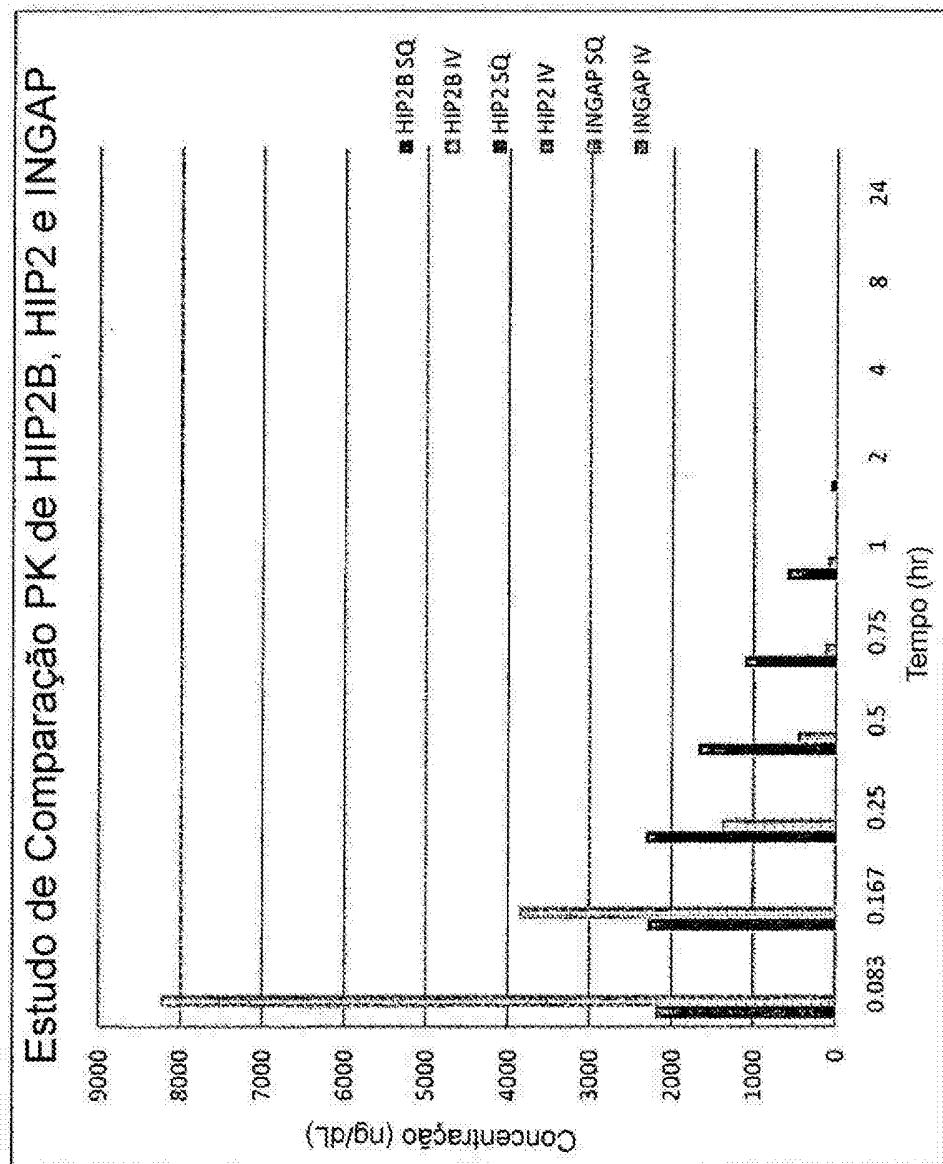


Fig. 24

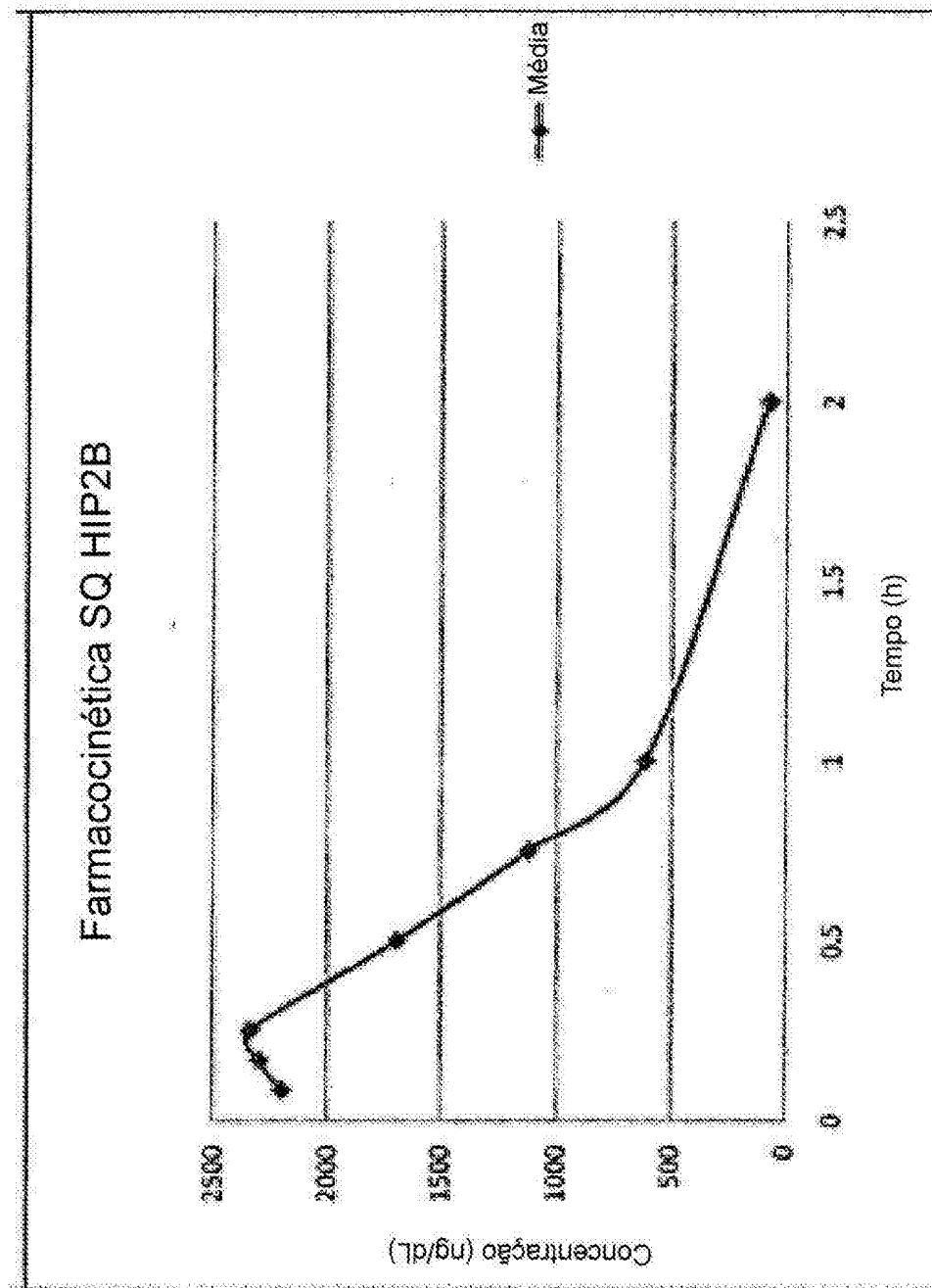


Fig. 25