



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

**(11) PI 0717183-8 B1**



**(22) Data do Depósito: 13/11/2007**

**(45) Data de Concessão: 21/05/2019**

---

**(54) Título:** EXENDINA OU ANÁLOGO DE EXENDINA MODIFICADA POR PEG, COMPOSIÇÃO E SEU USO

**(51) Int.Cl.:** C07K 14/575; A61K 38/26; A61K 47/60; A61K 47/65; A61K 38/00; (...).

**(52) CPC:** C07K 14/57563; A61K 38/26; A61K 47/60; A61K 47/65; A61K 38/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 14/11/2006 CN 200610118326.X; 23/07/2007 CN 200710138718.7.

**(73) Titular(es):** SHANGHAI BENEMAE PHARMACEUTICAL CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** WENCHAO BAO; HONGJING XU; GANG YU; YAJUN ZUO.

**(86) Pedido PCT:** PCT CN2007003203 de 13/11/2007

**(87) Publicação PCT:** WO 2008/058461 de 22/05/2008

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 14/05/2009

**(57) Resumo:** EXENDINA OU ANÁLOGO DE EXENDINA MODIFICADA POR PEG, COMPOSIÇÃO E SEU USO O presente invento descreve exendinas ou análogos de exendinas modificadas por um ou mais derivados de PEG que podem ser ligados a um ou mais aminoácidos das exendinas ou análogos de exendinas. Os derivados de PEG podem ter a estrutura ramificada apresentada em qualquer uma das fórmulas de I a IV. Também são providas composições incluindo a exendina ou análogo de exendina modificadas com o derivado de PEG, métodos para fazer ou administrar a exendina ou análogo de exendina modificadas, e seus vários usos.

## **EXENDINA OU ANÁLOGO DE EXENDINA MODIFICADA POR PEG, COMPOSIÇÃO E SEU USO**

[001] O peptídeo-1 similar ao glucagon (GLP-1) foi primeiro descoberto em 1987 e identificado como um hormônio peptídeo secretado pelo intestino dependente de glicose. O peptídeo GLP-1 transmite sinais através dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), e estimula as células  $\beta$  das ilhotas a secretar insulina para inibir a secreção de glucagon, o esvaziamento gástrico e a secreção de ácido gástrico, e efetua outras funções fisiológicas.

[002] As exendinas são peptídeos (*J. Biol. Chem.*, 1999, 255, 20259-20262; *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 7402-7405) encontrados nas secreções salivares de lagartos venenosos monstro-de-gila e *Haloderma horridum*. Estas exendinas, representadas pela exendina-4, são altamente homólogas à GLP-1 [7-36]. Pesquisas anteriores descobriram que as exendinas podem se ligar aos receptores GLP-1 e exercer efeitos farmacológicos similares, tais como estimular a secreção de insulina, controlar efetivamente os níveis de açúcar após uma refeição, reduzir o nível de glicosilação da hemoglobina e inibir o esvaziamento gástrico. O teste em animais encontrou que o uso prolongado peptídeos receptores GLP-1 pode efetivamente reduzir a resistência a insulina que pode levar à reversão da deterioração por diabetes mellitus. Adicionalmente, foi descoberto que um número de agonistas insulíntrópicos tais como GLP-1 e exendina-4 podem estimular a regeneração de células  $\beta$  das ilhotas (*Nat. Biotech.*, 2005, 23, 857-861) e melhorar fígados gordurosos não alcoólicos (*Hepatology*, 2006, 43, 173-181). Estas descobertas tornam tais peptídeos uma área quente nos estudos de diabetes e adipose. Wu Dengxi e Sun Yukun (patente chinesa ZL01112856) modificaram a exendina-4 e obtiveram uma série de análogos a exendina-4 com as mesmas funções da exendina-4 nativa. Recentemente, uma nova droga baseada em exendina, exendina-4 (Byetta®), chegou ao mercado norte-americano. Esta droga foi desenvolvida em conjunto por Amylin e Eli Lilly e requer duas injeções por dia. A droga chamou a atenção no campo terapêutico de diabetes e adipose. Entretanto, pesquisas clínicas descobriram que 41% dos pacientes produziram anticorpos contra a exendina-4 após 30 semanas de tratamento com tal droga (*Diabetes Care*, 2004, 27, 2628-2635).

[003] As drogas de proteínas/peptídeos têm tipicamente desvantagens tais como uma

meia vida curta no sangue, baixa estabilidade física e química, e tendência a degradação *in vivo* por proteases. Como resultado, todo dia são exigidas múltiplas injeções de tais drogas, causando muita dor e inconveniência aos pacientes. Como estender a meia vida destas drogas tem ocupado a indústria da biotecnologia por um longo tempo. Até hoje, ninguém descobriu uma solução universalmente aceitável para este problema.

[004] A tecnologia de modificação por PEG emergiu nos anos 70 e foi aplicada na tecnologia de fabricação de drogas de proteínas/peptídeos. Quando certos proteínas/peptídeos foram modificados por PEG linear ou ramificado, a modificação pode dar as seguintes características para a proteína/peptídeo: (1) uma melhoria na estabilidade física e química; (2) uma diminuição na imunogenicidade; (3) um aumento na resistência à degradação por protease; (4) uma extensão da meia vida no sangue devido ao aumento do peso molecular com o PEG levando a uma depuração renal reduzida; e (5) uma melhoria na solubilidade da droga e na penetração da membrana celular. De acordo com estudos de A. Yang e K. Precourt, a exendina-4 é metabolizada primariamente através de depuração renal. Portanto, eles empregaram um PEG tendo um peso molecular na faixa de 500 a 20.000 Da para modificar as exendinas (patente chinesa CN1372570A) para reduzir o efeito da depuração renal.

[005] Entretanto, um defeito principal da tecnologia PEG é que a bioatividade de uma droga modificada geralmente cai significativamente após a modificação. Haim Tsubery et al. empregaram 9-hidroximetil-7-sulfofluoreno-N-hidroxisuccinamida (FMS) para ativar PEG para ser acoplada com exendina-4, e os grupos PEG foram liberados da exendina-4 por hidrólise *in vivo*. Assim, a bioatividade da exendina-4 foi restaurada. Embora este método propicie uma solução para o problema da baixa bioatividade devido à modificação por PEG, a exendina-4 foi liberada após a hidrólise *in vivo* e o problema de imunogenicidade resultante das injeções freqüentes permaneceu sem solução (*J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 38118-38124).

[006] Os defeitos existentes das exendinas conhecidas e dos análogos a exendinas incluem intervalos de tempo curtos entre as doses, produção de anticorpos nos pacientes de injeção de longo prazo, e a redução da bioatividade após a modificação com PEG. Estes defeitos tornam difícil a aplicação prática de exendinas e análogos de exendinas e exigem

a administração de grandes doses de exendinas e análogos de exendinas que impedem rigorosamente a aplicação da tecnologia de exendina.

[007] Em certas formas de realização, são providos exendina ou análogos de exendina modificadas por uma ou mais moléculas de polietilenoglicol ou derivados. Em certas formas de realização, são providos exendinas modificadas por PEG ou análogos de exendina tendo um ou mais derivados de PEG ligados a um ou mais aminoácidos das exendinas ou análogos de exendina ou derivados. Os derivados de PEG podem ter estruturas lineares. Em certas formas de realização, os derivados de PEG podem ter uma estrutura ramificada, p.ex., como apresentado em qualquer uma das fórmulas de I a IV descritas aqui. Em certas formas de realização, são providos composições incluindo uma exendina ou análogo de exendina modificada por PEG, métodos de fabricação ou de administração de ditas exendinas ou análogos de exendinas modificadas, e seus vários usos, p.ex. para tratamento de diabetes. As exendinas ou análogos de exendinas modificadas por PEG exibem propriedades e características melhoradas e inesperadas, tais como, por exemplo, meia vida longa no sangue, alta bioatividade e/ou baixa imunogenicidade.

[008] A figura 1 é a estrutura de Fórmula I de derivados PEG ramificados.

[009] A figura 2 é a estrutura de Fórmula III de derivados PEG ramificados.

[010] A figura 3 mostra os resultados de cromatografia da separação e purificação de um análogo de exendina-4 modificada por derivado de PEG (Fórmula IV) tendo um peso molecular de 40.000 Da (Daltons). O rótulo 1 indica o pico de absorção no tempo de carga da amostra; o rótulo 2 indica o pico de absorção no tempo de eluição, mostrando os análogos de exendina-4 modificadas por múltiplos derivados de PEG; o rótulo 3 indica o pico de absorção no tempo de eluição, mostrando análogos de exendina-4 modificadas por um único derivado de PEG, e o rótulo 4 indica o pico de absorção no tempo de eluição, mostrando análogo de exendina-4 não modificada.

[011] A figura 4 é o eletroforetograma de um análogo de exendina-4 modificada por um único derivado de PEG (Fórmula IV) tendo um peso molecular de 40.000 Da, em que a trilha 1 mostra a banda do análogo de exendina-4 modificada por um único derivado de PEG.

[012] A figura 5 mostra os resultados de teste de efeito de droga em 24 horas, de análogos de exendina-4 modificadas por um único derivado de PEG tendo pesos moleculares de 5.000 e 21.000 Da, respectivamente, em animais.

[013] A figura 6 mostra os resultados de teste de efeito de droga em 72 horas, de análogos de exendina-4 modificadas por um único derivado de PEG linear ou ramificado (Fórmula IV) tendo pesos moleculares de 21.000 e 40.000 Da em animais.

[014] A figura 7 mostra os resultados de teste de efeito de droga em 72 horas, de análogos de exendina-4 modificadas por um único derivado de PEG (Fórmula II) tendo pesos moleculares de 21.000 Da (U21K), 30.000 Da (U30K) e 40.000 Da (U40K), respectivamente, em animais.

[015] A figura 8 mostra os resultados de teste de efeito de droga em 72 horas, de análogos de exendina-4 modificadas por um único derivado de PEG (Fórmula IV) tendo pesos moleculares de 21.000 Da (Y21K), 30.000 Da (Y30K) e 40.000 Da (Y40K), respectivamente, em animais.

[016] A figura 9 mostra os resultados de teste de efeito de droga em 72 horas, de análogos de exendina-4 modificadas por um único derivado de PEG linear tendo pesos moleculares de 21.000 Da (L21K), 30.000 Da (L30K), respectivamente, em animais.

[017] A figura 10 mostra os resultados de teste de farmacocinética de droga em 72 horas de análogos de exendina-4 modificadas por um único derivado de PEG (Fórmula II) tendo peso molecular de 30.000 Da (U30K) e derivado de PEG (Formula IV) tendo peso molecular de 40.000 Da (Y40K), respectivamente.

### **Modificação de PEG**

[018] A seguinte descrição do presente invento destina-se meramente a ilustrar várias formas de realização do presente invento. Como tal, as modificações específicas discutidas não devem ser consideradas como limitações do escopo do presente invento. Ficará claro para os técnicos da área que várias equivalências, alterações e modificações podem ser feitas sem fugir ao escopo do presente invento, e entende-se que tais formas de realização equivalentes devem ser incluídas aqui.

[019] Em certas formas de realização, são providas exendinas ou análogos de exendinas modificadas por um ou mais derivados de PEG. Em certas formas de realização,





peptídeos modificados por PEG. Em certas formas de realização, o peso molecular do derivado de PEG linear ou ramificado usado é de cerca de 200 Da ou maior. Preferencialmente, o peso molecular é de cerca de 5.000 Da ou maior ou de cerca de 20.000 Da ou maior. Em certas formas de realização, o peso molecular do derivado de PEG usado está na faixa de cerca de 5.000 Da a cerca de 50.000 Da. Preferencialmente, o peso molecular do derivado de PEG usado está na faixa de 20.000 Da a 50.000 Da, ou de 20.000 Da a 45.000 Da, ou de 20.000 Da a 40.000 Da. Os pesos moleculares dos derivados de PEG aqui referidos são os pesos moleculares numéricos médios (Mn) medidos pelo método de cromatografia por permeação a gel (GPC) a menos que seja especificado de outra forma (Dong Yanming, *Guidebook of Macromolecule Analysis*, Beijing, China Petrochemical Press, 2004, 416-427). Os derivados de PEG com pesos moleculares diferentes podem ser adquiridos de fornecedores comerciais ou sintetizados usando métodos convencionais conhecidos no campo técnico relevante.

[027] Em certas formas de realização, os derivados de PEG têm estruturas ramificadas com pesos moleculares maiores que 20.000 Da. Preferencialmente, os pesos moleculares dos derivados de PEG ramificados usados estão na faixa de mais de 20.000 Da até cerca de 50.000 Da, ou mais que 20.000 Da até cerca de 45.000 Da, ou mais que 20.000 Da até cerca de 40.000.

[028] A modificação de exendinas ou análogos de exendinas por PEG é alcançada pela ligação dos derivados de PEG ativados à cadeia lateral de um resíduo aminoácido ou ao terminal N ou ao terminal C de aminoácidos das exendinas ou análogos de exendinas. Por exemplo, derivados de PEG contendo diferentes grupos de ativação podem se ligar a cadeias laterais diferentes, aos terminais N ou terminais C de aminoácidos, ou a um aminoácido específico. Os grupos aminoácidos que podem ser quimicamente ligados a derivados de PEG ativados incluem mas não se limitam ao terminal N de grupos  $\alpha$ -amino, a cadeia lateral do resíduo lisina de grupos  $\epsilon$ -amino, grupos imino na cadeia lateral do resíduo histidina do grupo de peptídeos imidazolil, ao terminal carboxila de peptídeos, aos grupos carboxila da cadeia lateral de ácido aspártico e ácido glutâmico, grupos hidroxila da cadeia lateral de serina e treonina, grupos mercapto da cadeia lateral de cisteína, etc. Em geral, tal ligação química é alcançada através de reações eletrofílicas e nucleofílicas. Por

exemplo, são criadas através de tais reações as ligações de derivados de PEG ativados por N-hidroxil-succinimida aos grupos  $\alpha$ -amino de terminais N, cadeia lateral lisina de grupos  $\epsilon$ -amino e grupos amino livres tais como os grupos imino na cadeia lateral histidina de grupos imidazolil. Adicionalmente, os PEGs contendo grupos de ativação aldeído podem ser especificamente ligados aos terminais N de peptídeos por alquilação redutiva. De fato, os métodos de ligação de derivados de PEG a exendinas ou análogos de exendinas usando vários grupos de ativação, e as exendinas ou análogos de exendinas modificadas por PEG produzidas a partir daí são providas em certas formas de realização. Os derivados de PEG com vários grupos de ativação podem ser adquiridos de fornecedores comerciais, ou sintetizados usando métodos convencionais conhecidos no campo técnico relevante.

[029] Em certas formas de realização, são providas as exendinas ou análogos de exendinas acoplados com um ou mais derivados de PEG, em que o número de derivados de PEG acoplados às exendinas ou análogos de exendinas é dependente do número de grupos radicais livres nas exendinas ou análogos de exendinas, dos grupos de ativação do derivado de PEG, e/ou do peso molecular do derivado de PEG. Geralmente, quanto mais grupos radiais livres as exendinas ou análogos de exendinas têm, mais derivados de PEG serão ligados a eles. Também geralmente, quanto maior é o peso molecular do derivado de PEG ativado, menos derivados de PEG serão ligados aos peptídeos. Em certas formas de realização, as exendinas ou análogos de exendinas são modificadas por um, dois, três ou quatro derivados de PEG. Preferencialmente, uma exendina ou análogo de exendina é modificada por um ou dois derivados de PEG.

[030] As misturas geradas pela ligação de derivados de PEG a exendinas ou análogos de exendinas podem ser efetivamente separadas por meios convencionais, por exemplo, por separação por troca iônica, separação por filtração em gel, ou cromatografia de reversão de fase. A cromatografia de troca iônica pode incluir cromatografia de troca aniônica e catiônica. Os diferentes métodos de troca iônica podem ter efeitos diferentes nos resultados da separação e purificação. Uma vez que diferentes exendinas ou análogos de exendinas têm números e tipos diferentes de aminoácidos, e assim têm pesos moleculares diferentes, os pesos moleculares finais de exendinas ou análogos de exendinas modificadas por derivados de PEG são os pesos moleculares totais dos

derivados de PEG e das exendinas ou análogos de exendinas. Após os processos de separação, purificação e substituição em solução tampão, as exendinas ou análogos de exendinas modificadas por PEG podem ser adicionalmente processadas para fazer composições farmacêuticas.

### **Exendinas ou análogos de exendinas**

[031] As exendinas ou análogos de exendinas aqui se referem a peptídeos ou derivados de peptídeos tendo uma seqüência de aminoácidos homóloga ou idêntica a uma porção ou a toda a seqüência de exendinas nativas. As exendinas ou análogos de exendinas podem se ligar a receptores GLP-1 e estimular uma cascata de transmissões de sinais celulares. Tais peptídeos podem ser obtidos através de síntese química de fase sólida ou engenharia genética, seguida de separação e purificação.

[032] As exendinas ou análogos de exendinas aqui incluem mas não se limitam às exendina-3 e exendina-4 nativas. A exendina-3 nativa tem a seguinte seqüência de aminoácidos:

[His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu  
-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly  
-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-OH] (SEQ ID NO:1).

[033] A exendina-4 nativa tem a seguinte seqüência de aminoácidos:

[His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu  
-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser  
-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>] (SEQ ID NO:2).

[034] Em certas formas de realização, as exendinas ou análogos de exendinas incluem mas não se limitam aos peptídeos análogos obtidos por substituições de aminoácidos, adições ou exclusões, das seqüências de aminoácidos de exendina-3 nativa e exendina-4 nativa. As substituições de aminoácidos de exendina-3 e exendina-4 incluem substituições com aminoácidos naturais bem como com aminoácidos não naturais. Os aminoácidos não naturais incluem mas não se limitam a ácido azetidincarboxílico, ácido 2-amino-hexanodióico, ácido 3-amino-hexanodióico, ácido  $\beta$ -lactâmico, ácido aminopropiônico, ácido 2-aminobutanóico, ácido 4-aminobutanóico, ácido 6-

aminohexanóico, ácido 2-aminoheptanóico, ácido 2-amino-2-metilpropanóico, ácido 3-amino-2-metilpropanóico, ácido 2-aminoheptanodióico, ácido 2-amino-3,3-dimetilbutanóico, desmonsina, ácido 2,2-diaminoheptanodióico, ácido 2,3-diaminopropanóico, N-etilglicina, N-etilaspargina, homoprolina, hidroxisilina, alo-hidroxisilina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmonsina, aloisoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N,N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido pipercolico e tioprolina. Preferencialmente, os análogos de exendina incluem um, dois, três, quatro ou cinco substituições de aminoácido.

[035] Em certas formas de realização, os análogos de exendina incluem análogos de peptídeos obtidos pela adição ou subtração de um ou mais aminoácidos das seqüências de aminoácidos nativos exendina-3, exendina-4. Preferencialmente, os análogos de exendina incluem análogos de peptídeos obtidos pela adição ou remoção de um a vinte aminoácidos das seqüências de aminoácidos nativos exendina-3 ou exendina-4. Em certas formas de realização, os análogos de exendina incluem análogos de peptídeos obtidos pela adição ou remoção de um a quinze aminoácidos das seqüências de aminoácidos nativos exendina-3 ou exendina-4 ou pela adição ou remoção de 1 a 10 aminoácidos das seqüências de aminoácidos nativos exendina-3 ou exendina-4 ou pela adição ou remoção de um a nove aminoácidos das seqüências de aminoácidos nativos exendina-3 ou exendina-4.

[036] Os análogos de exendina podem ter bloqueio ou modificação química reversível ou irreversível nos seus terminais N, terminais C ou cadeias laterais. Por exemplo, o terminal C de uma exendina ou análogo de exendina pode ser amidado.

[037] Em certas formas de realização, as exendinas ou análogos de exendinas compreendem seqüências de aminoácidos SEQ ID NOs: 1-2 ou seqüências de aminoácidos SEQ ID NOs: 3-229 ou seqüências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 230-265.

[038] A atividade das exendinas ou análogos de exendinas modificadas por PEG aqui descritos pode ser testada em nível celular de acordo com o ensaio publicado por Gong Qihong et. al. (*Chinese Journal of Incretin and Metaboly*, 2004, 20, 559-560). Brevemente, o ensaio é conduzido pela adição de glicose e exendinas ou análogos de exendinas modificadas por PEG de várias concentrações em células INS-1, incubação por

4 horas, detecção da quantidade de insulina no sobrenadante usando uma ensaio rádio-imune e finalmente análise da quantidade de insulina nas células INS-1 usando a tecnologia RT-PCR num ensaio semi-quantitativo. Pelo uso do método mencionado acima, pode ser alcançado uma ampla classificação da atividade de exendinas ou análogos de exendinas modificadas por derivados de PEG. Tal classificação também pode ser alcançada pelo teste da alteração dos níveis sanguíneos de açúcar em um camundongo (p.ex. camundongo C57 ou db/db) em diferentes pontos de tempo após as doses.

### **Composições farmacêuticas e seus usos**

[039] Em certas formas de realização, são providas as composições farmacêuticas ou compostos incluindo exendinas ou análogos de exendinas modificadas por PEG como aqui descrito. As exendinas ou análogos de exendinas modificadas por derivados de PEG aqui descritos podem reagir com vários ácidos inorgânicos ou orgânicos ou bases para formar sais. Tais sais incluem os sais preparados com ácidos orgânicos e inorgânicos, em que os ácidos orgânicos e inorgânicos incluem mas não se limitam a ácido hidrolórico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfônico, ácido toluenosulfônico, ácido maléico, ácido fumárico e ácido canforsulfônico. Os sais preparados com bases incluem mas não se limitam a sais de amônio, sais de metais alcalinos (p.ex. sais de sódio e potássio) e sais de metais alcalino-terrosos (p.ex. sais de cálcio e magnésio). Os sais preferidos incluem, p.ex., sais acetato, sais hidrocloreto e sais trifluoroacético. Os sais podem ser preparados por métodos convencionais. Por exemplo, tais sais podem ser preparados pela reação de exendinas ou análogos de exendinas com um ou mais equivalentes do sal ou base apropriado num solvente ou meio em que o sal resultante seja insolúvel, ou em um solvente tal como água, que seja removível por vácuo ou congelamento-secagem, ou pela troca de íons de um sal existente por um outro íon em uma resina de troca iônica adequada.

[040] Em certas formas de realização, as exendinas ou análogos de exendinas modificadas por PEG como aqui descrito também podem ser preparados como sais farmacêuticamente aceitáveis (p.ex., sal resultante de uma reação de adição de ácido) e/ou seus complexos. A preparação de tais sais pode facilitar o uso farmacológico pela alteração das características físicas ou químicas de uma composição sem evitar que a

composição exerça seu efeito fisiológico. Exemplos de alterações úteis nas propriedades físicas incluem o abaixamento do ponto de fusão para facilitar a administração transmucosal ou aumento da solubilidade para facilitar a administração de concentrações mais altas da droga.

[041] Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem, por exemplo, sais de adição de ácido tais como aqueles contendo sais sulfato, hidrocloreto, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, benzenosulfonato, p-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato e quinato. Os sais farmacologicamente aceitáveis também podem ser preparados com vários ácidos orgânicos e inorgânicos tais como, p.ex., ácido hidrocloreto, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido sulfâmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malônico, ácido metanosulfônico, ácido etanosulfônico, ácido benzenosulfônico, ácido p-toluenosulfônico, ácido ciclohexilsulfâmico e quinato. Tais sais podem ser preparados pela reação de exendinas ou análogos de exendinas com um ou mais equivalentes do ácido ou base apropriada num solvente ou meio em que o sal resultante é insolúvel ou em um solvente tal como água que é removível por vácuo ou por secagem-congelamento, ou pela troca de íons de um sal existente por um outro íon numa resina de troca iônica adequada.

[042] Suportes ou excipientes também podem ser usados para facilitar a administração de uma composição a um sujeito. Exemplos de suportes e excipientes incluem, p.ex., carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares (p.ex. lactose, glicose ou sacarose), ou vários tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais (p.ex., óleo de semente de gergelim, óleo de amendoim, óleo de oliva), polietilenoglicóis e solventes fisiologicamente ativos. As composições ou composições farmacêuticas podem ser administradas por diferentes rotas incluindo, p.ex., administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea e intramuscular, oral, tópica e transmucosal.

[043] Se desejado, as soluções das composições do presente invento podem ser espessadas com um agente espessante tal como metilcelulose. Elas podem ser preparadas numa forma emulsificada (p.ex. água em óleo ou óleo em água). Qualquer dos agentes emulsificantes farmacologicamente aceitáveis conhecidos do estado da técnica podem ser empregados, incluindo p.ex. pó de goma de acácia, um surfactante não iônico (p.ex.

Tween), ou um surfactante iônico (p.ex., sulfatos de poliéter álcool alcalino ou sulfonatos tais como Triton).

[044] As composições podem ser esterilizadas por técnicas de esterilização convencionais ou filtragem. As composições podem conter substâncias auxiliares farmacologicamente aceitáveis que têm condições fisiológicas aproximadas, tais como agentes tamponantes de pH. Os tampões adequados incluem, por exemplo, tampões de acetato de sódio/ácido acético. Uma forma de supositório ou preparado com função de liberação lenta pode ser usado para que quantidades farmacologicamente efetivas do preparado permaneçam na corrente sanguínea por muitas horas ou dias após a injeção transdermal ou aplicação.

[045] A isotonicidade desejada pode ser obtida pelo uso de cloreto de sódio ou outros agentes farmacologicamente aceitáveis tais como glicose, ácido bórico, tartrato de sódio, propilenoglicol, polióis (p.ex., manitol e sorbitol), ou outros solventes inorgânicos ou orgânicos. O cloreto de sódio é preferido para tampões contendo o íon sódio.

[046] Numa forma de realização, para um paciente com um peso corporal de cerca de 70 kg, a dosagem efetiva do composto estará na faixa de cerca de 0,01 ou de cerca de 0,03 a cerca de 5 mg por dia, preferencialmente de cerca de 0,01 ou cerca de 0,5 até cerca de 2 mg por dia, ou mais preferencialmente cerca de 0,01 ou cerca de 0,1 até cerca de 1 mg por dia, administrada em uma ou mais doses. A dose exata pode ser determinada pelo médico atendente e é dependente de se o composto específico fica dentro das faixas mencionadas acima, bem como da idade, peso e sintomas do paciente individual.

[047] Em certas formas de realização, uma exendina ou análogo de exendina modificada por PEG como aqui descrito pode ser administrado a um sujeito para tratar diabetes. Em certas formas de realização, a administração do composto deveria começar imediatamente no momento em que os sintomas de diabetes se manifestam ou imediatamente após o diabetes ser diagnosticado. Opcionalmente, em outras formas de realização, o composto pode ser administrado antes dos sintomas se manifestarem como um tratamento preventivo.

[048] Embora os compostos sejam tipicamente usados para tratar pacientes humanos, eles podem ser usados para tratar doenças similares ou idênticas em outros

vertebrados, tais como outros primatas, animais de fazenda (p.ex. suínos, bovinos e galináceos), animais de estimação ou de esporte (p.ex. cavalos, cães e gatos).

[049] Os seguintes exemplos são providos para melhor ilustrar o invento reivindicado e não devem ser interpretados como limitantes do escopo do presente invento. Os materiais específicos são mencionados meramente para fins de ilustração, e não se destinam a limitar o invento. Um técnico da área pode desenvolver meios equivalentes ou resultantes sem o exercício de capacidade inventiva e sem fugir ao escopo do presente invento. Entende-se que muitas variações podem ser feitas nos procedimentos aqui descritos e ainda assim permanecendo dentro dos limites do presente invento. É da vontade dos inventores que tais variações sejam incluídas dentro do escopo do presente invento.

### Exemplos

[050] Um derivado de PEG linear com um peso molecular de 5.000 Da foi adquirido de Sigma-Aldrich Corporation. Outros derivados de PEG usados aqui foram adquiridos de Beijing JenKen Technology Co., Ltd.

[051] Os purificadores A,B Double-Pump AKTA usados nos experimentos de troca iônica, e outras colunas e empacotamentos foram adquiridos de General Electric. Os reagentes relevantes foram adquiridos de Sigma-Aldrich. A exendina-4 nativa e seus análogos usados nos Exemplos de 3 a 9 foram adquiridos de Chengdu Shennuo Science and Technology Co., Ltd.

#### Exemplo 1. Síntese em fase sólida de análogos de exendina-4

[052] O Exemplo 1 apresenta um método de síntese em fase sólida do análogo de exendina-4 tendo a seguinte seqüência de aminoácidos:

[His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Arg-Glu-Glu  
-Glu-Ala-Val-Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser  
-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-OH] (SEQ ID NO:232).

(1) Resíduos de aminoácidos:

Fmoc-L-Ala-OH	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Fmoc-L-Met-OH

Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Gly-OH	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH
Fmoc-L-His(Trt)-OH	Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Ile-OH	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-L-Leu-OH	Fmoc-L-Val-OH

em que:

Fmoc se refere a 9-fluorenilmetoxicarbonil;

Boc se refere a t-butiloxicarbonil;

Trt se refere a trifenilmetil;

OtBu se refere a t-butil éster;

tBu se refere a t-butil.

(2) Aparelhos e reagentes para a síntese

[053] As sínteses dos peptídeos foram conduzidas usando um Peptide Synthesizer 433A (Applied Biosystem, USA).

[054] Os reagentes usados para as sínteses foram N-metilpirrolidona, dicloreto de metileno, hexahidropiridina, metanol, dimetilaminopiridina / DMF, N,N-diisopropiletilamina / NMP, HBTU 100 mmol/0,5M HOBT em DMF, N,N-diciclohexilcarbodiimida / NMP,

em que:

DMF se refere a N,N-dimetilformamida,

NMP se refere a N-metilpirrolidona,

HOBT se refere a 1-hidroxibenzotriazol,

HBTU se refere a hexafluorofosfato de 2-1H-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametilurônio

(3) Procedimentos

a. Síntese

[055] As quantidades de reagentes usadas nos procedimentos abaixo foram baseadas numa escala de síntese de 0,25 mmol. 0,25 g de resina HMP foram pesados e postos no vaso reator do sintetizador. 1 mmol de vários aminoácidos tendo grupos protetores foram

pesados e postos na matriz do sintetizador na ordem da seqüência de aminoácidos do derivado de peptídeo insulínico desejado a partir do terminal C até o terminal N. A uma temperatura ambiente de 25°C, as reações para remoção da proteção Fmoc, ativação de um resíduo e anexação do resíduo ativado à resina HMP foram automaticamente realizadas sob o controle de um programa de computador. Tais reações foram repetidas até que todo o peptídeo estivesse sintetizado. Após a conclusão da síntese, a resina anexada com o peptídeo sintetizado tendo grupos protetores nas suas cadeias laterais aminoácido foi secada ao ar no sintetizador de peptídeo e então pesada.

b. Remoção dos grupos protetores e separação da resina.

[056] A resina anexada com o peptídeo sintetizado tendo grupos protetores foi posta num frasco Erlenmeyer tampado, e o reagente de clivagem como mostrado abaixo foi adicionado.

Reagente	Quantidade
água	0,50 mL
metil-fenóxido	0,50 mL
fenol	0,75 g
mercaptoetanol	0,20 mL
ácido trifluoroacético (TFA)	0,10 mL

[057] Esta reação foi executada à temperatura constante de 30°C por seis horas em agitação constante. Após isso, a mistura foi filtrada, os filtrados aquosos foram coletados, e a resina foi lavada com uma pequena quantidade de ácido trifluoroacético (TFA). A solução de lavagem foi misturada com os filtrados aquosos coletados. Então, a mistura foi precipitada com éter e os precipitados foram lavados com uma pequena quantidade de éter. Os precipitados foram secados no aparelho de secagem até o produto bruto obtido.

c. Separação e purificação por HPLC e liofilização

[058] O produto bruto foi separado e purificado por HPLC preparativa, e então foi liofilizado para obter o produto final. O peso molecular do produto foi analisado usando cromatografia e espectrometria de massa. O peso molecular teórico do peptídeo sintetizado foi de 4300,6 e o peso molecular real medido foi de 4316,7.

[059] Similarmente, o método acima pode ser usado por um técnico da área para sintetizar outras exendinas ou análogos de exendinas.

**Exemplo 2. Preparação de um análogo de exendina-4 por técnicas de engenharia genética**

[060] Este exemplo descreve um método para fazer o análogo de exendina-4 tendo a seguinte seqüência de aminoácidos por um método de engenharia genética:

[His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Leu-Glu-Glu  
-Glu-Ala-Val-Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser  
-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Arg-OH] (SEQ ID NO:251).

A. Os seguintes fragmentos de genes foram sintetizados com base nas seqüências de aminoácidos dos análogos de exendina a serem produzidos:

(1) 5' AAT TCC ATG CAC GGC GAA ACC TTC ACC AGC GAT CTG AGC AAA CAG  
CTG GAA GAA GAA GCG GTT AA (SEQ ID NO:266)

(2) 5' ACTG TTC ATC GAA TGG CTG AAA AAC GGC GGC CCG AGC AGC GGC  
CCG CCG CCG CCG AGC CGT TAG A (SEQ ID NO:267)

(3) 5' AGCTT CTA ACG GCT CGG CCG CCG CGC GCT GCT CCG GCC GCC GTT  
TTT CAG CCA TTC GAT GA (SEQ ID NO:268)

(4) 5' ACAG TTT AAC CGC TTC TTC TTC CAG CTG TTT GCT CAG ATC GCT  
GGT GAA GGT GCC TTC GCC GTG CAT GG (SEQ ID NO:269)

**B. Clonagem**

[061] **Ligação:** Foram tomados dois tubos de ensaio. Os fragmentos de genes (1) e (4) foram adicionados e misturados num tubo. Os fragmentos de genes (2) e (3) foram adicionados e misturados no outro tubo. Foram adicionados em cada tubo tampão polinucleotídeo quinase, polinucleotídeo quinase e adenosina trifosfato (ATP). As misturas de reação foram incubadas a 37°C por 60 min. até fosforilarem a extremidade 5' dos fragmentos de gene. Os dois tubos foram postos num banho de água a 95°C para incubar por 10 min. Então os tubos foram naturalmente resfriados até a temperatura ambiente. O tampão T4 ligase e T4 ligase foram adicionados a cada tubo, e as misturas foram

incubadas de um dia para o outro a 16°C para permitir a ligação dos fragmentos de genes.

[062] Plasmídeo: um plasmídeo contendo um promotor Lac (um promotor PL controle de temperatura, ou um promotor Tac) foi digerido com endonucleases de restrição EcoR I e Hind III e extraído com uma solução de fenol / clorofórmio. A mistura foi centrifugada e a fase aquosa foi coletada. A fase aquosa foi extraída com clorofórmio e centrifugada por três vezes. A fase aquosa resultante foi precipitada com isopropanol, centrifugada e secada ao ar.

[063] O plasmídeo digerido e o fragmento de gene ligado foram misturados entre si. O tampão T4 ligase e a T4 ligase foram adicionados à mistura e incubados à temperatura ambiente por de 3 a 4 horas.

[064] Cultura das células hospedeiras: E. Coli JM103 foram incubadas a 37°C em solução de cultura LB contendo 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl por 4 horas com agitação. As culturas de bactéria foram centrifugadas e os precipitados foram tratados com solução de CaCl<sub>2</sub> e mantidos a 4°C para uso posterior.

[065] Transformação: O plasmídeo clonado foi transformado em células hospedeiras E. Coli JM103. As células de bactéria transformadas foram incubadas em um banho de gelo por 30 minutos, e então incubadas a 42°C por 2 minutos. As células de bactéria foram espalhadas sobre uma placa de ágar contendo ampicilina e foram incubadas de um dia para o outro a 37°C. As colônias que cresceram na placa de ágar foram selecionadas como clones positivos contendo os plasmídeos recombinantes.

#### C. Fermentação

[066] A cepa de bactéria hospedeira selecionada e o plasmídeo desejado foram incubados com agitação em solução de cultura LB. 0,5 mM de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foram adicionados à solução de cultura para induzir a expressão do peptídeo desejado. Após incubação de um dia para o outro, as células de bactéria foram colhidas por centrifugação. Os peptídeos expressados foram identificados por eletroforese em gel poliacrilamida (PAGE) contendo 12% de SDS.

#### D. Corpos de inclusão

[067] Dez garrafas, cada qual contendo 300 mL de cultura de bactérias, foram incubadas com agitação sob as condições descritas acima. Após a indução da expressão

da proteína, uma solução de lise (20 mM de tampão de ácido fosfórico contendo 1% NaCl, pH 7,5) e lisozima foram adicionados à solução de cultura e incubados a 30°C por 30 minutos e então centrifugados para coletar os precipitados. Os precipitados coletados foram tratados com 6 M de hidrocloreto de guanidina (Gu.HCl) para dissolver os corpos de inclusão. A solução foi centrifugada, e o sobrenadante resultante sofreu diálise para remover o Gu.HCl. Os precipitados resultantes da diálise foram lavados três vezes com 20 mM de tampão de ácido fosfórico (pH 7,5) contendo 1% de NaCl e 0,1% de Tween 80 para obter os corpos de inclusão.

#### E. Degradação

[068] Os corpos de inclusão foram dissolvidos em solução de uréia 8 M. O ácido hidrocloreto e o brometo de cianogênio foram adicionados à solução. A concentração final de ácido hidrocloreto na solução foi de 50 mM. A solução foi agitada no escuro e sob a proteção do gás nitrogênio por 2 horas para fragmentar os corpos de inclusão. Foi usada análise HPLC para monitorar o processo.

#### F. Purificação

[069] Após os corpos de inclusão serem fragmentados, o produto bruto foi obtido através de cromatografia em sefarose G-25. O produto bruto foi adicionalmente purificado por HPLC para obter o produto final. Similar ao produto sintetizado através de processo químico, o peso molecular experimental do peptídeo obtido medido por espectrometria de massa era consistente com seu peso molecular teórico.

### **Exemplo 3. Exendina-4 modificada com derivados de metoxi-polietileno glicol linear (mPEG) (Mf: 5.000 Da)**

[070] 1,0 mg de exendina-4 foi posto em cada um de três tubos, e dissolvido em tampão de ácido fosfórico tendo valores de pH diferentes, respectivamente. 5,8 mg de mPEG ativada por N-hidroxisuccinamida (Mf: 5000 Da) foram adicionados em cada tubo. As misturas foram postas numa mesa agitadora por uma hora à temperatura ambiente. Os produtos resultantes foram analisados para medir a quantidade de exendina-4 não modificada usando HPLC Agilent 1100 (condições de análise: ácido fosfórico 0,1% como solvente A e ácido fosfórico 0,1% + acetonitrila 80% como solvente B, gradiente: 35-70% de solvente B/25 minutos). Os resultados foram como segue:

## Efeito de valores diferentes de pH na PEG-lação de exendina-4

valores de pH	exendina-4 não modificada
6,5	52%
7,5	21%
8,5	4%

[071] Uma solução (valor de pH de 3 a 4) contendo exendina-4 modificada por mPEG foi obtida após a acetonitrila ser removida da solução obtida pela separação de fases reversa acima.

**Exemplo 4. Análogos de exendina-4 modificadas com derivados de mPEG linear (Mn: 21.000 Da)**

[072] 1,0 mg de análogo de exendina-4 foi misturado com 2,0 mL de tampão de ácido fosfórico (pH 4,5) contendo NaBH<sub>3</sub>CN. 5,0 mg de derivados de mPEG ativados por aldeído com um peso molecular de 21.000 Da foram misturados com o análogo de exendina-4 e postos numa mesa agitadora reagindo de um dia para o outro à temperatura ambiente. A solução de reação foi purificada por cromatografia Agilent 1100 usando a coluna semi-preparativa Zorbax SB-300 (condições de análise: ácido fosfórico 0,1% como solvente A e ácido fosfórico 0,1% + acetonitrila 80% como solvente B, gradiente: 35-70% de solvente B/25 minutos). Foi obtido depois disso um análogo de exendina-4 modificada por mPEG no terminal N.

[073] Após a acetonitrila ser removida da solução coletada acima com um evaporador rotatório, uma coluna de dessalinização foi usada para trocar o tampão da exendina-4 modificada, que foi então dissolvida no tampão de ácido fosfórico (pH 7,0 a 8,0) com 0,001 a 1,0% (p/v) de 3-metilfenol.

**Exemplo 5. Análogo de exendina-4 modificada com derivados de mPEG (Mn: 40.000 Da) tendo a estrutura da fórmula IV**

[074] 1,0 mg de um análogo de exendina-4 (SEQ ID NO.: 251) foi adicionado a 4,0 mL de tampão de ácido fosfórico (pH 7,0). 280 mg de derivado de mPEG ativado por N-hidroxisuccinimida (fórmula IV) com um peso molecular de 40.000 Da foram misturados

com o análogo de exendina-4 preparado acima, e colocados na mesa agitadora reagindo por uma hora à temperatura ambiente. Após isso, a mistura de reação foi diluída com 200 mL de tampão bistris (pH 7,0) num béquer de 250 mL para uso posterior.

[075] Uma coluna de troca aniônica DEAE FF ou ANX FF foi equilibrada com tampões bistris (pH 7,0). A mistura de reação diluída foi carregada na coluna de troca aniônica para permitir que a substância alvo fosse absorvida na resina de troca aniônica. Análogos de exendina-4 única ou multiplamente modificados foram eluídos através do gradiente de eluição linear de NaCl em concentrações diferentes, e o eluente foi coletado com um coletor de fração. O peptídeo de exendina-4 não modificada foi então eluído usando NaCl 1M. As frações de eluente a partir do processo de separação e purificação foram mostradas na figura 3, em que os rótulos 2, 3 e 4 indicam os picos de eluição de análogo de exendina-4 multiplamente modificada com mPEG, análogo de exendina-4 unicamente modificada com mPEG e análogo de exendina-4 não modificada, respectivamente. O análogo de exendina-4 modificada foi submetido a eletroforese em gel com SDS-PAGE. O peso molecular do análogo de exendina-4 modificada (com peso molecular teórico de 44.300 Da) determinado por SDS-PAGE foi levemente maior que 43.000 Da (Figura 4), indicando que o produto obtido era realmente o análogo de exendina-4 unicamente modificada com derivados de mPEG (Mn: 40.000).

[076] O eluente coletado contendo análogo de exendina-4 unicamente modificada por mPEG foi concentrado usando equipamento de ultrafiltração (um tubo de centrífuga de ultrafiltração ou um dispositivo de ultrafiltração). A solução concentrada foi carregada numa coluna de dessalinização para troca com tampão de ácido acético. Finalmente, o agente de ajuste isotônico (tal como manitol e NaCl 0,9%) e 0,001 a 1,0% (p/v) de reagente antibacterial (tal como 3-metilfenol) foram adicionados ao tampão de ácido acético contendo o análogo de exendina-4 modificada.

**Exemplo 6. Teste de efeito de droga de 24 h de análogos de exendina unicamente modificadas por derivados de mPEG (Mf: 5.000 Da e Mn: 21.000 Da)**

[077] Animal de teste: camundongos C57,  $20 \pm 2$  g, 8 camundongos em cada grupo, um total de 4 grupos.

[078] Grupo de controle 1: água esterilizada foi injetada subcutaneamente em cada camundongo.

[079] Grupo de controle 2: 0,025 µg de análogo de exendina-4 foram injetados subcutaneamente em cada camundongo.

[080] Grupo de droga 1: 0,625 µg 0,025 µg de análogo de exendina-4 unicamente modificadas por derivados de mPEG (Mf: 5.000 Da) foram injetados subcutaneamente em cada camundongo.

[081] Grupo de droga 2: 0,625 µg 0,025 µg de análogo de exendina-4 unicamente modificadas por derivados de mPEG (Mf: 21.000 Da) foram injetados subcutaneamente em cada camundongo.

[082] Amostras de sangue foram tiradas de cada grupo de camundongos em 4, 8, 12, 16 e 24 horas após a injeção da droga. 200 µL de solução de glicose 20% foram injetados no abdômen de cada camundongo 30 minutos após a amostragem sanguínea. O nível de açúcar no sangue foi medido usando um kit de reagente a glicose (Shangai ShenSuo Reagents Co., Ltd.). Como mostrado na figura 5, os análogos de exendina-4 modificados com derivados de mPEG (Mn: 21.000 Da) permaneceram efetivos 16 horas após a injeção. O período efetivo para análogo de exendina-4 modificada com mPEG (Mf: 5.000 Da) foi de entre 12 a 16 horas após a injeção da droga. O período efetivo para análogos de exendina-4 não modificadas foi de menos de 12 horas. O período efetivo para baixar o nível de açúcar no sangue foi mais longo usando análogos de exendina-4 modificadas por derivados lineares de mPEG com um peso molecular maior que usando análogos de exendina-4 modificadas por derivados lineares de mPEG com um peso molecular menor.

**Exemplo 7. Teste de efeito de droga de 72 h de análogos de exendina modificadas por mPEG linear (Mn: 21.000 Da) e mPEG ramificado tendo a estrutura de fórmula IV (Mn: 40.000 Da)**

[083] Animal de teste: camundongos C57, 20 ± 2 g, 8 camundongos em cada grupo, um total de 5 grupos.

[084] Grupo de controle 1: água esterilizada foi injetada subcutaneamente em cada camundongo.

[085] Grupo de controle 2: 0,025 µg de peptídeo exendina-4 foram injetados

subcutaneamente em cada camundongo.

[086] Grupo de controle 3: 0,025  $\mu\text{g}$  de análogo de exendina foram injetados subcutaneamente em cada camundongo.

[087] Grupo de droga 1: 0,625  $\mu\text{g}$  0,025  $\mu\text{g}$  de análogo de exendina-4 modificada por mPEG (Mn: 21.000 Da) foram injetados subcutaneamente em cada camundongo.

[088] Grupo de droga 2: 0,625  $\mu\text{g}$  0,025  $\mu\text{g}$  de análogo de exendina-4 modificada por mPEG (Mn: 40.000 Da) foram injetados subcutaneamente em cada camundongo.

[089] Amostras de sangue foram tiradas de cada grupo de camundongos em 4, 8, 24, 48 e 72 horas após a injeção da droga. 200  $\mu\text{L}$  de solução de glicose 20% foram injetados no abdômen de cada camundongo 30 minutos após a amostragem sanguínea. O nível de açúcar no sangue foi medido usando um kit de reagente a glicose. Como mostrado na figura 6, o análogo de exendina-4 modificada por um derivado de mPEG ramificado (Mn: 40.000 Da) permaneceu efetivo por pelo menos 72 horas após a injeção da droga. O análogo de exendina-4 modificada por um derivado linear de mPEG (Mn: 21.000 Da) permaneceu efetivo por cerca de 24 horas após a injeção da droga.

### **Exemplo 8. Teste de efeito de droga de análogos de exendina-4 unicamente modificadas por derivados de mPEG**

[090] Amostras de teste: um total de 8 amostras, análogos de exendina-4 unicamente modificadas por derivados de mPEG (fórmula II) com pesos moleculares de 21.000 Da, 30.000 Da e 40.000 Da, respectivamente; análogos de exendina-4 unicamente modificadas por derivados de mPEG (fórmula IV) com pesos moleculares de 21.000 Da, 30.000 Da e 40.000 Da, respectivamente; análogos de exendina-4 unicamente modificadas por derivados de mPEG (fórmula II) com pesos moleculares de 21.000 Da e 30.000 Da, respectivamente.

[091] Animal de teste: camundongos C57,  $20 \pm 2$  g, 3 grupos de amostragem, 24 camundongos em cada grupo.

[092] Porque os camundongos não podem agüentar amostragem sanguínea freqüente, foi projetado tirar sangue dos grupos de amostragem em tempos diferentes após a injeção das amostras. O agendamento de amostragem de sangue após a injeção da droga foi listado como segue:

Primeiro grupo	Segundo grupo	Terceiro grupo
2, 8, 72 horas	4, 24, 48 horas	16, 36, 60 horas

[093] Cada grupo de amostragem foi dividido em 8 subgrupos. Cada subgrupo consistia de 3 camundongos. No começo do teste, cada subgrupo foi injetado com um análogo de exendina-4 modificada diferente, que é chamado de L21K, L30K (modificação por um único derivado linear de mPEG tendo pesos moleculares de 21.000 Da e 30.000 Da, respectivamente; Y21K, Y30K, Y40K (modificação por um único derivado de mPEG tendo a estrutura de fórmula IV e pesos moleculares de 21.000 Da, 30.000 Da e 40.000 Da, respectivamente); U21K, U30K, U40K (análogos de exendina-4 modificadas com um único mPEG tendo a estrutura de fórmula II e pesos moleculares de 21.000 Da, 30.000 Da e 40.000 Da, respectivamente). Todos os análogos de exendina-4 modificadas por mPEG diferentes continham 0,625 µg de análogos de exendina-4. 200 µL de glicose 20% foram injetados no abdômen de cada camundongo após a injeção da droga. Após meia hora, foram tiradas amostras sanguíneas de todos os camundongos. As amostras sanguíneas subsequentes foram conduzidas de acordo com a tabela de agendamento de amostras acima. 200 µL de glicose 20% foram injetados no abdômen de cada camundongo meia hora antes de cada amostragem sanguínea. As figuras de 7 a 9 mostraram que a estrutura molecular e o peso dos derivados de PEG têm grande influência sobre a bioatividade dos análogos de exendina-4. A bioatividade dos análogos de exendina-4 modificadas por um único mPEG tendo a estrutura de fórmula II permanece efetiva por um tempo maior que aquele dos análogos de exendina-4 modificadas por PEG tendo a estrutura de fórmula IV e pelo PEG linear nas 72 horas após a injeção da droga. Para os análogos de exendina-4 modificadas por um único PEG tendo a mesma estrutura ramificada, quanto maior o peso, melhor a bioatividade de baixar o nível de açúcar no sangue exibida durante as 72 horas. L30K não teve uma bioatividade notável pelas 72 horas após a injeção da droga, o que mostrou que o maior peso molecular de PEG linear teve um efeito negativo sobre a bioatividade dos análogos de exendina-4 modificadas.

**Exemplo 9. Teste de farmacocinética de análogos de exendina-4 modificadas por um único PEG**

[094] Animal de teste: camundongos SD, machos, de 250 a 300 g, 2 grupos, 4

camundongos por cada grupo.

[095] Grupo de droga 1: os camundongos foram injetados cada um com análogos de exendina-4 (SEQ ID NO: 251) modificadas por um único derivado de mPEG (fórmula II, Mn: 30.000 Da) contendo 4,375 µg de análogos de exendina-4 (U30K).

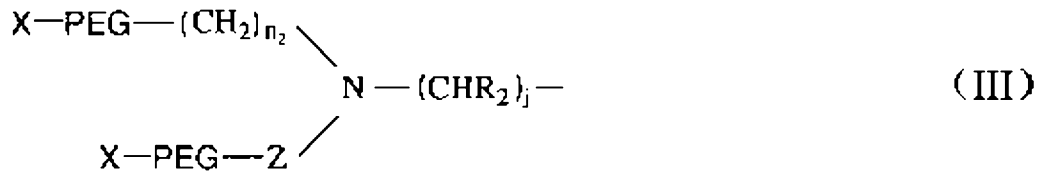
[096] Grupo de droga 2: os camundongos foram injetados cada um com análogos de exendina-4 (SEQ ID NO: 251) modificadas por um único derivado de mPEG (fórmula IV, Mn: 40.000 Da) contendo 4,375 µg de análogos de exendina-4 (Y30K).

[097] As amostras sanguíneas foram colhidas de cada grupo de camundongos em 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a injeção da droga. A concentração de exendina-4 no sangue foi testada usando um kit de imunoenensaio enzimático (EIA) adquirido de Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Califórnia, USA. Os dados foram analisados por Pharmaceutical Kinetics Software 1.0.2 (Shanghai Hongneng Software Co. Ltd.), e os resultados foram mostrados na figura 10. O tempo levado para que metade de U30K fosse absorvido foi de 10,78 horas e o tempo levado para que metade de U30K fosse eliminado foi de 21,44 horas. O tempo levado para que metade de Y40K fosse absorvido foi de 5,53 horas e o tempo levado para que metade de Y40K fosse eliminado foi de 40,77 horas. O tempo para as duas amostras atingirem a concentração de pico no sangue foi de cerca de 12 horas após a injeção da droga. A concentração de pico das duas amostras no sangue foi de cerca de 20 ng/mL.

[098] Como mencionado acima, o precedente destina-se meramente a ilustrar as várias formas de realização do presente invento. As modificações específicas discutidas acima não devem ser consideradas como limitações ao escopo do presente invento. Estará evidente para um técnico da área que várias equivalências, alterações e modificações podem ser feitas sem fugir ao escopo do presente invento, e entende-se que tais formas de realização equivalentes devem ser incluídas aqui.



derivados de PEG compreenderem um peso molecular em uma faixa de 20.000 Da a 50.000 Da, e em que ditos um ou mais derivados de PEG compreendem a estrutura ramificada apresentada na Fórmula III abaixo:



em que X é hidrogênio ou um grupo protetor; PEG é  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q-$ , q é um inteiro positivo;  $n_2$  é um inteiro de 0 a 10; Z é um grupo selecionado de:  $(\text{CH}_2)_i$ ,  $(\text{CH}_2)_i\text{OCO}$ ,  $(\text{CH}_2)_i\text{NHCO}$ , ou  $(\text{CH}_2)_i\text{CO}$ , em que i é um inteiro de 0 a 10;  $R_2$  é hidrogênio, um grupo alquila ( $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ) substituído ou não, um grupo arila, aralquila ou heteroalquila substituído; e j é um inteiro de 1 a 12.

4. Exendina modificada por PEG ou análogo de exendina, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada por** ditos um ou mais derivados de PEG compreenderem a estrutura ramificada apresentada na Fórmula IV abaixo:



em que PEG é  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q-$ , q é um inteiro positivo, e Me é um grupo metila.

5. Exendina modificada por PEG ou análogo de exendina, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado por** ditos um ou mais derivados de PEG serem ativados para se ligarem a dita exendina ou análogo de exendina por N-hidroxissuccinamida.

6. Exendina modificada por PEG ou análogo de exendina, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada por** compreender um, dois, três ou quatro derivados de PEG ramificados.

7. Exendina modificada por PEG ou análogo de exendina, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** compreender um derivado de PEG ramificado.

8. Composição, **caracterizada por** compreender as exendinas modificadas por

PEG ou análogos de exendinas, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7.

9. Uso de uma exendina modificada por PEG ou análogo de exendina, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, ou de acordo com a composição da reivindicação 12, **caracterizado por** as exendinas serem para a fabricação de um medicamento para prevenir ou tratar diabetes mellitus.

10. Exendina modificada por PEG ou análogo de exendina, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, para uso no tratamento da diabetes mellitus.

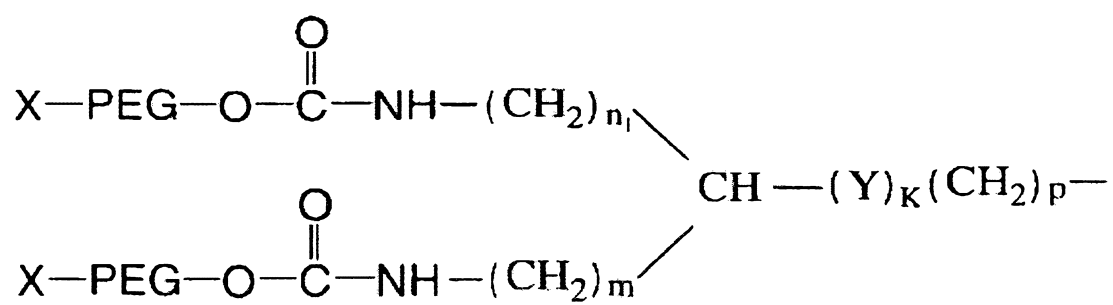


Fig. 1

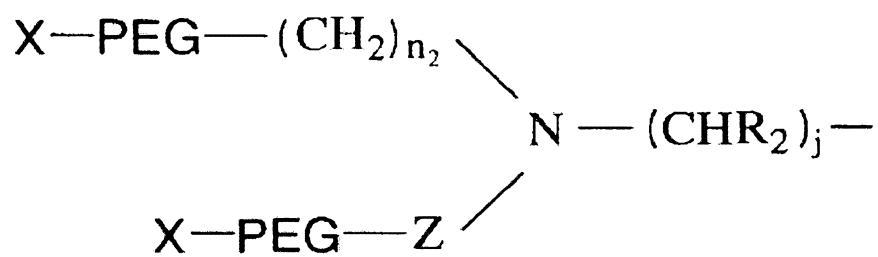


Fig. 2

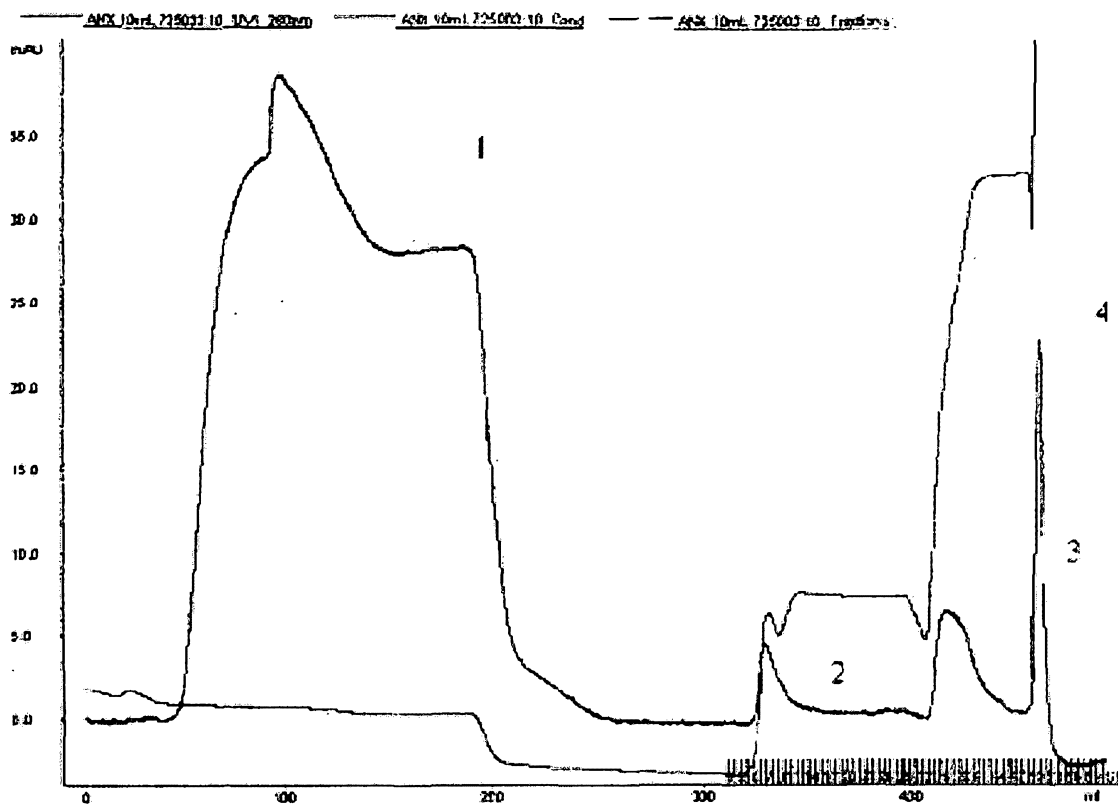
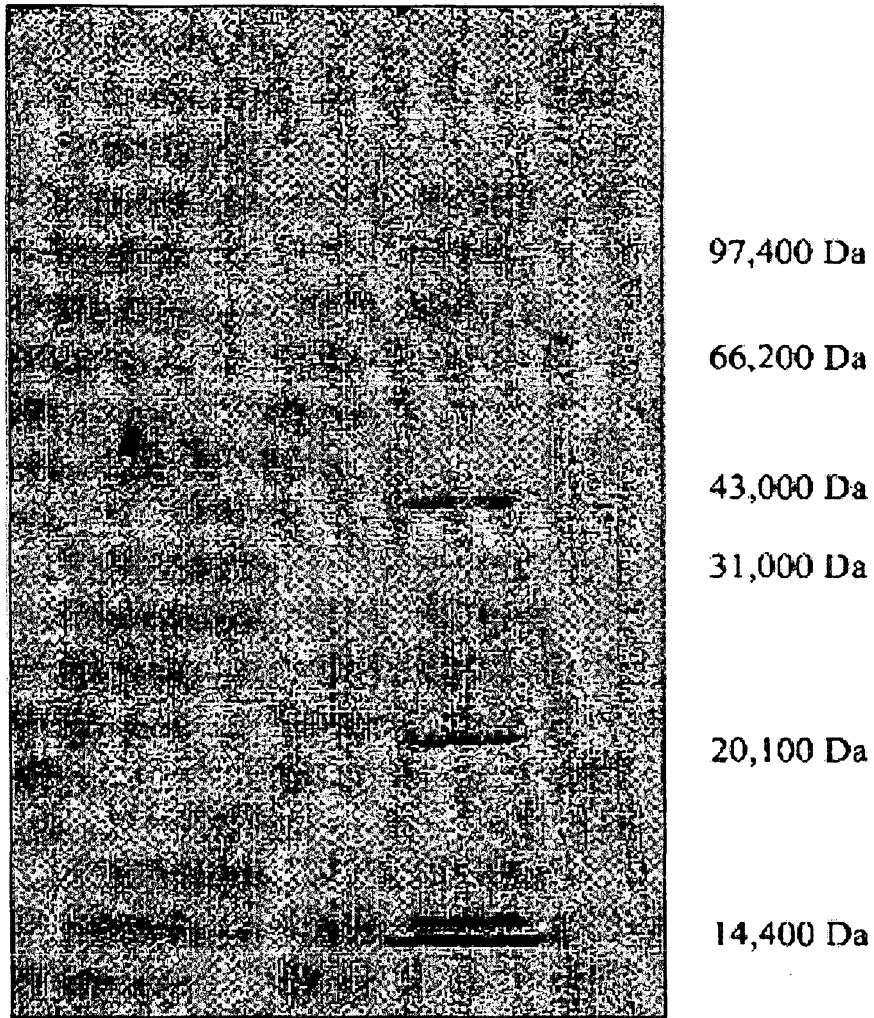


Fig. 3



1 Padrão

Fig. 4

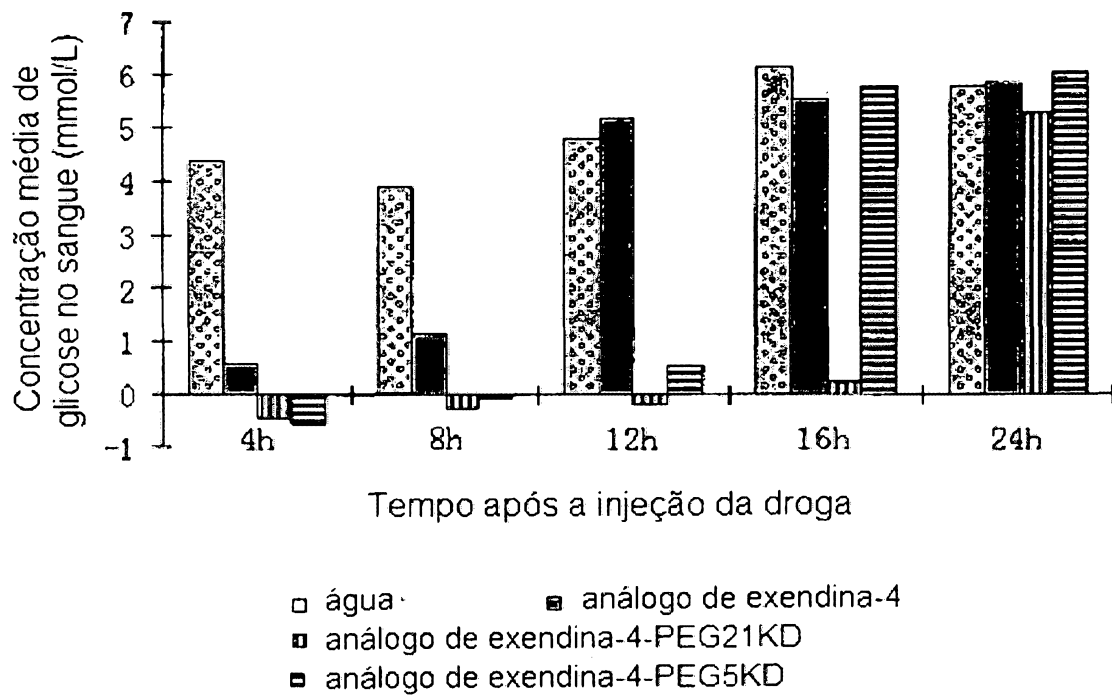


Fig. 5

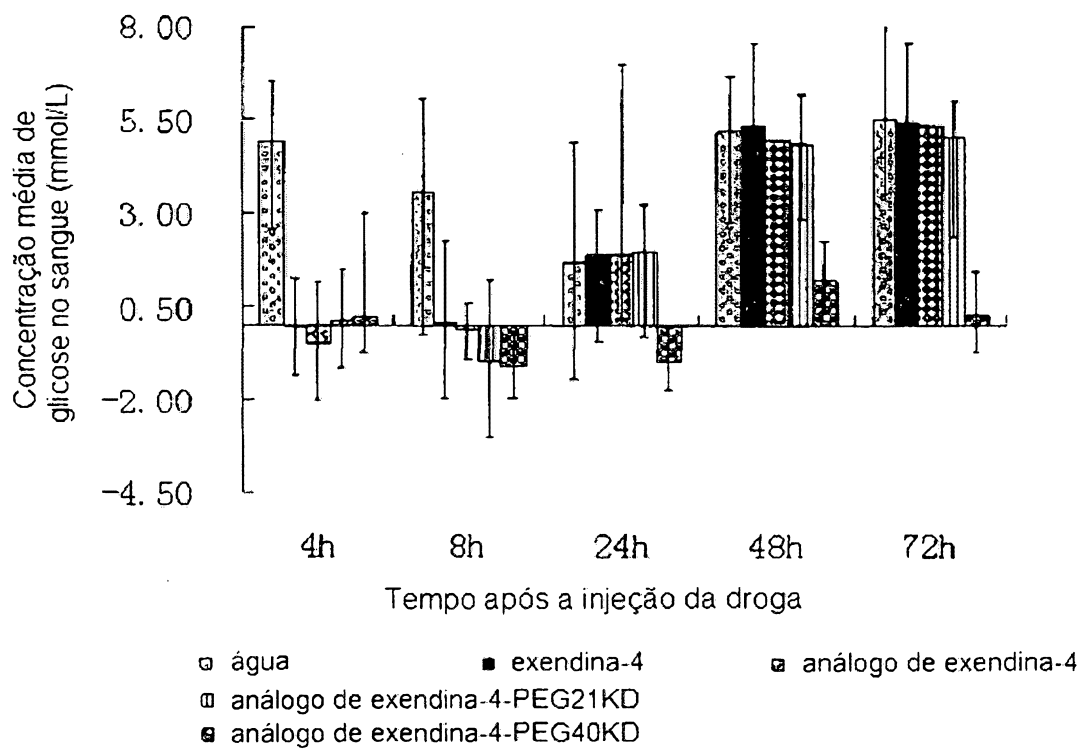


Fig. 6

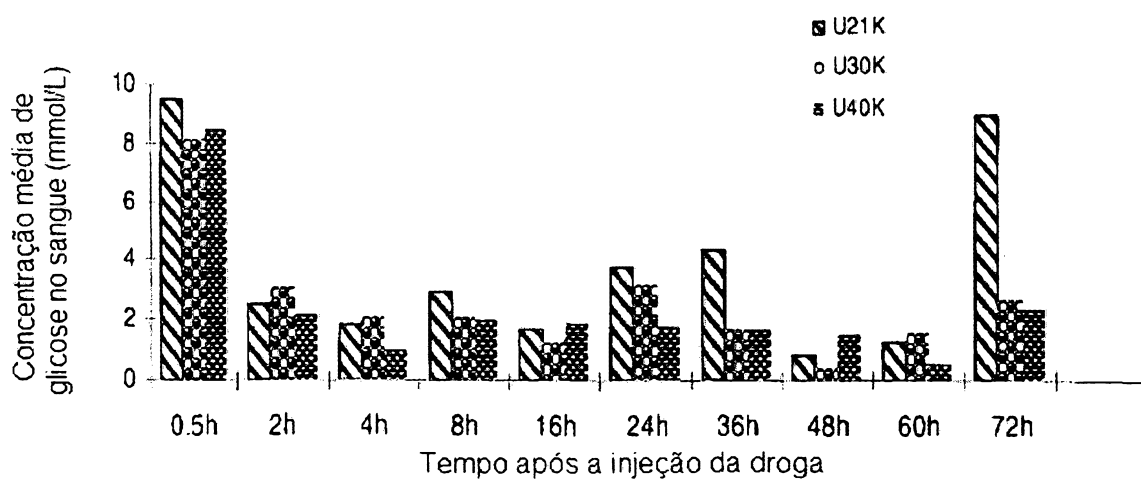


Fig. 7

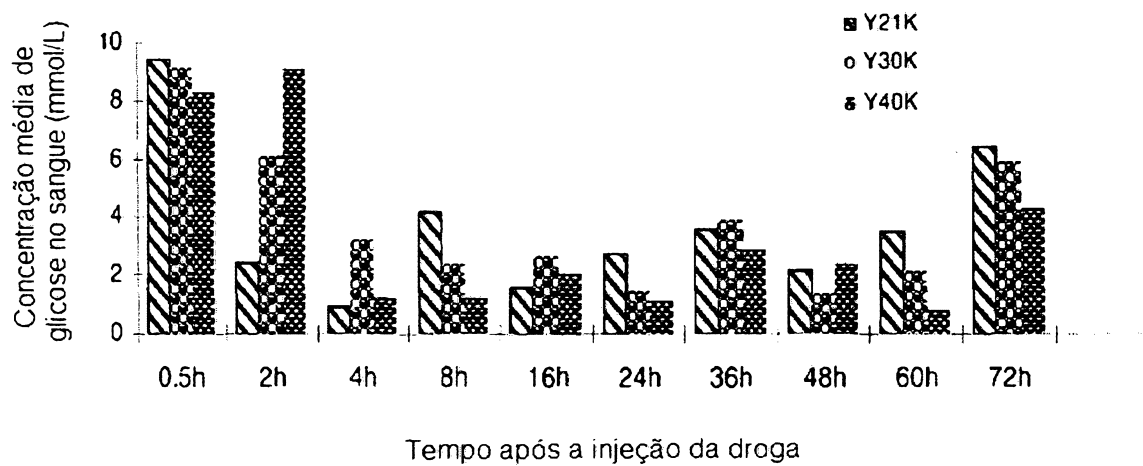


Fig. 8

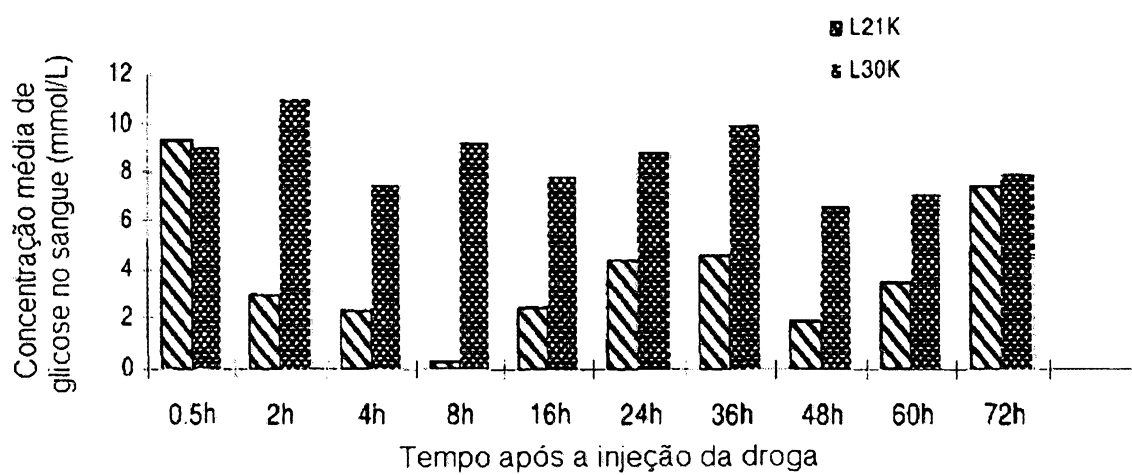


Fig. 9

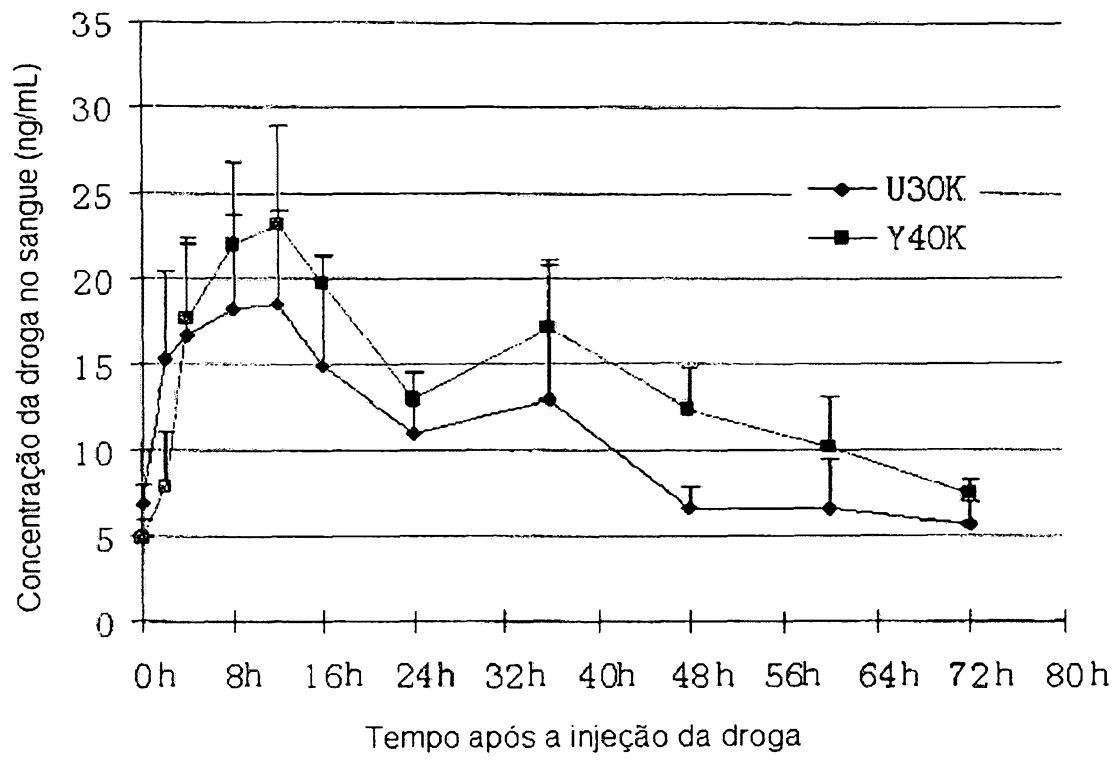


Fig. 10