



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

(21) PI 1014416-1 A2



(22) Data do Depósito: 23/04/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 18/08/2020

(54) Título: NOVA VARIANTE DE EXENDINA E CONJUGADO DESTA

(51) Int. Cl.: C07K 14/575; C07K 17/08; A61K 38/22; A61K 47/48; A61P 3/10; (...).

(30) Prioridade Unionista: 23/04/2009 CN 200910135363.5.

(71) Depositante(es): PEGBIO CO.,LTD.

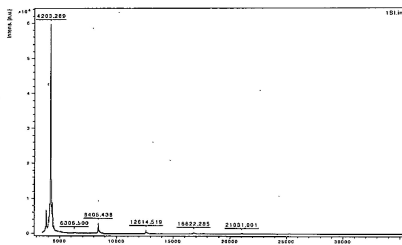
(72) Inventor(es): MICHAEL M. XU; YONGXIANG WANG.

(86) Pedido PCT: PCT CN2010072094 de 23/04/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/121559 de 28/10/2010

(85) Data da Fase Nacional: 21/10/2011

(57) Resumo: NOVA VARIANTE DE EXENDINA E CONJUGADO DESTA. A invenção fornece uma nova variante de Exendina e um conjugado da variante de Exendina que conjuga o polímero neste, a composição farmacêutica compreendendo estes e o uso destes para tratar doenças tais como redução da glicose sanguínea, tratar diabetes, especialmente diabetes do tipo II. A invenção também fornece o uso do conjugado Exendina para baixar o peso corporal.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"NOVA VARIANTE DE EXENDINA E CONJUGADO DESTA"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se relaciona às novas variantes de Exendina, aos conjugados destas com polímeros, e a composição farmacêutica contendo estes, assim como ao uso das variantes de Exendina, conjugados, e composições farmacêuticas na redução da glicose sanguínea, especialmente no tratamento da diabetes (em particular a diabetes tipo II). A presente invenção também se relaciona ao uso do conjugado de Exendina na redução do peso corporal.

10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Com o desenvolvimento social, o prolongamento da expectativa de vida e modificação do estilo de vida, a diabetes mellitus foi um dos principais problemas do serviço de saúde ao redor do mundo. Tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, a morbidez da diabetes mellitus está crescendo rapidamente. Em 2007, há 15 aproximadamente 246 milhões de pacientes com diabetes no mundo, e um paciente com diabetes morre a cada 10 segundos ao redor do mundo. É previsto que a população de pacientes com diabetes no mundo alcançará 333 milhões até 2025. A China foi uma região severa para a diabetes. Na China, a população de pacientes com diabetes tem atualmente 40 milhões, que é o segundo maior número no mundo (o primeiro é a Índia), com a morbidez de 20 aproximadamente 5 %. A diabetes mellitus compreende dois tipos: um é a diabetes mellitus dependente de insulina (diabetes tipo 1) e o outro é a diabetes mellitus "não dependente de insulina" (diabetes tipo 2). Entre elas, a diabetes tipo 2 contribui em mais de 90% de diabetes. A diabetes tipo 2 é caracterizada por uma secreção não controlada de insulina ou função assim como a disfunção da célula β , resultando em doença do lipídio, carboidrato e metabolismo da proteína. Pode levar a hiperglicemia crônica e eventualmente induz complicações 25 ocorrendo na microvasculatura, macrovasculatura e vários órgãos. Neste momento, há duas classes de medicamento para controlar a diabetes mellitus: 1) promotores de secreção da insulina, tal como sulfoniluréias, meglitinidas, e inibidores da dipeptidil peptidase, análogos de GLP-1; e 2) promotores de secreção de não-insulina, tal como insulina, inibidores de α -glucosidase, biguanidas, tiazolidinadionas, e análogos de insulina. Atualmente, mais 30 medicamentos anti-diabéticos geralmente usados em clínica são menos eficientes para a diabetes tipo 2. Eles não conseguem parar o dano progressivo da célula β do pâncreas, reduzir o nível de sangue de HbA1c, e prevenir complicações da diabetes, tal como doença cardíaca e falha do rim. Além disso, eles têm, até certo ponto, efeitos colaterais tóxicos. 35 Consequentemente, há uma necessidade de estudar um novo medicamento para o tratamento da diabetes tipo 2.

Em 1985, um hormônio intestinal, como o peptídeo-1 tipo Glucagon (GLP-1), foi

descoberto. GLP-1 é expresso pelo gene dos proglucagons após comer, e é segregado principalmente por células L na mucosa intestinal. GLP-1 estimula a célula β da ilhota do pâncreas a secretar insulina (J MED Chem,47, 4128-4134, 2004), e tem um papel importante no nível de estabilização da glicose sanguínea. A administração de GLP-1 pode

5 controlar a glicose sanguínea ao nível normal em pacientes com diabetes tipo 2 (Diabetes Care, 15, 270-276, 1992; Lancet, 359, 824-830, 2002; Endoer. Rev, 16, 390-410, 1996; Diabetologia, 28, 565-573, 1985). GLP-1 tem funções como segue: ação dependente da glicose na célula β da ilhota do pâncreas para promover a transcrição do gene da insulina, e aumentar a biossíntese e a secreção da insulina; estimular a proliferação e a diferenciação

10 da célula β e inibir a apoptose da célula β para aumentar a quantidade de células β da ilhota do pâncreas; inibir a secreção dos glucagons; aumentar a sensibilidade dos receptores de insulina em células periféricas; diminuir o nível de HbA1c; suprimir o apetite e a fome; atrasar o esvaziamento gástrico (Diabetic Med, 18, 144-149, 2001; Diabetes, 51, 1443-1452, 2002; Diabetologia, 45, 1263-1273, 2002; Diabetes, 50, 525-529, 2001; Diabetes, 50, 725,

15 2001; Diabetes, 52, 365-371, 2003; Recent Prog. Hormne Res. 56, 377-399, 2001; Disbetologia, 39, 1546-1553, 1996; Am. J. Physicl Endocrinol. Metab, 281, E242-247, 2001; U.S. patent 477967, 478017, 478425; Diabetes Care, 22, 403-408, 1999; J. Clin. Endocrinology and Metabolism, 88, 3082-3089, 2003; Diabetes, 44, 1295, 1995). Entretanto, GLP-1 é degradado facilmente pelo dipeptidil peptidase (DPP IV) no corpo, e tem uma meia

20 vida de menos de 2 minutos, e assim os GLP-1 não podem ser usados como uma droga anti-diabética eficaz.

Exendina-4 é um polipeptideo que é achado na saliva do monstro de Gila, um lagarto venenoso que vive no Arizona e no Novo México dos Estados Unidos (J. Biol. Chem, 265, 20259-20262, 1990; J. Biol. Chem, 267, 7402-7405, 1992). Exendina-4 é altamente

25 homóloga com GLP-1 (7-36) (53%). É informado que a Exendina-4 pode se ligar ao receptor de GLP-1 e exibir um efeito farmacológico agonístico semelhante ao de GLP-1, por exemplo, aumentando a síntese da insulina, promovendo a secreção de insulina de uma maneira dependente da glicose; estimulando a proliferação e regeneração de células β e impedindo a apoptose de células β a fim de aumentar a quantidade de células β ; impedindo a secreção

30 de glucagons; impedindo a geração de glicogênio sem induzir uma hipoglicemia severa; impedindo a motilidade e secreção gastrointestinal depois de comer; diminuindo o apetite e diminuindo a ingestão de comida; protegendo células nervosas (Nat. Biotech, 23, 857-861, 2005; J. Biol. Chem., 266, 2897-2902, 1991; J. Biol. Chem., 266, 21432-21437, 1992; Diabetes, 44, 16-19, 1995; Nature, 379, 69-72, 1996). O efeito de Exendina-4 para promover

35 a secreção de insulina e para inibir a secreção do glucagon após comer é dependente da glicose sanguínea, que é vantajoso comparado com as sulfonilureias atualmente usadas, e em particular, a Exendina-4 é menos suscetível a induzir a hipoglicemia, e diminui

extremamente a frequência da monitoração da glicose sanguínea e também abaixa o peso corporal. A formulação b.i.d. de Exendina-4 (Exenatida, comercializada como "Byetta"), co-desenvolvida por Amylin e por Eli Lilly, é aprovada para o mercado nos E.U.A e na Europa (patente US 5,424,286; 6,858,576; 6,872,700; 6,902,744; 6,956,026; 7,297,761). Como tal, este tipo de medicação foi amplamente utilizado no tratamento da diabetes e da obesidade ao redor do mundo.

Os polipeptídeos farmacêuticos exigem injeções múltiplas diariamente, uma vez que estes fármacos têm a meia vida curta no corpo e estabilidade física e química pobre, e eles estejam suscetíveis à degradação por várias proteases. Exenatida é usado b.i.d como uma injeção de s.c., trazendo aos pacientes uma carga pesada no corpo, na psicologia e na economia, e assim a conformidade dos pacientes é limitada. Conseqüentemente, os estudos atuais de drogas anti-diabéticas concentram-se na alteração estrutural da Exendina-4 e no desenvolvimento de nova forma de dosagem, a fim de prolongar a meia vida plasmática da Exendina-4 e aumentar a exposição sistemática da droga.

A técnica de modificação do polímero é uma técnica de modificação poderosa que foi desenvolvida a partir dos anos 70, onde a peguilação é uma técnica comum. Esta técnica consiste em conjugar o PEG quimicamente a uma proteína farmacêutica, a fim de modificar a superfície da proteína. Através da modificação do PEG, o peso molecular das proteínas é aumentado e a taxa de abertura no rim diminuído. Além disso, uma cadeia do PEG conjugada resulta num obstáculo estérico na molécula da proteína modificada, conduzindo à redução da hidrólise da proteína por proteases no sangue. Assim, prolonga-se eficientemente a residência das proteínas na circulação, resultando no prolongamento da meia vida plasmática e a exposição sistemática da droga, tendo por resultado uma eficácia melhorada.

Atualmente, a peguilação progrediu em sua segunda geração, a peguilação de sítio específico. A peguilação de sítio específico pode ser usada para modificar especificamente determinados aminoácidos nas proteínas, impedindo desse modo a modificação aleatória. Como tal, a estrutura do centro ativo nas proteínas é menos influenciada e determinados sítios antigênicos são submetidos a uma intervenção seletiva, tendo por resultado a diminuição de desvantagens tais como a atividade biológica reduzida e a heterogeneidade aumentada devido a peguilação não sítio específica.

Cientistas realizaram alguns estudos na modificação do polímero de Exendina-4. Young and Prickett (CN1372570A) mostraram que a Exendina-4 é metabolizada principalmente pela depuração renal. Assim modificaram Exendin-4 usando o PEG com um peso molecular que varia de 500 a 20.000 Dalton (Da). Wenchao Bao, Hongjing Xu, Gang Yu, Yajun Zuo (CN101125207A) realizaram a modificação de amina em Exendina-4 usando o PEG com um peso molecular que varia de 20kDa a 50kDa.

Entretanto, há uma desvantagem na Exendina-4 existente ou em variantes desta e várias formas modificadas, incluindo a frequência de administração elevada, que traz aos pacientes cargas físicas, psicológicas e econômicas pesadas. Assim, a conformidade dos pacientes é limitada, e estas drogas não podem ser amplamente utilizadas.

- 5 Conseqüentemente, ainda precisa-se de novas variantes de Exendina-4 e variantes modificadas pelo polímero.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a presente invenção fornece uma variante de Exendina que tem a atividade do agonista do receptor GLP-1, onde um ou mais resíduos de aminoácidos são substituídos pela cisteína, comparado com a sequência tipo selvagem da Exendina. Opcionalmente, um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados e/ou substituídos na variante da Exendina, onde os aminoácidos a serem incorporados por adição ou por substituição podem ser aminoácidos naturais ou não-naturais ou análogos do aminoácido.

Em uma modalidade, a variante de Exendina tem uma sequência de aminoácidos na qual um ou mais resíduos de aminoácidos são substituídos pela cisteína e opcionalmente por outro aminoácido, comparado com tipo selvagem da

Sequência da Exendina-4

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 (SEQ ID NO: 1), ou

Sequência da Exendina-3

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 (SEQ ID NO: 2), ou sua sequência similar. As substituições do aminoácido são cada uma situada independentemente no N-terminal, C-terminal e/ou na parte interna da sequência do aminoácido tipo selvagem.

Em uma modalidade preferida, a variante de Exendina tem uma substituição da cisteína pelo menos no C-terminal da variante. Mais preferencialmente, a variante de Exendina tem uma substituição da cisteína no último aminoácido do C-terminal. Além disso, a variante de Exendina tem preferencialmente uma substituição da cisteína pelo menos em uma ou mais posições selecionadas do grupo que consiste nas posições que correspondem a Arg na posição 20, a Trp na posição 25, a Ala na posição 35 e a Ser na posição 39 da Exendina-4 ou da Exendina-3.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece um conjugado da variante de Exendina, onde uma ou mais frações do polímero naturais ou sintéticas (preferencialmente polímero fisiologicamente aceitável, tal como o polialquilenoglicol, mais particularmente o PEG) é conjugado à variante de Exendina. Na modalidade que as partes múltiplas do

polímero estão compreendidas no conjugado, cada uma das frações do polímero pode ser a mesma ou não. Preferencialmente, a fração do polímero é conjugada à variante da Exendina com uma ou mais cisteínas. Em uma modalidade, a parte do polímero é conjugada à variante de Exendina através da ligação do tioéter.

5 É conhecido por um técnico no assunto, numa biomolécula conjugada com uma fração do polímero, a biomolécula conjugada tem atividade biológica que é exponencialmente reduzida, a medida que o peso molecular da fração conjugada aumenta (por exemplo, começando de 4 kDa) (Bailon et al. Rational design of potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12:195-202; Bowen et al. Relationship between molecular weight and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mutein. *Experimental Hematology*, 1999, 27:425-32; Bailon et al. PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opin Deliv.*, 2009, 6:1-16). É também conhecido por um técnico no assunto que a meia-vida biológica e/ou meia-vida plasmática assim como a explosão sistemática da droga da molécula conjugada para prolongar ou
10 aumentar gradualmente, a medida que o peso molecular da fração conjugada aumenta.
15

No entanto, os inventores surpreendentemente descobriram que, comparado com a variante de Exendina não conjugada, a molécula conjugada da variante de Exendina da presente invenção ainda retem a maioria atividade do agonista receptor de GLP-1, mesmo
20 que o peso molecular das frações do polímero aumente até 30 kDa. Ainda que o peso molecular da fração de PEG aumente até 40 kDa ou mais, o conjugado da variante de Exendina da presente invenção ainda retem atividade substantiva de agonista receptor de GLP-1. Em particular, quando o peso molecular da fração do polímero aumenta de 5 kDa a 27 kDa, a atividade do agonista receptor de GLP-1 do conjugado da variante de Exendina é
25 substantivamente a mesma, comparado com a variante de Exendina não conjugada.

Assim, em uma modalidade preferida, a presente invenção fornece um conjugado da variante de Exendina com uma meia-vida biológica e/ou plasmática prolongada e a atividade substancial do agonista do receptor GLP-1.

Em uma modalidade, o polímero é polialquilenoglicol, e inclui, por exemplo, o de
30 polietilenoglicol, polipropilenoglicol entre outras coisas. Uma ou mais frações do polímero podem ter algum peso molecular apropriado, por exemplo, 2 kDa a 50kDa, preferivelmente 5 kDa a 30kDa, mais preferencialmente 20 kDa a 30 kDa, tal como 21 kDa, 22 kDa, 23 kDa, 24 kDa, 25 kDa 26kDa, 27 kDa, 28 kDa, 29 kDa, e 30 kDa assim como qualquer valor entre os peso moleculares acima.

35 Opcionalmente, o conjugado da variante de Exendina pode também ser conjugado com um ou mais polímeros acima que são idênticos ou não, em um ou mais resíduos do aminoácido. Estes um ou mais resíduos do aminoácido podem ser cada um situado

independente no N-terminal, C-terminal e/ou dentro da fração interna da variante de Exendina.

Na presente invenção, o polímero para a conjugação pode estar em qualquer configuração apropriada, incluindo, por exemplo, ramificação única, ramificação dupla,
5 ramificação múltipla e/ou ramificado, onde uma das ramificações ou partes pode ser a mesma ou não.

A presente invenção ainda fornece um método para preparar o conjugado da variante de Exendina como acima, compreendendo contatar a variante de Exendina com o polímero, o polímero é ligado preferencialmente com um grupo reativo ou ativado ao
10 contatar, de forma a conjugar o polímero ativado a um ou mais resíduos de cisteína da variante de Exendina. Em uma modalidade, as cisteínas na variante de Exendina são especificamente modificadas por PEG com comprimento diferente da cadeia do polímero e da estrutura do polímero, com a seleção do grupo de ativação específica e pH apropriado. Em uma modalidade particular, o grupo de ativação específica é maleimida.

15 A presente invenção ainda fornece uma composição farmacêutica, compreendendo a variante de Exendina e/ou conjugado da variante de Exendina da presente invenção, assim como opcionalmente um portador farmacêuticamente aceitável.

A presente invenção ainda fornece um método para tratar doenças, compreendendo a administração terapêutica de uma quantidade eficaz da variante de
20 Exendina e/ou conjugado da variante de Exendina e/ou composição farmacêutica da presente invenção a um sujeito na necessidade de tratamento. Similarmente, a presente invenção também fornece o uso da variante de Exendina e/ou conjugado da variante de Exendina e/ou composição farmacêutica da presente invenção para produzir um medicamento para o tratamento das doenças. As doenças podem ser selecionadas do
25 grupo consistindo de: síndrome de dumping pós-prandial, hiperglicemia, intolerância da glicose, enfermidades ou doenças pós-prandiais que podem ser aliviadas inibindo a secreção do glucagon, regulando o nível de triglicerídeos, e/ou reduzindo a ingestão de alimentos, a obesidade, doenças de alimentação, síndrome da resistência de insulina, diabetes, hiperglicemia, e hipoglicemia. Preferencialmente, a doença é diabetes. Mais
30 preferencialmente, a doença é diabetes tipo 1 ou diabetes tipo 2, em particular diabetes tipo 2.

É conhecido que a Exendina reduz o peso corporal de pacientes com obesidade e induz a náusea e vômito, onde o mecanismo de ação é associado com a inibição do centro de alimentação e centro de ativação de vômito no sistema nervoso central (Larsen.
35 Mechanisms behind GLP-1 induced weight loss. Br J Diabetes Vasc Dis 2008; 8: S34—S41; Schick et al. Glucagon like peptide 1 (7-36)-amide acts at lateral and medial hypothalamic sites to suppress feeding in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284:R1427—

35). O conjugado de Exendina ou de variante deste não pode atravessar a barreira sangue-cérebro devido ao peso molecular aumentado, reduzindo assim o vômito induzido pela Exendina. Conseqüentemente, antes da iniciação da presente invenção, os inventores nunca esperaram que o conjugado de Exendina ou da variante desta também teriam efeitos

5 reduzidos na redução da ingestão de alimentos e o peso corporal regulados pelo sistema nervoso central. Entretanto, os inventores encontraram inesperadamente que o conjugado de Exendina ou variante desta aumentou significativamente os efeitos na redução da ingestão de alimentos e de peso corporal, embora a Exendina de tipo selvagem e a variante de Exendina não conjugada ambas reduziram a ingestão e de alimentos e do peso corporal.

10 Assim, em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para reduzir o peso corporal administrando um conjugado de Exendina ou variante desta e/ou uma composição farmacêutica que compreende os mesmos. Além disso, a presente invenção também fornece o uso do conjugado de Exendina ou variante deste e/ou a composição farmacêutica que compreende os mesmos na produção de um medicamento para reduzir o

15 peso corporal. Em uma modalidade, o conjugado de Exendins ou a variante desta é o conjugado da variante de Exendina da presente invenção como descrito acima.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 mostra o espectro de massa de PB-105 obtido no exemplo 1.

Figura 2 mostra uma estrutura molecular de PEG.

20 Figura 3 mostra o resultado da análise da pureza de PB-110 (PEG5000-PB-105) obtido no exemplo 2 segundo a análise de HPLC.

Figura 4 mostra a estrutura molecular de PEG5000b.

Figura 5 mostra a estrutura molecular de PEG5000c.

Figura 6 mostra (a) a imagem tingida por iodo e (b) imagem tingida por azul de

25 Coomassie brilhante do conjugado de PB-105 peguilado, com faixas respectivas: 1. padrão de peso molecular, 2. PB-106 (PEG20000-PB-105), 3. PB-107 (PEG30000-PB-105), 4. PB-108 (PEG40000-PB-105) e 5. PB-109 (PEG20000*2-PB-105).

Figura 7 mostra o resultado da análise da pureza de PB-106 (PEG20000-PB-105) obtido no exemplo 3 segundo a análise de HPLC.

30 Figura 8 mostra a estrutura molecular de PEG20000b.

Figura 9 mostra a estrutura molecular de PEG20000c.

Figura 10 mostra a estrutura molecular de PEG20000d.

Figura 11 mostra a estrutura molecular de PEG20000e.

Figura 12 mostra o resultado da análise da pureza de PB-112 (PEG20000-PB-111)

35 obtido no exemplo 3 segundo a análise de HPLC.

Figura 13 mostra o resultado da análise da pureza de PB-107 (PEG30000-PB-105) obtido no exemplo 4 segundo a análise de HPLC.

Figura 14 mostra o resultado da análise da pureza de PB-108 (PEG40000-PB-105) obtido no exemplo 5 segundo a análise de HPLC.

Figura 15 mostra o resultado da análise da pureza de PB-114 (PEG40000-PB-113) obtido no exemplo 5 segundo a análise de HPLC.

5 Figura 16 mostra a estrutura molecular de PEG20000x2.

Figura 17 mostra o resultado da análise da pureza de PB-109 (PEG20000*2- PB-105) obtido no exemplo 6 segundo a análise de HPLC.

Figura 18 mostra a estrutura molecular de PEG20000x2b.

Figura 19 mostra a estrutura molecular de PEG20000x2c.

10 Figura 20 mostra a estrutura molecular de PEG20000x2d.

Figura 21 mostra o resultado da análise da pureza de PB-119 (PEG23000-PB-105) obtido no exemplo 7 segundo a análise de HPLC.

Figura 22 mostra o resultado da análise da pureza de PB-120 (PEG27000-PB-105) obtido no exemplo 8 segundo a análise de HPLC.

15 A figura 23A mostra o resultado da análise de HPLC de PB-106 (PEG20000-PB-105) armazenado em pH 4,5; -20°C por 60 dias.

A figura 23B mostra o resultado da análise de HPLC de PB-106 (PEG20000-PB-105) armazenado em pH 7,0; 4°C por 60 dias.

20 A figura 23C mostra o resultado da análise de HPLC de PB-106 (PEG20000-PB-105) armazenado em pH 7,0; -20°C por 60 dias.

Figura 24 mostra a relação resposta de dose dos efeitos de PB-101 e PB-105 na cAMP intracelular das células PC12.

Figura 25 mostra o efeito de PB-105 e do conjugado peguilado deste na atividade de cAMP intracelular *in vitro*.

25 Figura 26A mostra a relação entre o MW do PEG no conjugado peguilado e a atividade farmacológica *in vitro* (registro EC_{50}).

A figura 26B mostra a relação entre o MW do PEG no conjugado peguilado e na atividade farmacológica máxima (E_{max}).

30 Figura 27 mostra o efeito de PB-105 e o conjugado peguilado deste na atividade de cAMP *in vitro*.

Figura 28 mostra a relação tempo-resposta do efeito de diminuição de PB-101 e PB-105.

Figura 29 mostra a relação dose-resposta do efeito da redução de glicose sanguínea de PB-101 e PB-105.

35 Figura 30 mostra a relação dose-resposta do efeito da redução de glicose sanguínea de PB-101 e sua variante PB-102.

Figura 31 mostra a relação tempo-resposta do efeito da redução de glicose

sanguínea de PB-105 e do conjugado peguilado deste.

A figura 32A mostra a relação entre o peso molecular de PEG na variante de Exendina peguilada e a meia-vida biológica ($T_{1/2}$).

5 A figura 32B mostra a relação entre o peso molecular de PEG na variante de Exendina peguilada e o efeito de redução de glicose máxima (% de pré-dose da concentração da glicose sanguínea).

A figura 32C mostra a relação entre o MW do PEG na variante de Exendina peguilada e a curva acima da área (AAC) da curva de redução da glicose.

10 Figura 33 mostra a relação tempo-resposta do efeito de redução da glicose sanguínea de PB-105 e de seu conjugado PB-107 peguilado (PEG30000).

Figura 34 mostra a relação dose-resposta do efeito de redução da glicose sanguínea de PB-105 e seu conjugado PB-106 peguilado (PEG20000).

15 Figura 35 mostra a relação tempo-resposta do efeito de redução da glicose sanguínea do PB-105, PB-111 e conjugados peguilados destes. Os dados experimentais são mostrados como meios \pm SEM.

Figura 36 mostra a relação tempo-resposta do efeito equivalente da redução da glicose sanguínea de PB-101, sua variante PB-105, de PB-111 e PB-113 assim como o conjugado peguilado PB-106, PB-112 e PB-114. Os dados experimentais são mostrados como meios \pm SEM.

20 A figura 37 mostra a relação tempo-resposta do efeito equivalente de redução da glicose sanguínea de PB-105 e seu conjugado peguilado. Os dados experimentais são mostrados como meios \pm SEM. * representa a diferença significativa comparada com o grupo PB-105 ($p < 0,05$).

25 Figura 38 mostra os efeitos de PB-101, PB-105, PB-106 e PB-120 na latência de vomito respectivo (A) e tempos de vomito (B) do pombo. Os dados experimentais são mostrados como meios \pm SEM. (a) representa estatisticamente a diferença significativa na dose de 3 mg/kg comparado com o grupo PB-105 ($p < 0,05$); (b) representa estatisticamente a diferença significativa na dose de 6 mg/kg comparada com grupo PB-101 e o grupo PB-105 ($p < 0,05$).

30 Figura 39 mostra os efeitos de PB-101, PB-105, e PB-106 na resposta alérgica na cobaia sistematicamente imunizada. Os dados experimentais são mostrados como meios \pm SEM. (a) representa estatisticamente a diferença significativa comparada com o grupo salino ($p < 0,05$); (b) representa estatisticamente a diferença significativa comparado com o grupo PB-101 ou o grupo PB-105 ($p < 0,05$).

35 Figura 40 mostra os efeitos no aumento de peso corporal na cobaia (A) 0-18 dias e (b) 0-4 dias após a dosagem de PB-101, PB-105 e PB-106. Os dados experimentais são mostrados como meios \pm SEM. (a) representa estatisticamente a diferença significativa

comparada com o grupo salino ($p < 0,05$); (b) representa estatisticamente a diferença significativa comparada com a Exenatida ou o grupo PB-105 ($p < 0,05$).

Figura 41 mostra efeitos no (a) peso corporal e na (c) ingestão de alimentos no rato após a dosagem de PB-105, PB-106, PB-119 e PB-120. Área B e de D mostram a área
5 abaixo da curva para a curva de tempo do peso corporal e a curva de tempo da ingestão de alimento de grupos respectivos após a dose. Os dados experimentais são mostrados como meios \pm SEM. (a) representa estatisticamente a diferença significativa comparada com o grupo salino ($p < 0,05$); (b) representa estatisticamente a diferença significativa comparada com o grupo PB-105 ($p < 0,05$).

10 Figura 42 mostra a curva de tempo da concentração da injeção bolus de Exenatida e PB-105.

A figura 43 mostra a curva de tempo da concentração da injeção da bolus de PB-105 e seu conjugado de Exendina peguilado.

15 Figura 44A mostra a relação entre o MW de PEG no conjugado da variante de Exendina peguilada e a meia-vida plasmática.

Figura 44B mostra a relação entre o MW do PEG no conjugado da variante de Exendina peguilada e a área abaixo da curva (AUC) da curva de concentração-tempo.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES PREFERIDAS

Definição

20 Como usado aqui, o termo "aminoácido" inclui um aminoácido natural, aminoácido não natural, e análogo de aminoácido, assim como todos os D- e L-estereoisômeros destes. Aminoácidos não-naturais incluem, mas não são limitados a, ácido carboxílico de azetidina, 2-ácido aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, β -alanina, alanina, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-
25 aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminoheptanedioico, tert-butil glicina, ácido 2,4-aminoisobutírico, ácido 2,2'-diaminoheptanedioico, ácido 2,3-diaminopropionico, N-etil glicina, N-etil asparagina, homoprolina, hidroxilisina, allo-hidroxi-lisina, 3-hidroxirolina, 4-hidroxirolina, isodesmosina, allo-
isoleucina, N-metil alanina, N-metil glicina, N-metil isoleucina, N-metil-amil glicina, N-metil
30 valina, alanina naftaleno, norvalina, norleucina, ornitina, glicina amil, ácido 2-piperidina e tioprolina. Análogo de aminoácido inclui aminoácido natural e aminoácido não-natural onde o grupo carboxi no C-terminal, grupo amino no N-terminal ou grupo de cadeia lateral é quimicamente reversivelmente ou irreversivelmente bloqueado, ou quimicamente modificada para outro grupo funcional, tais como sulfóxido de metionina, sulfona de metionina, S-
35 (carboximetil)-cisteína, S-(carboximetil)- sulfóxido de cisteína e S-(carboximetil)- sulfóxido de cisteína.

Como usado aqui, o termo "polipeptídeo" ou "proteína" significam permutavelmente

que uma sequência de pelo menos dois resíduos de aminoácido se liga através de ligação covalente (tal como a ligação de peptídeo), que pode ser um polipeptídeo recombinante, polipeptídeo natural ou polipeptídeo sintético.

5 Como usado aqui, o termo "substituição de cisteína" significa a substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos em um polipeptídeo natural (tal como Exendina-4) pelo resíduo da cisteína através da engenharia genética ou síntese artificialmente química.

10 Como usado aqui, o termo "variação de polipeptídeo", a "variação" ou o "análogo" significam um polipeptídeo em que a sequência de aminoácido é diferente devido a uma ou mais substituições, deleções, inserções, fusões, truncamentos ou qualquer combinação destes. A variação do polipeptídeo pode ser inteiramente funcional ou faltando uma ou mais atividades funcionais. A variação inteiramente funcional pode conter a mudança tal como a mudança meramente conservada no resíduo não-essencial ou na região não-essencial. A variação funcional pode compreender a substituição do aminoácido similar, resultando em nenhuma mudança ou na mudança insignificamente funcional. O aminoácido importante para funções pode ser identificado por métodos conhecidos no estado da técnica, tal como o sítio de mutagenese específico ou a mutagenese de exploração da glicina (Cunningham, B. and Wells, J., *Science*, 244 : 1081-1085, 1989). A posição principal para a atividade dos polipeptídeos pode ser determinada, por exemplo, pela análise estrutural tal como a cristalização, NMR ou marcação por fotoafinidade (Smith, L. et al., *J.Mol.Biol.*, 224 : 899-15 904, 1992; de Vos, A. et al., *Science*, 255 : 306-312, 1992). O termo "variação do tiolato" significa as variações do polipeptídeo em que um tiolato está presente na sequência do aminoácido pela substituição, inserção, fusão ou por qualquer combinação destes.

25 Como usado aqui, o termo "conjugado" significa um produto formado pela ligação covalente ou não-covalente de um polipeptídeo ou uma variação do polipeptídeo e o grupo da modificação da presente invenção. O grupo de modificação inclui mas não está limitado aos exemplos acima.

30 Como usado aqui, o termo "um polipeptídeo modificado" ou "uma variação modificada do polipeptídeo" significam um polipeptídeo ou uma variação do polipeptídeo onde um ou mais aminoácidos são quimicamente modificados, onde a modificação é uma modificação covalente ou não-covalente de vários grupos, incluindo, mas não limitados a fosforilação, glicosilação, metilação, peguilação, biotinilação, SUMOilação, acetilação, e o mesmo.

35 Como usado aqui, o termo "alquil" significa o alquil de cadeia simples ou ramificado substituído ou não-substituído, tal como o alquil C1-C30, o alquil C1-C20, o alquil C2-C15 ou o alquil C3-C10, onde é opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados independentemente do grupo consistindo de grupo halogênio, amino, nitro e o mesmo.

Como usado aqui, o termo "cicloalquil" significa o cicloalquil C3-C8 substituído ou não-substituído, onde é opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados independentemente do grupo consistindo de alquil C1-C10, o alquenil C2-C10, o alquinil C2-C10, halogênio, amino, e grupo nitro.

5 Como usado aqui, o termo "conjugado" significa um produto formado pela ligação covalente ou não-covalente de um polipeptídeo ou uma variação do polipeptídeo e o grupo da modificação da presente invenção. O grupo de modificação inclui, mas não é limitado aos exemplos acima.

10 Como usado aqui, o termo "alquenil" significa alquenil de cadeia simples ou ramificada substituída ou não-substituída tendo uma ou mais ligação duplas do carbono-carbono, onde 2-20, 3-15, 4-10 átomos de carbono podem estar presentes, e substituído opcionalmente por um ou mais substituintes selecionados independentemente do grupo que consiste de grupo amino, nitro e halogênio.

15 Como usado aqui, o termo "arilo" significa o arilo C6-C10, opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados independente do grupo que consiste de alquil C1-C10, alquenil C2-C10, alquinil C2-C10, grupo halogênio, amino, e nitro.

20 Como usado aqui, o termo "ligante" significa um grupo orgânico, que ligam PEG a Exendina. Na presente invenção, o ligante pode ser alquil, éter, amido, éster, tiolato e afins, e o ligante pode compreender, por exemplo, até 30 átomos de carbono, por exemplo 1-25, 2-20, 3-15 ou 3 a 10 átomos de carbono.

Geralmente, como usado aqui, o termo "polietilenoglicol" tem o significado que é compreendido geralmente por um técnico no assunto, incluindo o polietilenoglicol *per se* e os seus derivados com uma modificação terminal, a menos que especificado de outra maneira.

25 Além disso, para o polímero tal como o polietilenoglicol, existe uma variedade de métodos para determinar o peso molecular. O peso molecular médio (em particular peso molecular da média do número ou peso molecular de média do peso) é usado geralmente para representar o peso molecular de um polímero, uma vez que um polímero é formado por moléculas com graus de polimerização diferentes em uma escala de distribuição. O peso
30 molecular da média do número ou peso molecular de média do peso tende a ser igual para polímeros com uma escala estreita de distribuição, embora possam ser diferentes até certo ponto quando o grau de polimerização nos polímeros difere na maior parte. Para polímeros tais como o de polietilenoglicol mencionado aqui, o peso molecular pode ser peso molecular da média do número ou peso molecular de média do peso quando mencionado.

35 Variantes de Exendina

Em um aspecto, a presente invenção se relaciona a uma variação de Exendina com atividade do agonista do receptor GLP-1, onde um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou

mais) resíduos do aminoácido são substituídos pela cisteína comparado com a sequência de Exendina tipo selvagem. A substituição da cisteína é cada uma situada independentemente no N-terminal, C-terminal e/ou na parte interna da sequência da variante de Exendina. Em algumas modalidades, a variante de Exendina tem a substituição da cisteína em pelo menos 1, 2, 3, ou 4 resíduos do aminoácido do C-terminal desta. Preferencialmente, a variação de Exendina tem uma substituição de cisteína no último aminoácido do C-terminal. Em algumas outras modalidades, preferencialmente, a variação de Exendina tem uma substituição de cisteína em 1, 2, 3, 4, ou mais resíduos do aminoácido do C-terminal, N-terminal e/ou na parte interna da variante de Exendina.

10 A sequência de Exendina do tipo selvagem ou sequência similar descrita na presente invenção pode ser qualquer sequência conhecida no estado da técnica, incluindo várias variantes ou analogos ou sequências do agonista desta. Com relação aos ensinamentos de Exendina, veja, por favor, por exemplo, Eng J. et al., J. Biol. Chem., 265: 20259-62, 1990; Eng J. et al., J. Biol. Chem., 267: 7402-05, 1992; WO00/66629 and
15 WO00/41546, cada qual é incorporado aqui completamente por referência. A variante de Exendina pode também opcionalmente ter uma ou mais (como 1, 2, 3, 4, 5, ou mais) modificações adicionais do aminoácido, incluindo, por exemplo, substituição, deleção, inserção e/ou adição de amino ácidos. Similarmente, a modificação adicional do aminoácido pode independentemente ser alocada no N-terminal, C-terminal e/ou dentro da parte interna
20 da sequência de Exendina. O aminoácido substituído, introduzido e/ou adicionado pode ser qualquer aminoácido natural, aminoácido não-natural ou analogo do aminoácido, ou D- ou L- estereoisomero. Em algumas modalidades, a modificação adicional do aminoácido é substituição conservada do aminoácido, por exemplo, substituição entre Ala/Gly, Ser/Thr, Glu/Asp, Gln/Asn, Ala/Val/Ile/Leu, Arg/Lys, Phe/Tyr, etc. Para a substituição conservada do
25 aminoácido, os vários ensinamentos estão presentes no estado da técnica, por exemplo, considerar a patente WO/2006/083301, que é incorporado aqui completamente por referência.

Na presente invenção, a Exendina de tipo selvagem pode ser a Exendina-3 ou Exendina-4. Assim, em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a tais
30 variants de Exendina, onde um ou mais (such as 1, 2, 3, 4, 5, or more) resíduos de aminoácidos são substituídos pela cisteína, comparado com

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 (SEQ ID NO: 1; Exendina-4) ou

35 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 (SEQ ID NO: 2; Exendina-3) ou sequência similar. Preferencialmente, a variante de

Exendina tem uma substituição de cisteína pelo menos em uma ou mais posições selecionadas do grupo consistindo de posições correspondendo a Arg (arginina) na posição 20, Trp (triptofano) na posição 25, Ala (alanina) na posição 35 e Ser (serina) na posição 39 da SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2.

5 Na modalidade preferida, a variante de Exendina tem uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo consistindo de:

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-Cys (SEQ ID NO: 3);

10 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-Cys-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 4);

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-Cys-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5);

15 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Cys-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 6);

20 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-Cys-Tyr (SEQ ID NO : 7); ou

His-dAla-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-Cys (SEQ ID NO: 8).

25 Como descrito acima, a variante de Exendina da presente invenção também pode ter opcionalmente uma ou mais (como 1, 2, 3, 4, 5, ou mais) modificações de aminoácidos adicionais, incluindo, por exemplo, substituição, deleção, inserção e/ou adição de aminoácido. A nova modificação do aminoácido pode ser independentemente localizada no N-terminal, C-terminal e/ou dentro da parte interna da sequência Exendina. O aminoácido substituído, inserido e/ou acrescentado pode ser qualquer aminoácido natural, aminoácido não-natural ou análogo do aminoácido, ou D- ou L-estereoisômero. Em algumas modalidades, a modificação adicional do aminoácido é a substituição conservada do aminoácido, por exemplo, substituição entre Ala/Gly, Ser/Thr, Glu/Asp, Gln/Asn, Ala/Val/Ile/Leu, Arg/Lys, Phe/Tyr, etc.

35 A variante de Exendina pode ser obtida por vários métodos conhecidos no estado da técnica, incluindo métodos de preparação da recombinação, a síntese química, etc.

Em uma modalidade, a variante de Exendina é sintetizada pela química da síntese

do peptídeo de fase sólida, e purificada então em escala de laboratório, como pela única etapa de purificação de fase reversa na coluna HPLC ou em outros métodos apropriados de cromatografia.

Em outra modalidade, a variante de Exendina é produzida pelo método de recombinação, incluindo, por exemplo, a expressão em células procarióticas ou eucarióticas apropriadas, e a variante de Exendina de acordo com a presente invenção é então isolada por técnicas rotineiras. Por exemplo, na codificação da sequência do ácido nucleico o peptídeo é sintetizado em primeiro lugar pelo método da síntese química, e a sequência é clonada em um vetor da expressão apropriado para a expressão sob o controle do promotor apropriado. Alternativamente, a sequência do ácido nucleico que codifica a variante de Exendina pode ser obtida da Exendina do tipo selvagem pela mutagenese tal como a mutagenese do PCR, e a sequência é clonada então em um vetor apropriado da expressão para a expressão sob o controle do promotor apropriado. Estas técnicas estão dentro do escopo das habilidades de um técnico no assunto, e muitos ensinamentos estão presentes no estado da técnica.

As células do hospedeiro eucariótico apropriadas incluem células do mamífero, por exemplo, CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep e HepG2. As células são crescidas preferencialmente na condição que é apropriada para a expressão da variante de Exendina de acordo com a presente invenção. Em relação aos reagentes e às condições para produzir ou isolar a variante de Exendina de acordo com a presente invenção, não há nenhuma limitação particular, e qualquer sistema conhecido ou comercialmente disponível pode ser empregado. Na a modalidade preferida, a variante de Exendina é obtida pelo método que foi descrito no estado da técnica.

Muitos vetores de expressão podem ser usados para preparar a Exendin e/ou a variante desta, que podem ser selecionados do grupo que consiste em vetores eucarióticos e procarióticos da expressão. Os vetores procarióticos da expressão podem incluir, por exemplo, plasmídeo tais como o pRSET, pET e pBAD, etc., em que os promotores úteis incluem, por exemplo, lac, trc, trp, o recA ou araBAD etc. Os vetores eucarióticos da expressão incluem (i) os vetores usados para a expressão nos fermentos, tais como o pAO, pPIC, pYES, pMET, em que os promotores tais como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc. podem ser usados; (ii) vetores usados para a expressão em células do inseto tais como o pMT, pAc [delta], p1B, pMIB, pBAC, etc., em que os promotores tais como o PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, o gp64, polh, etc. podem ser usados; e (iii) os vetores usados para a expressão em células do mamífero tais como o pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., e os vetores derivados de sistemas virais, tais como o vírus da vaccinia, vírus adeno-associado, vírus de herpes, retrovíroses, etc., em que os promotores tais como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV e β -actina podem ser usados. Em uma modalidade preferida, a variante de

Exendina é expressa no sistema de células procarióticas ou eucarióticas, e as sequências da codificação após a otimização do codon são usadas. Em uma modalidade preferida, a sequência para expressar a variação de Exendina compreende um peptídeo principal e/ou peptídeo de sinal, de forma a facilitar a secreção da variação de Exendina das células para extracelular seguido pelo isolamento e pela purificação. Em outra modalidade preferida, a sequência para expressar a variante de Exendina não compreende nenhum peptídeo principal e/ou peptídeo de sinal. A variante de Exendina não é segregada à região extracelular, e é isolada e purificada pela lise da célula.

Conjugados da variante de Exendina

A variante de Exendina pode ser conjugada com uma ou mais frações do polímero, dando forma a um conjugado da variante de Exendina. Como usado aqui, o "polímero" é preferencialmente fisiologicamente aceitável, incluindo polímeros que são solúveis na solução aquosa ou na suspensão e não tem nenhum efeito negativo tal como o efeito secundário em mamíferos após ter aplicado o conjugado do polímero Exendina em uma quantidade farmacêutica eficaz. Os polímeros que podem ser usados na presente invenção não têm nenhuma limitação particular. Preferencialmente, os polímeros têm sempre 2 à aproximadamente 3000 unidade repetida. As frações do polímero não podem ser selecionadas dos polímeros naturais ou sintéticos, por exemplo, incluindo, mas não limitadas a, por exemplo, os polissacarídeos, polialquilenoglicol, por exemplo, polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol (PPG), óxido do polietileno (PEO), copolímero de de etilenoglicol e de propilenoglicol, álcool de polivinil, ou qualquer combinação destes. Em uma modalidade preferida, uma ou mais frações do PEG são usadas para a modificação pela conjugação no conjugado da variante da Exendina da presente invenção.

Na presente invenção, o polímero não é limitado à estrutura particular, e pode ser linear (como o PEG alquoxi ou o PEG bifuncional), ramificado ou multi-ramificado (PEG bifurcado ou PEG ligado ao núcleo dos poliois), dendritico ou ter a ligação degradável. Além disso, a estrutura interna do polímero pode ser organizada em qualquer número de padrões diferentes, em que pode ser selecionado do grupo que consiste em homopolímeros, copolímeros alternados, copolímeros aleatórios, copolímeros em bloco, terpolímeros alternados, terpolimeros aleatórios e em trimero em bloco. O polímero pode ainda incluir polímeros poli (óxido de alquilenos), ácido polimaleico, e poli (D, L-alanina).

Em algumas modalidades, o polímero é de polietilenoglicol (PEG) ou derivados deste, como o metoxi polietilenoglicol (MPEG). Como usado aqui, a menos que especificado de outra maneira, o polietilenoglicol (PEG) inclui aqueles com um grupo terminal hidroxil e aqueles com o outro grupo terminal. Dito outro grupo terminal inclui, mas não é limitado a alquoxi, cicloalquoxi, cicloalquiloxi, alquenil, ariloxi ou arilalquiloxi. Tais moléculas PEG são todas conhecidas no estado da técnica, e de uso geral na modificação de polipeptídeos. O

PEG de cadeia lateral pode ser linear, ramificado, bifurcado ou multi-ramificado. O de polietilenoglicol diferente pode ter o comprimento diferente da cadeia e da estrutura polimerizadas do polímero.

O peso molecular do PEG usado na presente invenção não é particular, podendo estar na escala de 0,1 a 200 kDa, tal como 1 a 150 kDa, 2 a 100 kDa, 3 a 80 kDa ou 4 a 50 kDa, pode também ser de 5 a 40kDa. Um PEG particularmente útil tem o peso molecular na escala de 5 a 30 kDa. Algumas outras moléculas úteis do PEG compreendem aqueles divulgados, por exemplo, nas patentes WO 03/040211, US 6,566,506; US 6,864,350 e US 6,455,639. Particularmente, o PEG tem uma fórmula geral $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{O-}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$, em que n é cerca de 5 a 4000. Como descrito acima, o PEG usado na presente invenção inclui o PEG com outros grupos terminais, tais como o PEG metoxi, PEG ramificado, e PEG bifurcado. O PEG ramificado apropriado pode ser preparado como descrito na patente US 5,932,462, que é incorporado aqui por referência na totalidade. O PEG ramificado representa o PEG que é ramificado no sítio perto do terminal da cadeia do polímero, e a cadeia principal do PEG ramificado pode ser linear ou ramificada. Como conhecido por um técnico no assunto, na molécula ativa biológica conjugada com partes do polímero, a atividade biológica da molécula conjugada diminui com o aumento do peso molecular das frações do polímero (Bailon et al. Rational design of potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C. Bioconjugate Chem 2001 ; 12:195-202; Bowen et al. Relationship between molecular weight and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mutein. Experimental Hematology 1999; 27:425-32; Bailon et al. PEG-modified biopharmaceuticals. Expert Opin Deliv. 2009; 6:1-16). Como também conhecido por um técnico no assunto, a meia-vida biológica e/ou a meia-vida plasmática aumenta com o aumento do peso molecular das frações do polímero.

Entretanto, é surpreendentemente encontrado aqui, na presente invenção, o conjugado da variante da Exendina da presente invenção conserva ainda a maior parte da atividade agonista do receptor GLP-1 (tais como atividade *in vivo*) comparado com a variante de Exendina não conjugada, mesmo se o peso molecular de frações do polímero (tais como PEG) aumentar até 30 kDa. Mesmo se o peso molecular do PEG aumentar até 40 kDa ou ainda, a variante Exendina conjugada da presente invenção ainda conserva substancialmente a atividade do agonista do receptor GLP-1 (tal como a atividade *in vivo*). Especialmente, quando o peso molecular do PEG aumenta de kDa 5 a kDa 27, a atividade do agonista do receptor GLP-1 do conjugado da variante de Exendina permanece substancialmente o mesmo com aquelas de variantes não-conjugadas de Exendina.

A fim de fornecer o efeito terapêutico estável por um longo período e reduzir a

frequência da dosagem para melhorar a conformidade dos pacientes, é desejável prolongar a meia-vida biológica do conjugado da variante de Exendina o máximo possível enquanto a atividade substantiva do agonista do receptor GLP-1 é retida. Conseqüentemente, em uma modalidade, a presente invenção fornece um conjugado da variante de Exendina com meia-vida biológica prolongada e a atividade substantiva do agonista do receptor GLP-1.

Em uma modalidade específica, o peso molecular de uma ou mais frações do polímero (tais como o PEG) no conjugado da variante de Exendina é de 2 kDa a 50 kDa, preferencialmente 3 kDa a 40 kDa, mais preferencialmente 4 kDa a 35 kDa, mais preferencialmente 5kDa a 30 kDa, tal como 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa e 40 kDa, assim como qualquer valor entre qualquer valor do peso molecular como acima mencionado. Nota-se que o peso molecular das frações do polímero conjugadas a um conjugado da variante de Exendina é calculado como o peso molecular total de todas as frações conjugadas do polímero no conjugado, se o conjugado compreende mais de uma fração do polímero conjugado, a menos que especificado de outra maneira.

Em uma modalidade preferida, o peso molecular de uma ou mais frações do polímero (tais como PEG) no conjugado da variante de Exendina é 20 kDa a 30 kDa, preferencialmente 21 kDa a 29 kDa, mais preferencialmente 23 kDa a 27 kDa, por exemplo 20 kDa, 21 kDa, 22 kDa, 23 kDa, 24 kDa, 25 kDa, 26 kDa, 27 kDa, 28 kDa, 29 kDa, 30 kDa, assim como qualquer valor entre qualquer valor de peso molecular como acima mencionado.

O polímero usado na presente invenção é conhecido no estado da técnica, que pode ser obtida por vários meios, incluindo, por exemplo, meios comerciais, tais como CarboMer, Inc., J.T. Baker, The Dow Chemical Company, etc., preparados alternativamente por métodos conhecidos no estado da técnica, tal como aqueles descritos na patente EP1245608. A presente invenção não é limitada aos polímeros preparados por nenhum método específico.

No conjugado de acordo com a presente invenção, pelo menos um polímero pode ser acoplado com a Exendina através do grupo amino, grupo carboxi, grupo de hidroxil e/ou grupo de tiolato, etc. na Exendina. Tais grupos são situados frequentemente em α -amino, α -carboxi e na cadeia lateral do resíduo do aminoácido tal como a lisina, aspartato, glutamato, cisteína, etc.

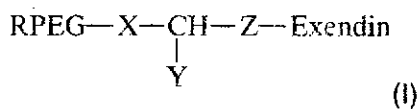
Em algumas modalidades, uma ou mais moléculas do polímero são acopladas com uma variante de Exendina através do tiolato da cisteína na variante da Exendina. A modificação pelo polímero tal como o polietilenoglicol no tiolato do resíduo de cisteína nas proteínas pode aumentar a seletividade da modificação, uma vez que há um número de reagentes que é especificamente reativo com o tiolato e o tiolato útil nas proteínas é muito menor do que amina livre tal como o resíduo de lisina.

Conseqüentemente, em uma modalidade preferida, uma ou mais frações do polímero podem ser conjugadas em um resíduo de cisteína da variante de Exendina, melhor conjugado em um resíduo de cisteína da variante de Exendina pelo tioéter.

5 Preferencialmente, a variante de Exendina tem uma ou mais substituições de cisteína em posições correspondentes a posição 20, posição 25, posição 35 e/ou posição 39 do tipo selvagem de exendina-3 ou exendina-4, e a variante de Exendina é ligada ao polímero tal como o polietilenoglicol através do grupo de tiolato. Mais preferencialmente, a variação de Exendina tem uma substituição de cisteína nas posições que correspondem a posição 35 e/ou posição 39 do tipo selvagem de exendina-3 ou exendina-4. Mais
10 preferencialmente, a variante de Exendina tem uma substituição de cisteína nos posições que correspondem a posição 39 do tipo selvagem de exendina-3 ou exendina-4.

Em uma modalidade específica, a parte do polímero é conjugada com resíduo de cisteína na variante de Exendina de acordo com a presente invenção através da ligação de tioléter. Por exemplo, em relação à molécula do polietilenoglicol com um grupo de ativação
15 da maleimida, uma ligação do tioleter pode ser formada entre o alquenil do maleimida e o tiolato de cisteína, para conjugar uma ou mais frações do polietilenoglicol ao resíduo de cisteína da variante de Exendina de acordo com a presente invenção. Em algumas outras modalidades, a Peguilação de resíduos de cisteína pode ser realizada por, por exemplo, a sulfona de Peg-vinil, Peg-iodoacetamida ou bissulfeto de Peg-piridina. Um número de
20 métodos para conjugar frações do polímero tais como o PEG aos polipeptídeos estão presentes no estado da técnica, e todos estes métodos podem ser usados na presente invenção.

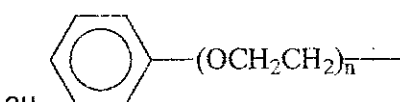
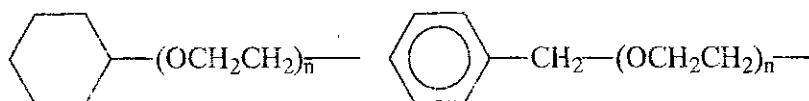
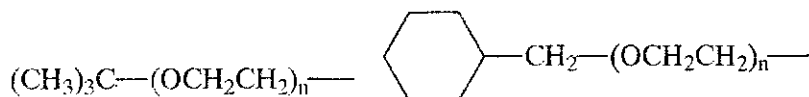
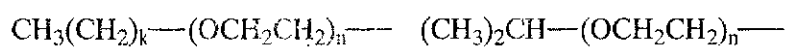
Como usado aqui, "Exendina PEGuilada", "o conjugado da variante-PEG de Exendina" ou "Exendina" compreendem a variante de Exendina conjugada com um ou mais
25 PEGs. Como usado aqui, "Peguilação" ou "modificação de PEG" compreendem a conjugação de uma ou mais frações do PEG com Exendina. Um método apropriado de Peguilação é divulgado, por exemplo, na patente US 5,122,614 e no US 5,539,063, onde todos os métodos divulgados de Peguilação são incorporados aqui por referência na totalidade. Em algumas modalidades, o conjugado tem uma estrutura da fórmula I como
30 abaixo:



onde, a Exendina representa a variante de Exendina de acordo com a presente invenção, Y é H ou RPEG—X— , e cada X e Z independente são ligantes, PEG representam $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, n é uma integrina positiva, R representa o grupo terminal de PEG, cada R é
35 selecionado preferencialmente independente do grupo que consiste de hidrogênio, alquil, cicloalquil, cicloalquilalquil, alquenil, aril ou arilalquil.

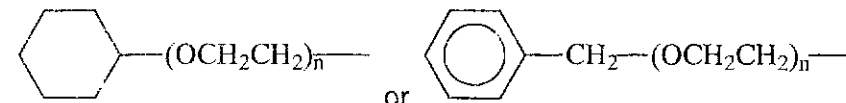
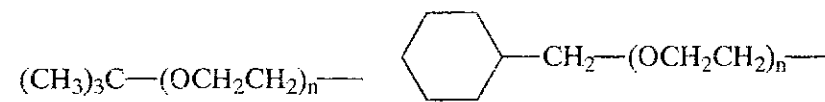
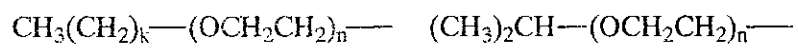
Em algumas modalidades específicas, o alquil pode ser alquil C1-C6, preferencialmente alquil C1-C4, tal como metil, etil, N-propil, isopropil, butil, isobutil e tert-butil; cicloalquil pode ser o cicloalquil C3-C7, tal como o ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil e o cicloheptil; o cicloalquilalquil pode ser alquil do cicloalquil C1-C4, tal como o cicloalquilmetil e o cicloalquiletil, incluindo o ciclohexilmetil e o ciclohexiletil, etc., o aril pode ser fenil, metilfenil e naftil, etc., o arilalquil pode ser fenilmetil, feniletil e naftilmetil, naftiletil, moléculas do PEG etc. com vários grupos terminais são conhecidos no estado da técnica, e estes e outras moléculas do PEG podem ser selecionados como desejados. As moléculas do PEG com grupo terminal exigido podem ser sintetizadas por métodos conhecidos no estado da técnica como necessário.

Em algumas modalidades, cada "RPEG—" na fórmula I como descrito independentemente tem uma estrutura como abaixo:



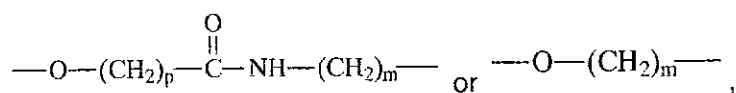
onde, k e n são ambas integras, k = 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6; n = 40, 41, ..., 45, 46, 47, 48,, 1200.

Em algumas outras modalidades preferidas, cada "RPEG—" na fórmula (I) independentemente tem a estrutura como abaixo:



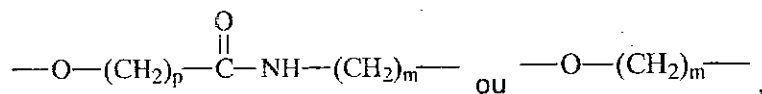
onde, k e n são ambas integras, k = 0, 1, 2 or 3; n = 40, 41, ..., 45, 46, 47, 48,, 1200.

Em algumas modalidades, cada "—X—" na fórmula (I) independentemente tem a estrutura como abaixo:



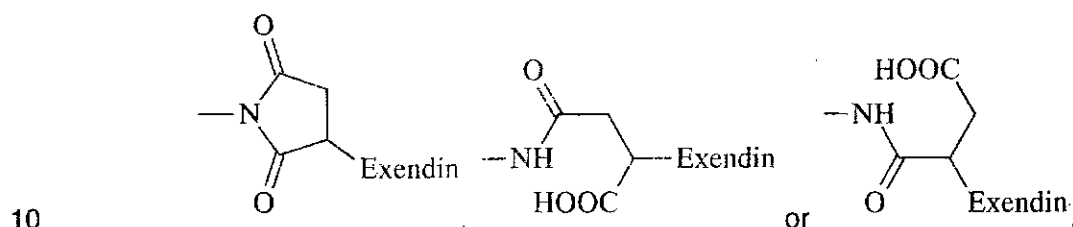
onde, p e m são ambas integritas, p = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12; m = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12.

5 Em algumas modalidades, cada "---X---" na fórmula (I) independentemente tem a estrutura como abaixo:

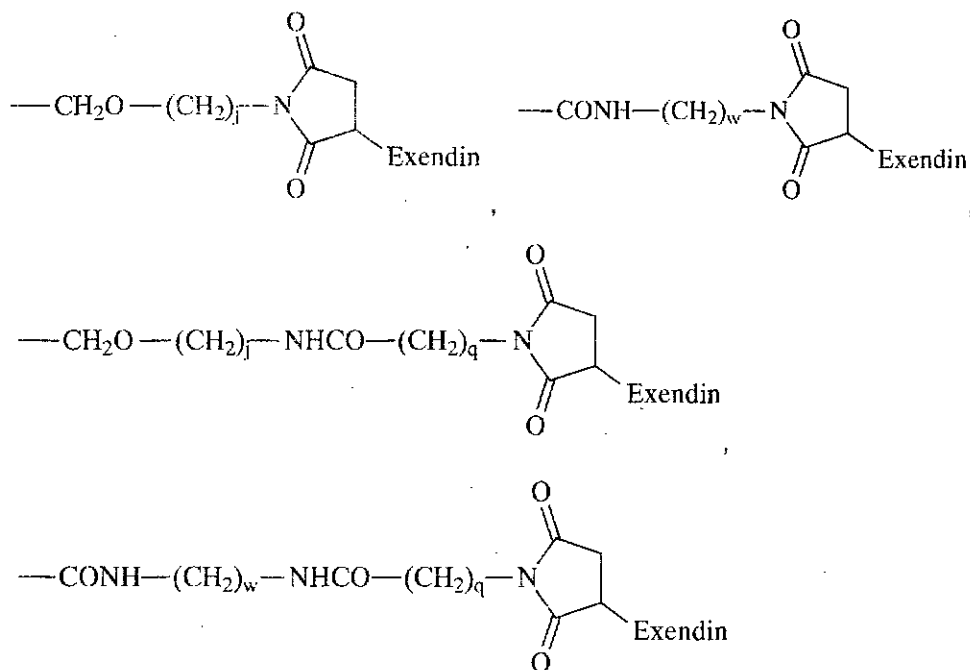


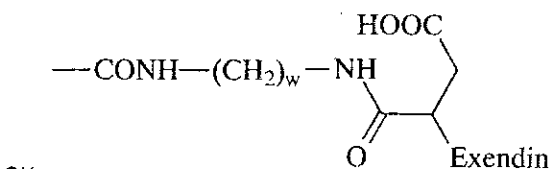
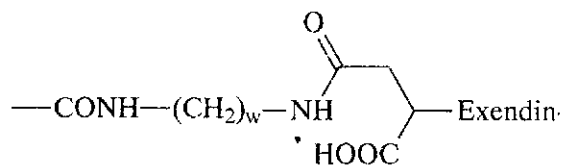
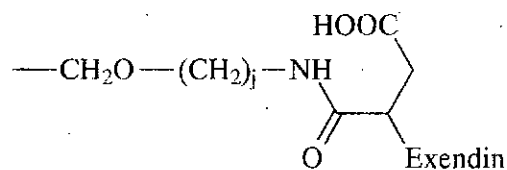
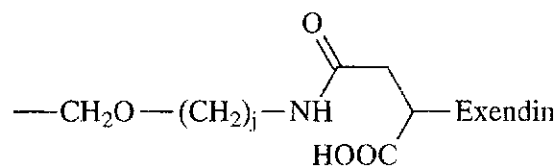
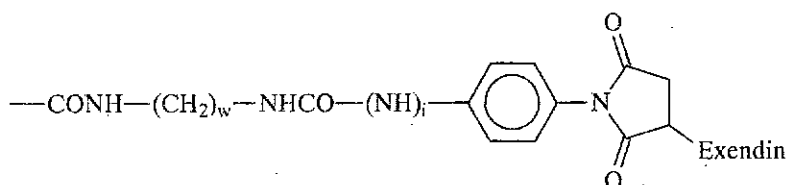
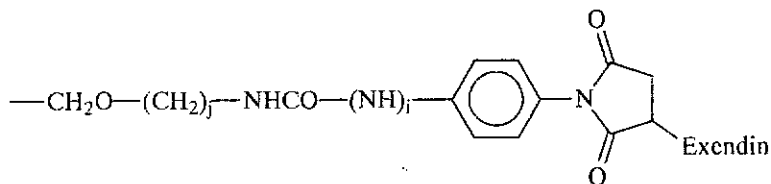
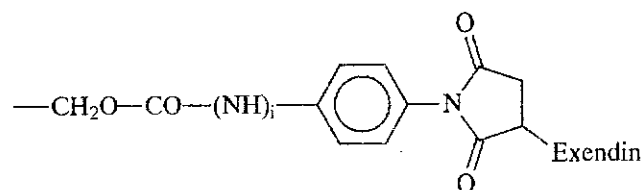
onde, p e m são ambas integritas, p = 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; m = 0, 1, 2, 3 ou 4.

Em algumas outras modalidades, cada "---Z---Exendin" na fórmula (I) independentemente possui a estrutura como abaixo:



Preferencialmente, "---Z---Exendin" na fórmula (I) tem a estrutura como abaixo:





ou

onde, i, j, q, w são integritas, $i = 0$ ou 1 ; $j = 1, 2, 3, 4, 5$ or 6 ; $q = 1, 2, 3, 4, 5$ ou 6 ; $w = 1, 2, 3, 4, 5$ ou 6 .

10

Os conjugados da variante de Exendina de acordo com a presente invenção podem ser sintetizados por qualquer método apropriado. Um número de métodos para conjugar o polímero às proteínas ou aos peptídeos são conhecidos no estado da técnica, incluindo polímeros de incubação (polímeros preferencialmente ativados) com a variante de Exendina de acordo com a presente invenção. Em uma modalidade, o polímero é o polietilenoglicol,

que pode ser ativado e conjugado à variante de Exendina, por exemplo, pelo método do brometo ciano, método do carbonildiimidazole, método de N-hidroxisuccinimida, método cianúrico do cloreto de ureia, etc. Alternativamente, o PEG pode ser especificamente conjugado ao tiolato do resíduo de cisteína na variante de Exendina pela sulfona do Peg-
 5 vinil, pelo Peg-iodoacetamida ou pelo bissulfeto de Peg-piridina.

Em algumas modalidades específicas, o PEG ativado pode ser incubado com a variante de Exendina de acordo com a presente invenção sob as condições abaixo: o pH 5,0-7,0, relação do molar do PEG aos peptídeos é 1-10, 0,5-12 horas da reação, período, temperatura da reação é 0-50°C, por exemplo 2-40°C ou 4-37°C.

10 Após a reação da conjugação, o conjugado pode ser isolado por métodos apropriados. Os métodos apropriados incluem, por exemplo, a ultrafiltração, a diálise ou a cromatografia, etc., que estão todos no escopo das habilidades para um técnico no assunto.

Composição farmacêutica

A variante de Exendina e/ou conjugado da variante de Exendina segundo a
 15 presente invenção pode ter muitas utilidades, inclusive reduzir, por exemplo, a glicose sanguínea. Assim, a presente invenção, além disso, fornece uma composição farmacêutica para reduzir a glicose sanguínea, compreendendo a quantidade terapeuticamente eficaz da variante de Exendina e/ou conjugado da variante de Exendina segundo a presente invenção, bem como opcionalmente um portador farmacêuticamente aceitável.

20 Preferencialmente, a composição farmacêutica pode ser útil para tratar o diabetes, mais preferencialmente para tratar a diabetes tipo - 1 e/ou a diabetes tipo - 2, em particular, preferencialmente para tratar a diabetes tipo - 2. A quantidade terapeuticamente eficaz da variante de Exendina e/ou do conjugado da variante de Exendina de acordo com a presente invenção é dependente da rota de administração, do tipo do sujeito e das características
 25 físicas do mamífero específico considerado. Estes fatores e a relação entre estes fatores e a quantidade determinada são conhecidos por um técnico no assunto. A quantidade e a rota de administração podem ser ajustadas para alcançar o efeito ótimo, tendo por resultado a entrega dos peptídeos ao sujeito. Entretanto, depende-se de fatores conhecidos tais como o peso corporal, a dieta, a droga simultaneamente administrada e outros fatores, que são
 30 conhecidos por um técnico no assunto no campo da medicina.

A composição farmacêutica pode ser administrada junto com o tratamento combinado, isto é a composição farmacêutica é aplicado em combinação com uma ou mais
 35 medicações, onde são aplicadas juntas ou alternadas. Em outras modalidades, ditas medicações podem ser administradas antes, durante ou após a administração de uma ou mais variantes de Exendina e/ou o conjugado da variante de Exendina de acordo com a presente invenção ou outra composição farmacêutica. Dita medicação que é utilizada na presente invenção compreende, por exemplo, a medicação para reduzir a glicose

sanguínea, tal como a insulina, os analogos da insulina, os agonistas e o colecistocinina da dextrina, e/ou outros compostos ou composição que é usada para tratar doenças. Preferencialmente, tais doses combinadas podem alcançar um efeito combinado ou mesmo sinergístico.

5 Como usado aqui, "o portador farmacêuticamente aceitável" ou "o portador fisiologicamente aceitável" podem permutavelmente ser usados, incluindo uma ou mais de qualquer e todos sais fisiologicamente compatíveis, solventes, meio distribuidor, revestimento, agentes e agentes antifúngicos e agentes anti-bacterianos, agentes de atraso isotônicos e de absorção, etc. Em algumas modalidades, o portador é apropriado para a
10 dose intravenosa, intramuscular, subcutânea, espinhal ou da epiderme (tal como por injeção ou infusão). Dependendo das rotas de dose, o agente terapêutico pode ser revestido por determinado material, a fim de proteger o agente terapêutico dos ácidos e da outra condição natural que podem inativar o agente terapêutico.

Ao administrar, a formulação farmacêutica de acordo com a presente invenção é
15 administrada na composição farmacêutica em uma quantidade farmacêuticamente aceitável. O termo "farmacêuticamente aceitável" pretende significar as substâncias não-tóxicas que não interferem na atividade biológica de componentes ativos. As formulações contêm sempre os sais, tampões, preservativos, portador compatível e opcionalmente outros agentes terapêuticos, tais como os realçadores complementares da imunidade, incluindo
20 adjuvantes, quimiocinas e citocinas. Quando usado na medicação, o sal deve ser farmacêuticamente aceitável, mas o sal não-farmacêuticamente aceitável pode prontamente ser usado preparando o sal farmacêuticamente aceitável, assim não são excluídos do escopo da presente invenção.

Se requerido, a variante de Exendina ou o conjugado da variante de Exendina de
25 acordo com a presente invenção podem ser combinados com um portador farmacêuticamente aceitável. Como usado aqui, o termo "portador farmacêuticamente aceitável" significa um ou mais preenchedores sólidos ou líquidos compatíveis, diluentes ou substâncias de empacotamento, que são apropriados para se aplicar aos mamíferos tais como o ser humano. O termo "portador" representa componentes orgânicos ou inorgânicos,
30 naturais ou sintéticos, que são combinados com os componentes ativos a fim de facilitar a aplicação. Os componentes da composição farmacêutica podem também ser misturados na forma na qual a interação que interrompe significativamente a eficácia exigida da medicação é ausente.

Preferencialmente, a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção
35 pode compreender o sistema de tampão, e preferencialmente, o sistema de tampão é solução de tampão acetato com um pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0, ou solução de tampão fosfato com um pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0.

Em algumas modalidades específicas, o tampão apropriado compreende o acetato, citrato, borato, fosfato.

Opcionalmente, a composição farmacêutica pode também compreender um preservativo apropriado, tal como o cloreto de benzalcônio; álcool do cloreto tert-butilico; parabenos e timerosal.

A composição farmacêutica pode estar convenientemente sob a forma da unidade de dose, e pode ser preparada por qualquer método conhecido no campo do produto farmacêutico. Todo o método compreende uma etapa de combinar o agente ativo com um portador, e o portador compreende um ou mais componentes auxiliares. Geralmente, o agente ativo e o portador líquido, o portador sólido finamente dividido ou ambos são combinados para preparar a composição, e se requerido, o produto é formado subsequente.

A composição farmacêutica que é apropriada para a administração parenteral pode ser de formulação aquosa asséptica ou não-aquosa compreendendo uma ou mais variantes de Exendina ou conjugado da variante de Exendina. Em algumas modalidades, a formulação é isotônica comparada com o sangue dos sujeitos. Um agente de dispensação ou e o agente de suspensão apropriado podem ser usados preparando a formulação de acordo com métodos conhecidos. A formulação asséptica para a injeção pode também ser solução asséptica ou suspensão para a injeção parenteralmente no diluente aceitável não-tóxico ou solvente, por exemplo, solução 1,3- butanediol. Os portadores e os solventes aceitáveis que são úteis compreendem a água, a solução de Ringer e a solução isotônica do cloreto de sódio. Além disso, o óleo permanente asséptico é usado rotineiramente como o meio solvente ou de suspensão. Como tal, algum óleo permanente suave pode ser usado, compreendendo o monoglicerideo sintético ou diglicerida. Além disso, o ácido graxo tal como o ácido oleico pode ser usado na forma para a injeção. A forma dos portadores apropriados pode ser oral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, etc. sendo encontrada em "Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA".

A variante de Exendina ou o conjugado da variante de Exendina de acordo com a presente invenção podem ser preparados junto com o portador tal como a formulação de liberação controlada que inclui sistemas de entrega por implantes, adesivos transdérmicos e microcapsula, que protege a variante de Exendina ou o conjugado da variante de Exendina da degradação rápida. Polímeros biologicamente degradáveis, biologicamente compatíveis, tais como o acetato do vinil de etileno, poli anidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoesteres e o ácido poli láctico podem ser úteis. Vários métodos para preparar tal formulação são conhecidos no estado da técnica, veja, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, etc.

A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção pode ser administrada por qualquer via convencional, incluindo a injeção ou a infusão sobre o tempo. Por exemplo, a administração pode ser realizada de forma oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, na intracavidade, intra-tumoral, ou transdermal.

5 A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção é administrada em uma quantidade eficaz. "uma quantidade eficaz" é a quantidade de qualquer variante de Exendina ou conjugado da variação de Exendina fornecida aqui, que produzem a resposta desejável (por exemplo, reduzindo o nível de glicose sanguínea no sujeito) separada ou
10 junto com o outro agente terapêutico. Isto pode compreender um atraso meramente temporário no desenvolvimento do diabetes, e alternativamente, em algumas modalidades, isto pode compreender a erradicação permanente do desenvolvimento do diabetes.

Tal quantidade depende certamente da doença específica a ser tratada, da severidade das doenças, dos parâmetros pessoais dos pacientes (que incluem a idade, a
15 condição fisiológica, a altura e o peso), duração do tratamento, propriedades do tratamento simultaneamente em curso (eventualmente), rotas específicas de administração e dos fatores similares dentro do conhecimento para profissionais de cuidados médicos. Estes fatores são conhecidos por um técnico no assunto, e experiências convencionais diretas prontamente informadas. Geralmente, a dose máxima para cada componente ou a
20 combinação desta é usada preferencialmente, isto é, a dose segura mais elevada é determinada de acordo com a razão médica razoável. Entretanto, um técnico no assunto pode compreender que os pacientes podem pedir uma dose mais baixa ou a dose permissível baseada em razões médicas, psicológicas ou substancialmente quaisquer outras razões.

A composição farmacêutica usada nos métodos anteriores é preferencialmente
25 asséptica, e compreende uma quantidade eficaz da variante de Exendina ou conjugado da variante de Exendina em uma unidade de peso ou unidade do volume conveniente para administrar a pacientes, que é separado ou combinado com outra formulação, para produzir a resposta necessária, como redução da glicose sanguínea.

A dose da variante de Exendina ou do conjugado da variante de Exendina
30 administrada a sujeitos pode ser selecionada de acordo com parâmetros diferentes, em particular rota da administração que é usada e a condição do sujeito. Outros fatores compreendem o período necessário de tratamento. Se a resposta no sujeito não for suficiente na dose original aplicada, uma dose mais elevada pode ser aplicada em uma escala permitida pelo grau da tolerância do paciente (ou para conseguir eficazmente a dose
35 mais elevada através de uma rota diferente de entrega que é mais local).

Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende 0,20 mg/ml - 5 mg/ml da variante de Exendina e/ou compreende 4mg/ml - 40 mg/ml do conjugado da

variante de Exendina, preferencialmente 0,20 mg/ml - 5 mg/ml da variante de Exendina e/ou compreende 4mg/ml - 40 mg/ml do conjugado da variante de Exendina, mais preferencialmente 0,5 mg/ml - 2 mg/ml da variante de Exendina e/ou compreende 10mg/ml - 20 mg/ml do conjugado da variante de Exendina. Geralmente, a escala da dose da variante de Exendina ou o conjugado da variante de Exendina de acordo com a presente invenção, podem ser peso corporal de aproximadamente 10 µg/kg de um paciente ao peso corporal de aproximadamente 100,000 µg/kg de um paciente. Em algumas modalidades, a escala da dose pode ser aproximadamente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. Em outras modalidades, a escala da dose pode ser de aproximadamente 0,1 mg/kg a 5 mg/kg, 0,1 mg/kg a 10 mg/kg, ou 0,1 mg/kg a 15 mg/kg. Em outras modalidades, a escala da dose pode ser de aproximadamente 1 mg/kg a 5 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg, 10 mg/kg a 15 mg/kg, ou 15 mg/kg a 20 mg/kg. Em outras modalidades, a escala da dose pode ser de aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 17 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg ou 30 mg/kg. Em outras modalidades, a escala da dose pode ser de aproximadamente 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg or 6 mg/kg. Baseado na composição, a dose pode ser continuamente entregue (por exemplo pelo bombeamento contínuo), ou ser intermitentemente entregue em um ciclo. Em algumas modalidades, a dose da variante de Exendina ou o conjugado da variante de Exendina de acordo com a presente invenção podem ser 0,1 a 20 mg/kg ou qualquer valor destes, quando administrada intravenosamente. O intervalo desejável entre a dose múltipla da composição particular pode ser determinado por um técnico no assunto sem experimentação não realizada. Outros protocolos para dosar as composições fornecidas aqui são conhecidos por um técnico no assunto, em que a dose, programação de dosagem, local da administração, a rota de administração, etc. pode ser diferente daquelas descritas acima. Em uma modalidade, a dose é administrada através da rota intravenosa. Em outra modalidade, o protocolo de administração é dose de bolus intravenosa.

Um kit que compreende a variante de Exendina ou o conjugado da variante de Exendina (por exemplo, a composição farmacêutica) e as instruções estão também no escopo da presente invenção. O kit pode ainda compreender pelo menos outro um reagente, por exemplo, um ou mais medicações para reduzir a glicose sanguínea. Em outra modalidade, o kit pode compreender uma base, que é compartilhado a fim de acomodar firmemente um ou mais meios do recipiente ou uma série de recipiente (como o tubo de teste, o tubo, a garrafa, o frasco, a seringa, etc.). Os componentes do kit podem ser embalados em meio aquoso o que esteja na forma liofilizada.

A composição da maneira prevista aqui pode estar na forma liofilizado ou

fornecida no meio aquoso.

Preferencialmente, o sujeito é vertebrado. Mais preferencialmente, o sujeito é mamífero. Mais preferencialmente, o sujeito é humano. Entretanto, o sujeito pode ser outro animal, tal como o animal doméstico (por exemplo, cão, gato, etc.), o animal de criação (por exemplo, gado, cabra, porco, cavalo, etc.) ou o animal experimental (por exemplo, macaco, rato, rato, coelho, cobaia, etc.).

A variante de Exendina e/ou o conjugado da variante de Exendina segundo a presente invenção podem ser aplicadas separadamente. Contudo, é preferencialmente aplicado como uma composição farmacêutica, que sempre compreende um excipiente farmacêutico apropriado, o diluente ou transportador selecionado dependendo da via de administração desejada. Eles podem ser aplicados a pacientes/sujeitos na necessidade de tratamento por qualquer meio conveniente. A dose exata dependerá de vários fatores, inclusive as propriedades exatas da variante de Exendina e o conjugado da variante de Exendina.

Algumas rotas apropriadas de administração compreendem (mas não limitadas) a administração oral, retal, nasal, local (compreendendo oral e sublingual), subcutânea, vaginal ou pareneral (compreendendo subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal e epidural).

Em algumas modalidades, a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção compreende um agente e/ou um preservativo isotônico, preferencialmente o agente isotônico é um ou mais da sacarina, manitol, cloreto de sódio e glicerol, e o preservativo é selecionado do grupo que consiste de m-cresol, álcool benzílico, p-hidroxibenzoatoparabenos metílico, p-hidroxibenzoato de etila, p-hidroxibenzoato propílico e p-hidroxibenzoato butílico. Um técnico no assunto pode preparar a solução apropriada da variante de Exendina ou do conjugado da variante de Exendina de acordo com a presente invenção, empregando, por exemplo, excipiente isotônico como a solução fisiológica salina, de Ringer ou a solução de Ringer do lactato, etc. como necessário, um agente de estabilização, um agente de proteção, antioxidante e/ou o outro aditivo pode ser adicionado. A composição farmacêutica para a administração oral pode estar sob a forma de tabletes, cápsula, pó ou líquido oral, etc. Os tabletes podem compreender o portador sólido, tal como a gelatina ou um adjuvante. A composição farmacêutica líquida compreende sempre o portador líquido, tal como a água, petróleo, óleo animal ou óleo do óleo vegetal, óleo mineral ou sintético. Pode também compreender soluções salinas fisiológicas, solução de glicose ou o outro carboidrato, ou os dióis, tais como o etilenoglicol, o propilenoglicol ou o de polietilenoglicol. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica está sob a forma da formulação líquida e/ou da formulação liofilizada. Preferencialmente, a formulação liofilizada compreende o protetor de liofilização. Mais preferencialmente, o protetor de liofilização é

selecionado do grupo que consiste da sacarina, lactose, manitol, trealose, e de outros carboidratos.

5 A variante de Exendina e/ou o conjugado da variante de Exendina são administrados preferencialmente aos sujeitos "em uma quantidade terapeuticamente eficaz" ou "em uma quantidade eficaz". A composição é administrada preferencialmente aos sujeitos "em uma quantidade terapeuticamente eficaz", e a quantidade terapeuticamente eficaz ou uma quantidade eficaz são suficientes para exibir lucros aos sujeitos. A quantidade real da administração, e a taxa e o processo de administração dependerão da própria condição e severidade dos sujeitos a serem tratados. A prescrição para o tratamento (tal como a determinação de dose, etc.) é determinada pelos profissionais médicos, em virtude das doenças a serem tratadas, da condição pessoal dos pacientes, do local de entrega, do método de administração, e de outros fatores conhecidos por médicos.

10 Em algumas modalidades, a escala de dose para a variante de Exendina e/ou conjugado da variante de Exendina podem ser 30 mg/kg de peso corporal/dia a 0,00001 mg/kg de peso corporal/dia, ou 3 mg/kg/dia a 0,0001 mg/kg/dia, ou 0,3 mg/kg /dia a 0,01 mg/kg/dia.

15 A presente invenção ainda adicional fornece um método para tratar a doença, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante de Exendina e/ou do conjugado da variante de Exendina aos sujeitos em necessidade de tratamento. Em algumas modalidades, as doenças são selecionadas consistindo do grupo: síndrome de dumping pós-prandial, hiperglicemia pós-prandial, tolerância prejudicada da glicose, obesidade, doenças de alimentação, síndrome da resistência de insulina, diabetes e hiperglicemia. Em uma modalidade preferida, a doença é diabetes tipo - 2.

20 Como conhecido, a Exendina pode reduzir o peso corporal de pacientes com obesidade e induzir a náusea e vômito, onde o mecanismo é associado com a inibição do centro de alimentação do sistema nervoso central e ativação do centro de vômito (Larsen. Mechanisms behind GLP-1 induced weight loss. Br J Diabetes Vasc Dis 2008; 8: S34-S41; Schick et al. Glucagonlike peptide 1 (7-36)-amide acts at lateral and medial hypothalamic sites to suppress feeding in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284: R1427-35). Os conjugados de Exendina ou as variantes desta não podem ultrapassar a barreira sangue-cérebro devido ao peso molecular aumentado, e reduzem assim o vômito induzido pela Exendina. Consequentemente, o depositante esperou que os conjugados de Exendina ou variantes desta também reduziram os efeitos da Exendina na redução da alimentação e na redução de peso corporal intermediado pelo sistema nervoso central, antes do início da presente invenção. Entretanto, o depositante encontrou surpreendentemente que os conjugados de Exendina ou variantes destas aumentaram significativamente os efeitos Exendina na redução da alimentação e na redução de peso

corporal, embora a Exendina tipo selvagem e as variantes não-conjugadas ambas de Exendina reduziram a alimentação e o peso corporal. Assim, em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para reduzir o peso corporal usando os conjugados de Exendina ou as variantes desta e/ou composição farmacêutica que compreende os

5 mesmos.

Além disso, a presente invenção também fornece a utilização dos conjugados de Exendina ou as variantes desta e/ou composição farmacêutica que compreende os mesmos para produzir um medicamento reduzindo o peso corporal. Em uma modalidade, os conjugados de Exendina ou as variantes desta são o conjugado da variante de Exendina de

10 acordo com a presente invenção, como descrito acima.

A presente invenção será ilustrada pelos exemplos como abaixo, mas não deve ser interpretada como limitante de maneira nenhuma. Todas as referências mencionadas na presente pedido de invenção (que inclui as referências originais, patentes concedidas, os pedidos de patente publicada e os pedidos de patente em andamento) são incorporadas

15 explicitamente aqui por referência na totalidade. Os reagentes e os materiais usados nos exemplos como abaixo são produtos comercialmente disponíveis que são pelo menos puramente analíticos ou de nível comparável.

Exemplo

O número de série e a breve descrição para as de Exendinas, de variantes de Exendina e os conjugados usados destas nos exemplos são fornecidos na tabela abaixo, a

20 fim de facilitar a compreensão de soluções técnicas nos seguintes exemplos.

No. de Série	Breve descrição
PB-101	Exendina-4 tipo selvagem, também chamada Exenatida
PB-102	Exendina-4, Cys substituída na posição 35
PB-103	Exendin-4, Cys substituída na posição 30
PB-104	Exendin-4, Cys substituída na posição 25
PB-105	Exendin-4, Cys substituída na posição 39
PB-106	PB-105, conjugado com PEG20000
PB-106b	PB-105, conjugado com PEG20000, dupla-ramificação PEGb
PB-106c	PB-105, conjugado com PEG20000, dupla-ramificação PEGc
PB-106d	PB-105, conjugado com PEG20000, dupla-ramificação PEGd
PB-106e	PB-105, conjugado com PEG20000, dupla-ramificação PEGe
PB-107	PB-105, conjugado com PEG30000
PB-108	PB-105, conjugado com PEG40000
PB-109	PB-105, conjugado com PEG20000x2, dupla-ramificação PEG
PB-109b	PB-105, conjugado com PEG20000x2, dupla-ramificação PEGb
PB-109c	PB-105, conjugado com PEG20000x2, dupla-ramificação PEGc

PB-109d	PB-105, conjugado com PEG20000x2, dupla-ramificação PEGd
PB-110	PB-105, conjugado com PEG5000
PB-110b	PB-105, conjugado com PEG5000b
PB-110c	PB-105, conjugado com PEG5000c
PB-111	PB-105, Tyr adicionado no C-terminal
PB-112	PB-111, conjugado com PEG20000
PB-113	PB-105, Gly na posição 2 é substituída por dAla
PB-114	PB-113, conjugado com PEG40000
PB-119	PB-105, conjugado com PEG23000
PB-120	PB-105, conjugado com PEG27000

Exemplo 1. Síntese da fase sólida de Exendina-4 e variantes desta

A síntese dos polipeptídeos é uma técnica convencional no campo da bioquímica e do produto farmacêutico. Os vários tipos de sintetizadores dos polipeptídeos estão comercialmente disponíveis de um número de organizações comerciais (tais como GE HealthCare, Applied Biosystems Inc.), e muitas organizações comerciais (tais como Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai Biocolor BioScience&Technology Company) proporcionam serviços para a síntese do polipeptídeo de costume. Por exemplo, os polipeptídeos com sequência específica podem ser sintetizados por um sintetizador de polipeptídeos usando o seguinte procedimento.

A Exendina-4 e as variantes desta com um tiolato foram sintetizados pela estratégia de proteção do grupo amino com Fmoc usando um tipo de suporte sólido da "resina do amido MBHA Fmoc-Rinker". A primeira etapa: o aminoácido protegido com Fmoc no solvente N,N-dimetilformamida (DMF) foi reagido por 1-5 horas usando HBTU/DIPEA como o agente de condensação, e a integralidade da reação de condensação foi monitorada usando o método de ninidrina. A segunda etapa: a reação foi realizada em DMF usando a piperidina 10-30% como o agente de proteção por 10-30 minutos, e a integralidade da desproteção de grupos de proteção do aminoácido foi monitorada usando o método de ninidrina. A terceira etapa: as primeiras e segundas etapas foram repetidas usando o aminoácido respectivo de acordo com a sequência do polipeptídeo alvo, até que o último aminoácido na sequência estava acoplado. A quarta etapa: a reação foi realizada usando o TFA como o agente de clivagem por 1-5 horas, para clivar os polipeptídeos de suporte sólido e desproteger ao mesmo tempo. A quinta etapa: a solução do polipeptídeo após ser clivado foi precipitada usando o éter de etila e foi filtrada. O filtrado foi coletado. Depois a coluna de cromatografia do tipo C18 foi usada para a eluição com 0,1% TFA/acetonitrila-água como a fase móvel, e as frações foram coletadas, liofilizadas para obter o produto. Etapa seis: a pureza do produto foi identificada usando o método de HPLC, e a estrutura do produto foi determinada pela análise da sequência de aminoácido e pela espectrometria de massa.

O depositante pediu à empresa científica Chengdu Kaijie Biomedical para sintetizar os polipeptídeos com sequências como abaixo de acordo com o método acima:

PB-101 : Exendina-4 de tipo selvagem com uma sequência de aminoácidos como abaixo:

5 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 (SEQ ID NO: 1);

PB-102 : Variante de Exendina-4 com uma sequência de aminoácidos como abaixo, onde a posição 35 no C-terminal é Cys:

10 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-Cys-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 3);

PB-105 : Variante de Exendina-4 com uma sequência de aminoácidos como abaixo, onde a posição 39 no C-terminal é Cys:

15 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-Cys (SEQ ID NO: 4);

PB-103 : Variante de Exendina-4 com uma sequência de aminoácidos como abaixo, onde a posição 30 no C-terminal é Cys:

20 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-Cys-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5);

PB-104 : Variante de Exendina-4 com uma sequência de aminoácidos como abaixo, onde a posição 25 no C-terminal é Cys:

25 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Cys-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 6);

PB-111 : Variante de Exendina-4 com uma sequência de aminoácidos como abaixo, onde a posição 39 no C-terminal é substituído por Cys e ligado com Tyr:

30 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-Cys-Tyr (SEQ ID NO : 7); e

PB-113 : Variante de Exendina-4 com uma sequência de aminoácidos como abaixo, onde Gly na posição 2 de N-terminal é substituída por dAla e a posição 39 no

35 C-terminal é substituída por Cys:
His-dAla-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-Cys (SEQ ID NO: 8).

Como um exemplo, a Figura 1 fornece a análise dos resultados do espectrofotômetro de massa para PB-105, M+1 pico (peso de massa+1) de PB-105 é 4203.3 Da determinado por MALDI-TOF MS, o qual é correspondente com o peso de massa teórico (4202.8).

Exemplo 2a. Preparação e análise de PB-110 (PEG5000-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidas em 1 ml de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), e 5 mg PEG5000 (fornecido por PegBio Co., Ltda. (Suzhou), 5000 representa que o peso molecular de PEG é 5 kDa, e a estrutura molecular é mostrada na Figura 2) foi pesada de acordo com uma relação molar de PEG ao peptídeo sendo 2:1 e adicionado a solução acima. A solução foi adequadamente agitada para dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e interrompida por uma solução de excesso de cisteína (0,1 ml de solução de cisteína 0,5M), e finalmente mantida a -20°C para purificação posterior.

A amostra foi 5 vezes diluída em tampão de acetato de sódio de 50 mM (pH 4,5), e carregado na coluna cromatográfica de troca iônica SP (coluna XK16/20 macroCap SP packing, GE Inc.) equilibrado por volume de coluna de 5 vezes de tampão de acetato de sódio de 50mM (pH 4,5). Depois do carregamento, a coluna foi equilibrada por volume de coluna de 2 vezes de tampão de acetato de sódio de 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então linearmente aumentado a 100% tampão B (tampão de acetato de sódio de 50mM (pH 4,5) contendo NaCl 1M) em volumes de coluna de 20 vezes. O pico de eluição foi anotado no Purificador AKTA. Como determinado, aproximadamente 1 mg do peptídeo foi obtido.

Como analisado num HPLC analítico (Agilent 1200) equipado com coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho de poro de 300A (Júpiter C4 300A 4.6*250mm) e 0,1%TFA solução aquosa de solução de acetonitrila /0.1%TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada pelo HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi 10,4 min, a pureza foi 100% (ver Figura 3). A análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804 HQ three column tandem), sob a condição da solução de nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada num índice de 1,0 ml/min, e a pureza foi 97%.

Exemplo 2b. Preparação e análise de PB-110b (PEG5000b-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidas em 1 ml do tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), e 5 mg de PEG5000b (fornecido por PegBio, Ltd. (Suzhou), e a estrutura molecular mostrada na Figura 4) foi pesado segundo uma proporção molar do PEG aos peptídios em 2:1 e acrescentado à solução acima mencionada. A solução foi apropriadamente agitada para dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. Outras etapas

foram as mesmas que aquelas no exemplo 2a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, 3 colunas em tandem HQ de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804, sob a condição da solução do nitrato de sódio de 0,1 M, a eluição foi realizado em uma taxa de 1,0 ml/min), e a pureza foi determinada em 96,7%.

5 Exemplo 2c. Preparação e análise de PB-110c (PEG5000c-PB-102)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml do tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), e 5 mg de PEG5000c (fornecido por PegBio Co., O Ltd. (Suzhou), e a estrutura molecular são mostrados na figura 5) foram pesados de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos de 2:1 e adicionados à solução acima. A solução foi agitada
10 apropriadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. Outras etapas foram as mesmas que aquelas do exemplo 2a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, 3 colunas em tandem HQ de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804, sob a condição da solução do nitrato de sódio de 0,1 M, a eluição foi realizado em uma taxa de 1,0 ml/min), e a pureza foi determinada em 97,8%

15 Exemplo 3a. Preparação e análise de PB-106 (PEG20000-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml do tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), e 5 mg de PEG20000 (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000 representa 20kDa do peso molecular de PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 2) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionado à
20 solução acima. A solução foi agitada apropriadamente a fim de dissolver o PEG e formar a mistura homogênea com o peptídeo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e interrompida posteriormente pela solução de cisteína (0,1 ml da solução de cisteína 0,5M), e mantida finalmente a -20°C para a purificação.

A amostra foi diluída 5 vezes no tampão de acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e
25 carregada na coluna cromatográfica de troca iônica SP (coluna XK16/20, macroCap, GE Inc.) equilibrada em 5 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). Após o carregamento, a coluna foi equilibrada em 2 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então aumentado linearmente para o tampão B de 100% (tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que contém o NaCl 1 M) em
30 20 vezes o volume de coluna. O pico da eluição foi coletado no purificador AKTA. Como determinado, aproximadamente 1 mg do peptídeo foi obtido.

A solução coletada foi detectada pela electroforese em gel de SDS-PAGE, e corada com azul de Coomassie Brilhante e tingido com iodo (veja por favor a figura 6A e 6B). A eluição foi realizada usando a coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho do poro de
35 300Å (Jupiter C4 300Å 4.6*250mm) e 0,1% soluções aquosas TFA /0,1% da solução de acetonitrilo TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada por HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi de 11,5 minutos, a pureza foi

determinada em 100% (veja figura 7). A análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 98,9%.

5 Exemplo 3b. Preparação e análise de PB-106b (PEG20000b-PB-105)

1,0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml do tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), e 2,5 mg de PEG20000b (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000 representa 20kDa de peso molecular do PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 8) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e
10 adicionado à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar a mistura homogênea com o peptídeo. As outras etapas foram as mesmas utilizadas no exemplo 3a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a
15 pureza foi determinada em 98,2%.

Exemplo 3c. Preparação e análise de PB-106c (PEG20000c-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foi dissolvido em 1 ml do tampão de fosfato de sódio 20 mM (pH 6,5), e magnésio 20 de PEG20000c (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000 representa 20kDa do peso molecular de PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura
20 9) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionado à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. As outras etapas foram as mesmas utilizadas no exemplo 3a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da
25 solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 97,2%.

Exemplo 3d. Preparação e análise de PB-106d (PEG20000d-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 20 mg de PEG20000c (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000 representa 20kDa de
30 peso molecular do PEG e a estrutura molecular é mostrado na figura 10) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionado à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. As outras etapas foram as mesmas utilizadas no exemplo 3a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem
35 de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 97,5%.

Exemplo 3e. Preparação e análise de PB-106e (PEG20000e-PB-105)

2.0 mg de PB-105 foi dissolvido em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 20 mg de PEG20000e (fornecido por PegBio, Ltd. (Suzhou), 20000 representa representa 20kDa de peso molecular do PEG e a estrutura molecular é mostrado na figura 10) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptideos que é de 2:1 e adicionado à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptideo. As outras etapas foram as mesmas utilizadas no exemplo 3a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 95,8 %.

Exemplo 3f. Preparação e análise de PB-112 (PEG20000-PB-111)

2.0 mg PB-111 foi dissolvido em 1 ml de tampão fosfato de 20 Mm (pH 6,5), e 19 mg de PEG20000 (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000 representa o 20kDa do peso molecular de PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 2) foi pesado de acordo com uma relação molar de PEG aos peptideos que é de 2:1 e adicionado à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptideo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e interrompida posteriormente por uma solução (0,1 ml da solução de cisteína 0,5M), e mantida finalmente a -20°C para a purificação.

A amostra foi diluída 5 vezes usando o tampão acetato de sódio de 50 Mm (pH 4,5), e aplicada à coluna cromatográfica de troca iônica SP (GE, coluna XK16/20, macroCap SP packing) equilibrada em 5 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). Após o carregamento, a coluna foi equilibrada em 2 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então aumentado linearmente para o tampão B de 100% (tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que contém NaCl 1 M) em 20 vezes o volume de coluna. O pico da eluição foi coletado no purificador AKTA. Como determinado, aproximadamente 1 mg do peptideo foi obtido.

A solução foi eluída em coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho do poro de 300Å (Jupiter C4 300Å 4.6*250mm) e 0,1% soluções aquosas TFA /0,1% da solução de acetonitrilo TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada por HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi de 10,6 minutos, a pureza foi determinada em 98,5% (veja figura 12). A análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 98,7%.

Exemplo 4. Preparação e análise de PB-107 (PEG30000-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foi dissolvido em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6.5), e 30

mg de PEG30000 (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 30000 representa 30kDa do peso molecular de PEG e da estrutura molecular é mostrado na figura 2) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionado à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e interrompida posteriormente por uma solução (0,1 ml da solução de cisteína 0,5M), e mantida finalmente a -20°C para a purificação.

A amostra foi diluída 5 vezes usando o tampão acetato de sódio de 50 mM (pH 4,5), e aplicada à coluna cromatográfica de troca iônica SP (GE, coluna XK16/20, macroCap SP packing) equilibrada em 5 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). Após o carregamento, a coluna foi equilibrada em 2 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então aumentado linearmente para o tampão B de 100% (tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que contém NaCl 1 M) em 20 vezes o volume de coluna. O pico da eluição foi coletado no purificador AKTA. Como determinado, aproximadamente 1 mg do peptídeo foi obtido

A solução coletada foi detectada pela eletroforese em gel de SDS-PAGE, e corada com azul de Coomassie Brilhante e tingido com iodo (veja por favor a figura 6A e 6B). A eluição foi realizada usando a coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho do poro de 300Å (Jupiter C4 300Å 4.6*250mm) e 0,1% soluções aquosas TFA /0,1% da solução de acetonitrilo TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada por HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi de 11,5 minutos, a pureza foi determinada em 100% (veja figura 7). A análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 98,7%.

Exemplo 5a. Preparação e análise de PB-108 (PEG40000-PB-105)

2.0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 40 mg de PEG40000 (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 40000 representa 40kDa do peso molecular de PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 2) foi pesada de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionada à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e interrompida posteriormente por uma solução (0,1 ml da solução de cisteína 0,5M), e mantida finalmente a -20°C para a purificação.

A amostra foi diluída 5 vezes no tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e carregada na coluna cromatográfica de troca iônica SP (coluna XK16/20, macroCap, GE Inc.) equilibrada em 5 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH

4,5). Após o carregamento, a coluna foi equilibrada em 2 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então aumentado linearmente para o tampão B de 100% (tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que contém o NaCl 1 M) em 20 vezes o volume de coluna. O pico da eluição foi coletado no purificador AKTA. Como determinado, aproximadamente 1 mg do peptídeo foi obtido.

A solução coletada foi detectada pela electroforese em gel de SDS-PAGE, e corada com azul de Coomassie Brilhante e tingido com iodo (veja, por favor, a figura 6A e 6B). A eluição foi realizada usando a coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho do poro de 300Å (Jupiter C4 300Å 4.6*250mm) e 0,1% soluções aquosa TFA /0,1% da solução de acetonitrilo TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada por HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi de 11,4 minutos, a pureza foi determinada em 100% (veja figura 14). A análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 97,2%.

Exemplo 5b. Preparação e análise de PB-114 (PEG40000-PB-113)

2,0 mg de PB-113 foram dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 40 mg de PEG40000 (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 40000 representa 40kDa do peso molecular do PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 2) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionado à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e interrompida posteriormente por uma solução (0,1 ml da solução de cisteína 0,5M), e mantida finalmente a -20°C para a purificação.

A amostra foi diluída 5 vezes no tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e carregada na coluna cromatográfica de troca iônica SP (coluna XK16/20, macroCap, GE Inc.) equilibrada em 5 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). Após o carregamento, a coluna foi equilibrada em 2 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então aumentado linearmente para o tampão B de 100% (tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que contém NaCl 1 M) em 20 vezes o volume de coluna. O pico da eluição foi coletado no purificador AKTA. Como determinado, aproximadamente 1 mg do peptídeo foi obtido.

A eluição da solução coletada foi realizada usando a coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho do poro de 300Å (Jupiter C4 300Å 4.6*250mm) e 0,1% soluções aquosa TFA /0,1% da solução de acetonitrilo TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada por HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi de 12,6 minutos, a pureza foi determinada em 97,9% (veja figura 15). A análise

de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 98,4%.

Exemplo 6a. Preparação e análise de PB-109 (PEG20000x2 (dobro-braço PEG) - PB-105)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 40 mg de PEG20000x2 (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000 representa 20 kDa de um peso molecular de um braço no PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 16) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptideos que é de 2:1 e adicionada à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptideo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e interrompida posteriormente por uma solução (0,1 ml da solução de cisteína 0,5M), e mantida finalmente a -20°C para a purificação.

A amostra foi diluída 5 vezes no tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e carregada na coluna cromatográfica de troca iônica SP (coluna XK16/20, macroCap, GE Inc.) equilibrada em 5 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). Após o carregamento, a coluna foi equilibrada em 2 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então aumentado linearmente para o tampão B de 100% (tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que contém NaCl 1 M) em 20 vezes o volume de coluna. O pico da eluição foi coletado no purificador AKTA. Como determinado, aproximadamente 1 mg do peptideo foi obtido.

A solução coletada foi detectada pela electroforese em gel de SDS-PAGE, e corada com azul de Coomassie Brilhante e tingido com iodo (veja, por favor, a figura 6A e 6B). A eluição foi realizada usando a coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho do poro de 300Å (Jupiter C4 300Å 4.6*250mm) e 0,1% soluções aquosa TFA /0,1% da solução de acetonitrilo TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada por HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi de 11,5 minutos, a pureza foi determinada em 100% (veja figura 17). A análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 99,3%.

Exemplo 6b. Preparação e análise de PB-109b (PEG20000x2 (PEG duplo-braço) b-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 40 mg de PEG20000x2b (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000x2 representa 20x2 kDa do peso molecular de PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 18) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptideos que é de 2:1 e adicionado

à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. As outras etapas foram as mesmas utilizadas no exemplo 6a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, 3 colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 99,2%.

Exemplo 6c. Preparação e análise de PB-109c (PEG20000x2 (PEG duplo-braço) de c-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foi dissolvido em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 40 mg de PEG20000x2c (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000x2 representa 20x2 kDa do peso molecular de PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 19) foram pesados de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionados à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. As outras etapas foram as mesmas utilizadas no exemplo 6a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, 3 colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 98,8%.

Exemplo 6d. Preparação e análise de PB-109d (PEG20000x2 (PEG duplo-braço) de PB-105)

2,0 mg de PB-105 foi dissolvido em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 40 mg de PEG20000x2c (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 20000x2 representa 20x2 kDa do peso molecular de PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 20) foram pesados de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionados à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. As outras etapas foram as mesmas utilizadas no exemplo 6a. Finalmente, a análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, 3 colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 99,2%.

Exemplo 7. Preparação e análise de PB-119 (PEG23000-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 22 mg de PEG23000 (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 23000 representa 23 kDa de um peso molecular de um braço no PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 2) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionada à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e

interrompida posteriormente por uma solução de excesso de cisteína (0,1 ml da solução de cisteína 0,5M), e mantida finalmente a -20°C para a purificação.

A amostra foi diluída 5 vezes no tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e carregada na coluna cromatográfica de troca iônica SP (coluna XK16/20, macroCap, GE Inc.) equilibrada em 5 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). Após o carregamento, a coluna foi equilibrada em 2 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então aumentado linearmente para o tampão B de 100% (tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que contém NaCl 1 M) em 20 vezes o volume de coluna. O pico da eluição foi coletado no purificador AKTA. Aproximadamente 1 mg do peptídeo foi obtido como determinado.

A eluição da solução coletada foi realizada usando a coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho do poro de 300Å (Jupiter C4 300Å 4.6*250mm) e 0,1% soluções aquosa TFA /0,1% da solução de acetonitrilo TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada por HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi de 11,6 minutos, a pureza foi determinada em 96,0% (veja figura 21). A análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 97,1%.

Exemplo 8. Preparação e análise de PB-120 (PEG27000-PB-105)

2,0 mg de PB-105 foram dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato 20 mM (pH 6,5), e 24 mg de PEG27000 (fornecido por PegBio Co., Ltd. (Suzhou), 27000 representa 27 kDa de um peso molecular de um braço no PEG e a estrutura molecular é mostrada na figura 2) foi pesado de acordo com uma relação molar do PEG aos peptídeos que é de 2:1 e adicionada à solução acima. A solução foi agitada adequadamente a fim de dissolver o PEG e formar uma mistura homogênea com o peptídeo. A reação foi realizada por 1 hora a 20°C e interrompida posteriormente por uma solução de excesso de cisteína (0,1 ml da solução de cisteína 0,5M), e mantida finalmente a -20°C para a purificação.

A amostra foi diluída 5 vezes no tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e carregada na coluna cromatográfica de troca iônica SP (coluna XK16/20, macroCap, GE Inc.) equilibrada em 5 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). Após o carregamento, a coluna foi equilibrada em 2 vezes o volume da coluna com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), e o tampão foi então aumentado linearmente para o tampão B de 100% (tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que contém NaCl 1 M) em 20 vezes o volume de coluna. O pico da eluição foi coletado no purificador AKTA. Aproximadamente 1 mg do peptídeo foi obtido como determinado.

A eluição da solução coletada foi realizada usando a coluna analítica de fase reversa C4 com um tamanho do poro de 300Å (Jupiter C4 300Å 4.6*250mm) e 0,1%

soluções aquosa TFA /0,1% da solução de acetonitrilo TFA com um gradiente de 61/39 a 54/46 (10 min). A amostra foi analisada por HPLC analítico (Agilent1200), e o tempo de retenção foi de 12,1 minutos, a pureza foi determinada em 97,7% (veja figura 22). A análise de GPC foi empregada (SHIMADZU LC-20AD, colunas HQ in tandem de SB-802 HQ/SB-803 HQ/SB-804), sob a condição da solução do nitrato de sódio 0,1 M, a eluição foi realizada em uma taxa de 1,0 ml/min, e a pureza foi determinada em 98,4%.

Exemplo 9. Teste de estabilidade para os conjugados de polietilenoglicol de PB-105 PB-110 (PEG5000-PB-105), PB-106 (PEG20000-PB-105), PB-107 (PEG30000-PB-105), PB-108 (PEG40000-PB-105) e PB-109 (PEG20000*2-PB-105) foram colocados respectivamente no tampão acetato de sódio (pH 4,5) e no tampão de fosfato (pH 7,0) a 4°C e -20°C, e avaliados para estabilidade. As amostras foram registradas para análise de HPLC no dia 7, 15, 30, 60. Os resultados para o dia 60 mostraram que as amostras eram estáveis em pH 4,5 e -20°C (Figura 23A), e em pH 7,0 e 4°C ou -20°C (Figura 23B,23C).

Exemplo 10. Efeito *in vitro* de PB-101 e PB-105 na atividade de cAMP intracelular Células PC12 foram digeridas, semeadas em placas de 24 poços numa densidade de 10^5 célula/ml, e incubadas por 48 hr (60-70% confluência). O meio de cultura foi abandonado e foi lavado duas vezes usando o tampão fosfato (PBS). 1 ml de PBS contendo 1% de BSA foi adicionado. PB-101 e PB-105 da variante de Exendina-4 (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M) com cisteína na posição 39 do C-terminal foram incubados com 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, concentração final de 100 μ M) por 30 min. O meio de incubação foi abandonado. 500 μ l de HCl (0,1 M) foi adicionado parar a degradação de cAMP pela enzima. As células foram recolhidas e lisadas por sonicação. O conteúdo de proteína em células foi determinado por BCA. A curva padrão foi desenhada reunindo uma serie de grupos padrões com concentrações diferentes usando a instrução do kit de ensaio imunoenzimático cAMP (U.S. RD System corporation). Absorvências foram determinadas a 450 nm em leitor ELISA (U.S. Thermo Fisher Scientific Corporation) após a reação. A concentração de cAMP foi lida em curva padrão usando tal absorbância. Então, a concentração de cAMP nas amostras foi calculada. A relação dose-resposta para o efeito de PB-101 e PB-105 em cAMP intracelular crescente foi calculado usando o software Graphpad Prism.

Os resultados experimentais são mostrados na figura 24. PB-101 aumentou o conteúdo do cAMP nas células PC12 em uma maneira dose-dependente, o máximo de cAMP aumentado (E_{max}) foi $133,2 \pm 7,2$ pmol/100 μ g (proteína), e EC_{50} foi $1,9 \times 10^{-9}$ M. PB-105 apresentou um efeito *in vitro* similar em cAMP nas células PC12 comparadas com PB-101. O máximo de cAMP aumentado (E_{max}) para PC-105 foi $129,4 \pm 6,8$ pmol/100 μ g (proteína) (PB-105 vs PB-101, $P > 0,05$); EC_{50} was $2,5 \times 10^{-9}$ M. A análise posterior mostrou que $\log EC_{50}$ para PB-101 e PB-105 foi respectivamente $-8,71 \pm 0,15$ e

-8,61±0,15 (PB-105 vs PB-101, $P > 0,05$). Isso indicou que a atividade biológica de PB-101 não foi alterada pela introdução da cisteína (tiol) na posição 39 do C-terminal.

Exemplo 11. Efeito *in vitro* de PB-105 e do conjugado PEGuilado deste na atividade de cAMP intracelular

5 As células PC12 foram digeridas, semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de 10^5 cel/ml, e incubadas por 48 horas (a confluência de 60-70%). O meio de cultura foi abandonado e lavado duas vezes usando o tampão fosfato (PBS). 1 ml de PBS contendo 1% de BSA foi adicionado. O conjugado de PB-105, PB-105 PEGuilado (PEG5000) (PB-110), o conjugado de PB-105 PEGuilado (PEG20000) (PB-106), o
10 conjugado de PB-105 PEGuilado (PEG30000) (PB-107), o conjugado de PB-105 PEGuilado (PEG40000) (PB-108) e o conjugado de PB-105 PEGuilado (PEG20000×2, duplo-braço) (PB-109) (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M) foram incubados com 3 isobutil-1-metilxantina (IBMX, concentração final de $100\mu\text{M}$) por 30 Min. O meio de incubação foi abandonado. 500 μl de HCl (0,1 M) foram adicionados para interromper a degradação do
15 cAMP pela enzima. As células foram coletadas e lisadas pela sonicação. O conteúdo de proteína nas células foi determinado por BCA. A curva padrão foi traçada ajustando series de grupos padrões com concentrações diferentes usando a instrução do kit imunoenzimático cAMP (U.S. RD System corporation). As absorvências foram determinadas a 450 nm no leitor ELISA (U.S. Thermo Fisher Scientific Corporation) após a reação. A concentração
20 de cAMP foi lida em curva padrão usando tal absorbância. Então, a concentração de cAMP nas amostras foi calculada. A relação dose- resposta para o efeito de PB-106, de PB-107, de PB-108, de PB-109 e de PB-110 no aumento de cAMP intracelular foi calculado usando o software Graphpad Prism.

Os resultados experimentais indicaram que PB-105 aumentou o conteúdo de cAMP
25 nas células PC12 em uma maneira dose-dependente, o máximo de cAMP aumentado (E_{max}) foi de $103,9\pm 1,5$ pmol/100 μg (proteína), e EC_{50} foi de $1,3\times 10^{-9}$ M. A modificação de peguilação fez com que a curva da relação dose-resposta movesse para a direita paralelamente de uma maneira da massa-independência molecular (5-40 kDa), e reduzir a atividade biológica de PB-105 (figura 25). Os EC_{50} de PB-110, de PB-106, de PB-107, de
30 PB-108 e de PB-109 eram respectivamente $1,1\times 10^{-9}$; $1,1\times 10^{-9}$; $1,2\times 10^{-8}$; $9,7\times 10^{-8}$ e $1,3\times 10^{-7}$ M. A modificação de Peguilação de 5 kDa (PB-110) e 20 kDa (PB-106) não teve quase nenhum efeito na atividade de PB-105 (a atividade era respectivamente 115% daquela de PB-105), e a modificação de Peguilação de 30 kDa (PB-107) e 40 kDa (incluindo braço linear e duplo, PB-108 e PB-109) reduziu respectivamente a atividade de PB-105 por
35 aproximadamente 90% e 99%. As correlações entre o peso molecular de PEG no conjugado PEGuilado e as atividades destas drogas ($\text{Log } EC_{50}$) são mostradas na figura 26A (que inclui EC_{50} de PB-105 na figura 24).

Example 12. Efeito *in vitro* de PB-105 e conjugados PEGuilados destes na atividade de cAMP intracelular

As células PC12 foram digeridas, semeadas em placas de 24 poços em uma densidade de 10^5 cel/ml, e incubadas por 48 horas (a confluência de 60-70%). O meio de cultura foi abandonado e lavado duas vezes usando o tampão fosfato (PBS). 1 ml de PBS contendo 1% de BSA foi adicionado. O conjugado de PB-105, PB-105 PEGuilado (PEG23000) (PB-119), o conjugado de PB-105 PEGuilado (PEG27000) (PB-120), (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M) foram incubados com 3 isobutil-1-metilxantina (IBMX, concentração final de 100 μ M) por 30 Min. O meio de incubação foi abandonado. 500 μ l de HCl (0,1 M) foram adicionados para interromper a degradação de cAMP pela enzima. As células foram coletadas e lisadas pela sonicação. O conteúdo de proteína nas células foi determinado por BCA. A curva padrão foi traçada ajustando séries de grupos padrões com concentrações diferentes usando a instrução do kit imuno ligada a enzima cAMP acampamento (U.S. RD System corporation). As absorvências foram determinadas a 450 nm no leitor ELISA (U.S. Thermo Fisher Scientific Corporation) após a reação. A concentração de cAMP foi lida em curva padrão usando tal absorbância. Então, a concentração de cAMP nas amostras foi calculada. A relação dose- resposta para o efeito de PB-105, de PB-119, e PB-120 no aumento de cAMP intracelular foi calculado usando o software Graphpad Prism.

Os resultados experimentais indicaram que PB-105 aumentou o conteúdo de cAMP nas células PC12 de uma maneira de dose-dependência, e EC_{50} foi $2,7 \times 10^{-9}$ M. PB-106 (PEG20000) e PB-119 (PEG23000) não tiveram nenhum efeito na atividade de PB-105 para cAMP, e PB-120 (PEG27000) fez com que a curva dose-resposta movesse para a direita paralelamente e deduzisse a atividade biológica de PB-105 para cAMP em aproximadamente 50% (Figura 27). O EC_{50} de PB-106, PB-119 e PB-120 foi respectivamente $1,5 \times 10^{-9}$; $2,5 \times 10^{-9}$ e $5,4 \times 10^{-9}$ M.

Normalmente acredita-se que a atividade biológica da biomolécula conjugada irá reduzir exponencialmente com o aumento do peso molecular do grupo conjugado (tais como a partir de 4kDa) (Bailon et al. Rational design of potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C. Bioconjugate Chem 2001 ; 12 : 195 -202; Bowen et al. Relationship between molecular weight and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mutein. Experimental Hematology 1999; 27: 425 -32; Bailon et al. PEG-modified biopharmaceuticals. Expert Opin Deliv. 2009; 6: 1-16). Entretanto, O depositante descobriu surpreendentemente que, na Figura 25 e 27, a relação entre o peso molecular do grupo de polímero conjugado e a atividade do conjugado da variante de Exendina para estimular cAMP *in vitro* não está de acordo com esta expectativa. Pelo

menos para o conjugado da variante de Exendina conjugado por PEG com um peso molecular de até 23 kDa, a modificação de PEGuilação não teve nenhum efeito na ação do conjugado da variante de Exendina para estimular *in vitro* as células para produzir cAMP (e quando o peso molecular de PEG sendo de até 27 kDa, tem apenas um efeito moderado). Em contraste, a modificação de PEGuilação não teve nenhum efeito no efeito máximo de PB-105 para estimular a produção de cAMP (E_{max}). O E_{max} de PB-110, PB-106, PB-107, PB-108 e PB-109 é respectivamente $102,1 \pm 1,8$; $111,9 \pm 2,1$; $126,2 \pm 3,4$; $100,4 \pm 1,7$ e $115,5 \pm 3,5$ pmol/100 μ g proteína. O peso molecular de PEG nos conjugados PEGuilados não tiveram correlação com E_{max} dessas drogas (ver Figura 26B) (incluindo o E_{max} de PB-105 na Figura 24).

O depositante realizou a seguinte análise baseada no resultado surpreendente. Uma vez que o meio contendo soro com várias proteinases presentes não foi usado como o sistema de reação neste exemplo e nenhuma proteinase foi adicionada na solução de reação, a degradação enzimática da variante de Exendina e os conjugado destes foram significativamente mais baixos do que *in vivo*. Ou seja, no caso do teste *in vivo* com um tempo de ação mais longo, o grau de redução para a atividade biológica dos conjugado da variante de Exendina de acordo com a presente invenção é menor do que a Exendina não-conjugada do tipo selvagem ou a variante de Exendina, mesmo a atividade biológica dos conjugados da variante de Exendina de acordo com a presente invenção seja mais elevada. Em outro aspecto, a fração do polímero que é mais de 23 kDa pode ser usada para conjugar a variante de Exendina sem afetar significativamente a atividade biológica *in vivo*. Embora a presente invenção não seja limitada por esta teoria, a predição é provada nos seguintes exemplos.

Exemplo 13. Experimento de tempo-resposta do efeito hipoglicêmico para PB-101 e PB-105

Camundongos masculinos Kunming (peso corporal era 27-32 g) foram fornecidos. Os ratos não jejuaram para o alimento ou água antes do experimento. Foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com seis camundongos em cada grupo. O volume igual de solução salina (10 ml/kg), PB-101 (10 μ g/kg) e a variante PB-105 de Exendina (10 μ g/kg) com um cisteína na posição 39 do C-terminal foram injetados subcutaneamente. Em 0, 1, 2, 4, 8, 12 horas após a injeção, amostragem do sangue na ponta da cauda foi realizada. A glicose do sangue foi determinada usando o medidor de glicose de sangue OneTouch e as tiras de teste acompanhados U.S. Johnson & Johnson). A curva do tempo-resposta para o efeito hipoglicemico foi traçada usando o valor da glicose de sangue em pontos diferentes de tempo para a linha central de y e usando pontos de tempo para a linha central de x, para calcular a meia-vida biológica de efeitos hipoglicemicos para PB-101 e PB-105. O resultado é mostrado na figura 28. A meia-vida da variante de Exendina-4 substituído pelo cisteína e

Exendina-4 é respectivamente $4,7 \pm 0,2$ horas e $4,4 \pm 0,2$ horas (PB-105 contra PB-101, $P > 0,05$). Indica que a variante de Exendina-4 substituída pelo cisteína na posição 39 do C-terminal e Exendina-4 têm a meia-vida comparável.

Exemplo 14. Experimento da dose-resposta do efeito hipoglicêmico para PB-101 e
5 PB-105

Camundongos masculinos Kunming (peso corporal era 23-27 g) foram fornecidos. Os camundongos jejuaram para o alimento por 3 horas mas não para a água antes do experimento. Foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com seis camundongos em cada grupo. O volume de solução salina (10 ml/kg), de PB-101 (0,01; 0,1; 0,3; 1;3;10;100
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e variante PB-105 de Exendina (0,01; 0,1; 0,3; 1;3;10;100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) com um cisteína na posição 39 do C-terminal foi subcutaneamente injetada. Em 1 hora após a injeção, a amostragem do sangue na ponta da cauda foi realizada. A glicose do sangue foi determinada usando o medidor de glicose de sangue OneTouch e as tiras de teste acompanhados U.S. Johnson & Johnson). A curva da dose- resposta para o efeito
15 hipoglicêmico foi traçada usando o valor da glicose de sangue para a linha central de y e usando a dose para a linha central de x (figura 29). Por sua vez, o parâmetro da relação dose- resposta para PB-101 e PB-105 (E_{max} and ED_{50}) foi calculada usando o software Graphpad Prizm. O resultado indicou que a eficiência hipoglicêmica máxima para a injeção do polus de PB-101 e PB-105 foi respectivamente 32,2% e 36,1%, o valor de ED_{50} foi
20 respectivamente 0,6 e 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A análise posterior indicou que o Log ED_{50} de PB-101 e PB-105 foi respectivamente $-0,25 \pm 0,17$ e $0,08 \pm 0,20$ (PB-105 vs PB-101, $P > 0,05$). Os resultados experimentais indicaram que a variante de Exendina-4 de PB-105 com uma cisteína na posição 39 do C-terminal não tem significativamente nenhuma diferença com a Exendina-4 em relação ao efeito hipoglicêmico.

Exemplo 15. Experimento da dose- resposta do efeito hipoglicêmico para PB-101 e
25 a variante deste (PB-102)

Camundongos masculinos Kunming (peso de corpo era 22-26 g) foram fornecidos. Os camundongos jejuaram para o alimento por 3 horas, mas não para a água antes do experimento. Foram distribuídos aleatoriamente em 18 grupos com seis camundongos em
30 cada grupo. Volume de solução salina (10 ml/kg), de PB-101 (0,01; 0,1; 1;10;100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e variante de Exendina de PB-102 (0,01; 0,1; 1;3;10;100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) com um cisteína na posição 35 do C-terminal foi subcutaneamente injetada. Em 1 hora após a injeção, a amostragem do sangue na ponta da cauda foi realizada. A glicose do sangue foi determinada usando o medidor de glicose de sangue OneTouch e as tiras de teste acompanhados U.S. Johnson &
35 Johnson). A curva da dose- resposta para o efeito hipoglicêmico foi traçada usando o valor da glicose de sangue para a linha y e usando a dose para a linha x (figura 29). Por sua vez, o parâmetro da relação dose- resposta para PB-101 e PB-102 (E_{max} and ED_{50}) foi calculada

usando o software Graphpad Prizm. O resultado indicou que a eficiência hipoglicêmica máxima para a injeção de polus de PB-101 e PB-102 foi respectivamente 39,8% e 32,8%, o valor de ED₅₀ foi respectivamente 0,5 e 2,5 µg/kg. A análise posterior indicou que o Log ED₅₀ de PB-101 e PB-102 foi respectivamente -0,2867±0,2272 e 0,4015±0,2946 (PB-102 vs PB-101, P> 0,05). Os resultados experimentais indicaram que a variante de Exendina-4 de PB-102 com uma cisteína na posição 35 do C-terminal não teve significativamente nenhuma diferença com a Exendina-4 em relação ao efeito hipoglicêmico.

Example 16. Experimento da relação tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico de quantidades iguais de PB-105 e conjugados PEGuilados

Camundongos machos Kunming (peso corporal era 22-26 g) foram fornecidos. Os camundongos jejuaram para o alimento por 3 horas, mas não para a água antes do experimento. Foram distribuídos aleatoriamente em 18 grupos com seis camundongos em cada grupo. Um volume igual de PB-105 (10 µg/kg), PB-105 PEGuilado (PEG5000) conjugado PB-110 (10 µg/kg), PB-105 PEGuilado (PEG20000) conjugado PB-106 (10 µg/kg), PB-105 PEGuilado (PEG30000) conjugado PB-107 (10 µg/kg), PB-105 PEGuilado (PEG40000) conjugado PB-108 (10 µg/kg) e PB-105 PEGuilado (PEG20000×2, duplo-braço) conjugado PB-109 (10 µg/kg) foram subcutaneamente injetados in bolus. Em 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36 horas após a injeção, a amostragem do sangue na ponta da cauda foi realizada. A glicose de sangue foi determinada usando o medidor de glicose de sangue OneTouch e as tiras de teste acompanharam U.S. Johnson & Johnson). A curva de tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico foi traçada usando o valor da glicose de sangue em pontos de tempo diferentes para a linha y e usando pontos do tempo para a linha x (figura 31), para calcular a meia-vida biológica e o efeito hipoglicêmico máximo de efeitos hipoglicêmicos para o conjugado PB-105 e o PEGuilado deste, assim como a área acima da curva do efeito hipoglicêmico (tabela 1). Pode-se ver na tabela 1, cada conjugado da variante de Exendina neste experimento tem similar ou mesmo significativamente mais alto (PB-106) efeito hipoglicêmico acumulado (veja a área acima da curva), e estes conjugados da variante de Exendina têm uma meia-vida biológica significativamente mais longa, comparado com o PB-105 não-conjugado. A análise para o peso molecular do PEG vs. A meia-vida biológica, o efeito hipoglicêmico máximo e a área acima da curva do efeito hipoglicêmico indica que PB-105 conjugados PEGuilados PB-106, PB-107, PB-108 e PB-109 todos prolongam significativamente o período do efeito hipoglicêmico de PB-105 (meia-vida t_{1/2}). Entretanto, quando o peso molecular do PEG que está na escala de 5-20 kDa, o prolongamento da meia-vida biológica é proporcional ao peso molecular, e quando é maior de 20 kDa, o período do efeito hipoglicêmico (a meia-vida biológica permanece a mesmo (figura 32A). Os conjugados PEGuilados têm o mesmo

efeito hipoglicêmico máximo quando o peso molecular do PEG está na escala de 5-20 kDa, mas quando é maior que 20 kDa, o efeito hipoglicêmico máximo diminui com o aumento do peso molecular de PEG (figura 32B). Em relação a área acima da curva do efeito hipoglicêmico, o PB-106 (kDa PEG20) tem um efeito hipoglicêmico acumulado significativamente mais alto do que PB-105, e os outros conjugados tem efeito similar ou um pouco menor (figura 32C). Como descrito acima, A modificação de PEGuilação sítio-específica (PB-110 e PB-106) não afeta significativamente o efeito hipoglicêmico máximo dos conjugados da variante de Exendina (respectivamente, 96% de PB-105), pelo menos quando o peso molecular do PEG é de até 20 kDa. A modificação de Peguilação reduz significativamente o efeito hipoglicêmico máximo quando o peso molecular do PEG é de 30 kDa ou mesmo maior (PB-107, PB-108 e PB-109), embora estes conjugados ainda tenham o efeito hipoglicêmico acumulado comparável e significativamente maior por muito tempo de meia-vida biológica. Este resultado indica que a fração conjugada com um peso molecular mais elevado pode ser útil para 5 10 15 20

conjugar as variantes de Exendina. Como tal, uma meia-vida biológica significativamente mais longa e um nível mais delicado e mais estável de glicose do sangue são obtidos, para impedir que o nível de glicose do sangue abaixe demasiadamente no curto período e flutue em uma larga escala. Esta descoberta é consistente com o resultado *in vitro* no experimento de cAMP como descrito acima (veja figura 26).

Tabela 1. Meia-vida biológica, efeito hipoglicêmico máximo e Área Acima da Curva para reduzir a glicose sanguínea (AAC) para PB-105 e conjugados PEGuilados destes (12 camundongos em cada grupo)

conjugados de Exendina	T _{1/2} (hrs)	Efeito Máximo hipoglicêmico (% valor antes da dosagem)	Área Acima da Curva para glicose sanguínea (AAC, mmol*h/L)
PB-105	4.9±0.1	38.0±4.3	32.8±5.4
PB-110	7.0±2.0	36.3±1.2	31.8±4.6
PB-106	13.4±0.5*	36.5±3.2	53.9±4.3*
PB-107	12.5±2.0*	24.3±2.8*	30.0±7.2
PB-108	10.8±2.0*	22.6±2.9*	25.3±5.7
PB-109	9.2±2.2*	20.2±3.2*	21.6±4.8

* P < 0.05 (vs PB-105)

25 Exemplo 17. Experimento da relação tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico de quantidades equivalentes de PB-105 e conjugados PEGuilados (PEG30000) destes (PB-107)

Uma vez que PEG30000 (PB-107) *in vitro* reduziu a atividade biológica de PB-105 em aproximadamente 90% (figura 25), e *in vivo* reduziu a atividade biológica de PB-105 em aproximadamente 50% (figura 31), a dose de PB-107 foi aumentada a fim de estudar a meia-vida biológica de PB-107 sob a condição de ser equivalente a PB-105. Camundongos machos Kunming (o peso corporal era 22-25 g) foram fornecidos. Os camundongos não jejuaram para o alimento ou para a água antes do experimento. Foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com seis camundongos em cada grupo. PB-105 (10 µg/kg) e PB-105 PEGuilado (PEG30000) PB-107 conjugado (100 µg/kg, esta dose produz um efeito hipoglicêmico de aproximadamente 100% em 10 µg/kg de PB-105) foram injetados subcutaneamente. Em 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72 horas após a injeção, amostragem do sangue na ponta da cauda foi realizada. A glicose do sangue foi determinada usando o medidor de glicose de sangue OneTouch e as tiras de teste acompanharam U.S. Johnson & Johnson). A curva de tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico foi traçada usando o valor da glicose do sangue em pontos de tempos diferentes para a linha y e usando pontos de tempo para a linha x, para calcular a meia-vida biológica de PB-105 (10 µg/kg) e PB-107 (100 µg/kg). Os resultados são mostrados na figura 33, a meia-vida biológica de PB-105 (10 µg/kg) e PB-107 (100 µg/kg) são respectivamente 4,5±0,4 horas e 44,6±4,5 horas P > 0.05, PB-107 vs PB-105). O estudo para a relação tempo-resposta da dose equivalente indica que a Peguilação (PEG30000) (PB-107) prolonga o período do efeito hipoglicêmico de PB-105 em 10 vezes.

* Exemplo 18. Experimento da dose- resposta do efeito hipoglicêmico para PB-105 e PEGuilados (PEG20000) conjugados deste (PB-106)

Camundongos masculinos Kunming (o peso corporal era 20-24 g) foram fornecidos. Os camundongos jejuaram para o alimento por 3 horas, mas não para a água antes do experimento. Foram distribuídos aleatoriamente em 13 grupos com seis camundongos em cada grupo. Volume de solução salina igual (10 ml/kg), de PB-105 (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 µg/kg) e dose igual de PEGuilado (PEG20000) PB-106 conjugado (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 µg/kg) foram injetados subcutaneamente. Em 1 hora após a injeção para o grupo PB-105 (o ponto do tempo para o pico da redução da glicose do sangue, ver a figura 28 e 31), em 4 horas após a injeção para o grupo PB-106 (o ponto do tempo para o pico da redução da glicose do sangue, ver a figura 31), a amostragem do sangue na ponta da cauda foi realizada. A glicose do sangue foi determinada usando o medidor de glicose do sangue OneTouch e as tiras de teste acompanharam U.S. Johnson & Johnson). A curva da dose-resposta para o efeito hipoglicêmico foi traçada usando o valor da glicose do sangue para a linha y e usando a dose para a linha x (figura 34). Por sua vez, o parâmetro da relação dose-resposta para PB-105 e PB-106 (E_{min} , E_{max} e ED_{50}) foi calculado usando o software de Graphpad Prizm. E_{min} para a injeção do polus de PB-105 e PB-106 foi respectivamente de

8,3 ± 0,2 e 8,4 ± 0,3 mmol/L; e E_{max} foi respectivamente 6,0 ± 0,3 e 5,5 ± 0,6 mmol/L (a eficiência hipoglicêmica máxima foi respectivamente 27,8% e 34,5%). O ED_{50} de PB-105 e de PB-106 foi respectivamente 1,2 e 3,3 µg/kg. A análise posterior indicou que o Log ED_{50} de PB-105 e PB-106 foram respectivamente 0,07 ± 1,2 e 0,5 ± 0,2 (PB-106 vs. PB-105, $P > 0.05$). O resultado experimental indicou que os conjugados PEGuilados (PEG20000) de PB-105 (PB-106) não tiveram significativamente nenhuma diferença com o PB-105 em relação ao efeito hipoglicêmico (incluindo E_{max} e ED_{50}).

Exemplo 19. Experimento da relação tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico de PB-105, de PB-111 e do conjugado PEGuilado (PB-106 e PB-112) em camundongos normais

Camundongos masculinos Kunming (o peso corporal era 24-30 g) foram fornecidos. Os camundongos não jejuaram para o alimento ou para a água antes do experimento. Foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com seis camundongos em cada grupo. PB-105 (10 µg/kg), conjugado PEGuilado (PEG20000) de PB-105 (PB-106) (10 µg/kg), PB-111 (10 µg/kg) e conjugado PEGuilado (PEG20000) de PB-111 (PB-112) (10 µg/kg) foram injetados subcutaneamente. PB-111 era derivado de PB-105 onde a cisteína na posição 39 do C-terminal liga-se a tirosina. Em 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 48 horas após a injeção, amostragem do sangue na ponta da cauda foi realizada. A glicose do sangue foi determinada usando o medidor de glicose de sangue OneTouch e as tiras de teste acompanharam U.S. Johnson & Johnson). A curva do tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico foi traçada usando o valor da glicose do sangue em diferentes pontos de tempo para a linha y e usando pontos de tempo para a linha x, para calcular a meia-vida biológica e o efeito hipoglicêmico máximo do conjugado de PB-105, PB-111 e do PEGuilado destes. Os resultados são mostrados na figura 35, PB-105, PB-106, PB-111 e PB-112 reduziram aleatoriamente a glicose do sangue nos camundongos de uma maneira de tempo-dependência. A meia-vida biológica de PB-105 e PB-111 é respectivamente de 4,6 horas e 6,0 horas, e o efeito hipoglicêmico máximo é respectivamente 44,7% e 36,4%. A meia-vida biológica de PB-106 e PB-112 é respectivamente de 19,6 horas e 21,7 horas, e o do efeito hipoglicêmico máximo é respectivamente 37,3% e 34,9%. Os resultados indicaram que a tirosina adicionado na posição 39 do C-terminal não teve nenhum efeito na atividade do efeito hipoglicêmico e da meia-vida biológica do conjugado de PB-105 e do PEGuilado destes (PB-106).

Exemplo 20. Experimento da relação tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico de PB-101 e das variantes PB-105, PB-111 e PB-113 assim como conjugados PEGuilados PB-106, PB-112 e PB-114 em camundongos com diabetes STZ

Os camundongos foram jejuados por 14 horas antes que a diabetes fosse induzida. A amostra de sangue foi registrada através do sangramento da ponta da cauda a fim de

determinar o valor do branco da glicose do sangue. STZ então, recentemente preparado (estreptozotocina) (120 mg/10 ml/kg, preparado recentemente, dissolvidos na solução de nitrato 0,1 M, pH 4,5) foi injetada subcutaneamente. A glicose do sangue foi determinada após 3 dias. A glicose do sangue aleatória dos camundongos cuja que estava acima de 16,7 mmol/L foram considerados como camundongos em que a diabetes foi induzida com sucesso. Os camundongos não jejuaram para o alimento ou para a água antes do experimento. Foram distribuídos em 7 grupos com 4-6 camundongos em cada grupo. A glicose do sangue em 0 horas foi determinada através do sangramento da veia da cauda. E o volume igual de PB-101 (10 µg/10ml/kg), PB-105 (10 µg/kg), PB-106 (10 µg/kg), PB-111 (10 µg/kg), PB-112 (10 µg/kg), PB-113 (10 µg/kg) e PB-114 (10 µg/kg) foram injetados subcutaneamente. PB-111 era derivado de PB-105 em que a cisteína na posição 39 do C-terminal liga-se a tirosina, PB-113 era derivado de PB-105 em que a glicina na posição 2 do N-terminal foi substituída pela D-alanina, e PB-114 era conjugado do PEGuilado (PEG40000) de PB-113. Em 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 48 horas após a injeção, amostragem do sangue foi realizada e a glicose do sangue foi determinada. A curva do tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico para PB-101, PB-105, PB-106, PB-111, PB-112, PB-113 e PB-114 foi traçada usando o valor da glicose do sangue usando diferentes pontos de tempo para a linha y e usando pontos de tempo para a linha x. A curva foi traçada usando GraphPad Prism 5 Demo software (Prism v5, Graphpad Software, Inc., San Diego, CA), e a meia-vida biológica ($t_{1/2}$) de PB-101, PB-105, PB-106, PB-111, PB-112, PB-113 e PB-114 foi calculada e comparada usando métodos de estatísticas matemáticas.

Como mostrado na Figura 36, o a injeção de polus de PB-101, PB-105, PB-106, PB-111, PB-112, PB-113 e PB-114 reduziu a glicose do sangue aleatória em camundongos com diabetes STZ induzida de uma maneira de dependência de tempo. As eficiências máximas foram respectivamente 47,5 %, 57,6 %, 69,8 %, 54,4 %, 59,7 %, 49,2 % e 17,9 % (simplesmente 38 % destes para PB-101). A meia-vida biológica de PB-101, PB-105, PB-106, PB-111, PB-112 e PB-113 foi respectivamente 5,5; 5,5; 21;8; 5;0; 20,3 e 5,9 horas, e a meia-vida biológica de PB-114 não pode ser calculado devido ao efeito hipoglicêmico. Os resultados experimentais indicaram que a tirosina adicionado na posição 39 do C-terminal ou da substituição da glicina pela D-alanina na posição 2 no N-terminal não reduziu a atividade anti-hiperglicêmica de PB-105, Peguilação (PEG20000) não reduziu a atividade de PB-105 e de derivados destes, mas a Peguilação (PEG40000) reduziu significativamente a atividade de PB-105 e de derivados destes.

Exemplo 21. Experimento da relação tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico de quantidades equivalentes de PB-105 e PB-106, PB-119 e PB-120

Camundongos masculinos Kunming (o peso corporal era 24-30 g) foram fornecidos. Os camundongos não jejuaram para o alimento ou para a água antes do experimento.

Foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com seis camundongos em cada grupo. Conjugado de PB-105 (10 µg/kg), PB-105 PEGuilado (PEG20000) (PB-106) (10 µg/kg), conjugado de PB-105 PEGuilado (PEG23000) (PB-119) (10 µg/kg) e conjugado de PB-105 PEGuilado(PEG27000) (PB-120) (10 µg/kg) foram injetados subcutaneamente. Em 5 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 48 horas após a injeção, amostragem do sangue na ponta da cauda foi realizados. A glicose do sangue foi determinada usando o medidor de glicose do sangue OneTouch e as tiras de teste acompanhados U.S. Johnson & Johnson). A curva de tempo-resposta para o efeito hipoglicêmico foi traçada usando o valor da glicose do sangue em diferentes pontos de tempo para a linha y e usando pontos de tempo para a linha x, para 10 calcular a meia-vida biológica e o efeito hipoglicêmico máximo do conjugado de PB-105 e do PEGuilado deste. Os resultados são mostrados na figura 37, PB-105, PB-106, PB-119 e PB-120 reduziram a glicose do sangue aleatória nos camundongos em uma maneira de tempo-dependência. A meia-vida biológica deles foi respectivamente 6,0; 21,7; 24,1 e 26,1 horas, e a meia-vida biológica aumentou com o aumento do peso molecular de PEG. O tempo do 15 efeito hipoglicêmico máximo foi respectivamente de aproximadamente 1 hora (PB-105) e 4 horas (PB-106, PB-119 e PB-120). Os valores máximos do efeito hipoglicêmico foram respectivamente 35,0%, 50,9%, 48,2% e 42,2% (figura 37A). Como calculado como a área de efeito-tempo hipoglicêmico, PB-106, PB-119 e PB-120 todos aumentaram significativamente o efeito hipoglicêmico de PB-105 (aumento em 3-4 vezes). E o efeito 20 acumulado aumentou com o aumento do peso molecular do PEG (figura 37B). Os resultados experimentais indicaram que a Peguilação não reduziu a atividade hipoglicêmica de PB-105, e prolongaram significativamente o período do efeito hipoglicêmico e aumentaram o efeito hipoglicêmico acumulado quando o peso molecular estava entre 20-27 kDa. Como considerado aqui, quando o peso molecular do PEG é de 20-27 kDa, os 25 conjugados das variantes de Exendina de acordo com a presente invenção, PB-106, PB-119 e PB-120, fornecerem um valor do efeito hipoglicêmico máximo mais elevado, comparado com o PB-105 não conjugado. Além disso, estes conjugados têm um período significativamente mais longo do efeito hipoglicêmico e o efeito hipoglicêmico acumulado aumenta com o aumento do peso molecular do PEG, de maneira a fornecer um efeito 30 hipoglicêmico combinado melhor.

Exemplo 22. Teste de vômito do pombo para PB-101, PB-105, PB-106 e PB-120

Os pombos saudáveis, macho ou fêmea, foram distribuídos em 7 grupos com 4-8 pombos em cada grupo. PB-101 (3 mg/kg, N = 4 ou 6 mg/kg, N = 8), PB-105 (3 mg/kg, N = 4 ou 6 mg/kg, N = 8), PB-106 (3 mg/kg, N = 4 ou 6 mg/kg, N = 8) e PB-120 (6 mg/kg, N = 8) 35 foram separadamente subcuteamente injetados. Os tempos de vômito e de latência para o vômito (o período da dose ao primeiro vômito) foram observados e registrados em 24 horas após dosagem usando o sistema de monitoramento eletrônico. Os tempos de vômito foram

definidos como uma vez se coçar o pescoço, abertura da boca, encolhimento dos ombros, contrações abdominais, e finalmente acalmar ou o fim do vômito. Os experimentos precedentes indicaram que a resposta do vômito não foi induzida pela situação normal tal como nenhuma dose nos pombos, e a dose de PB-101 (3 e 6 mg/kg) e de PB-105 (3 e 6 mg/kg) induziu um vômito significativo em uma maneira de dose-dependência. Nos grupos PB-106 (3 mg/kg e 6 mg/kg) e PB-120 (6 mg/kg), a latência do vômito foram prolongados significativamente (prolongado em aproximadamente 5-18 vezes, veja a figura 38A), e os tempos de vômito foram reduzidos significativamente (reduzido por aproximadamente 50-70%, veja a figura 38B), comparado com os grupos de dose correspondente de PB-101, PB-105. Para a dose de 6 mg/kg, a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O resultado indica que a Peguilação reduziu significativamente a resposta de vômito para a Exendina e as variantes desta.

Exemplo 23. Reação sistemática alérgica e efeitos no peso corporal induzido por PB-101, PB-105 e PB-106

44 cobaias masculinas saudáveis foram fornecidas, e o peso de corpo de cada cobaia era aproximadamente 300 g. Elas foram distribuídas em 5 grupos, isto é salino (N = 10), PB-101 (N = 10), PB-105 (N = 10), PB-106 (N = 10) e o grupo de albumina (N = 4). Salino (1 ml/Kg) PB-101 (100 µg/Kg), PB-105 (100 µg/Kg), PB-106 (100 µg/Kg) e ovalbumina de galinha (80 mg/Kg) foram respectivamente injetados subcutaneamente dia sim dia não por três vezes consecutivas. No dia 14 depois da última injeção, a quantidade de estimulação do salino (1 ml/Kg) PB-101 (300 µg/Kg), PB-105 (300 µg/Kg), PB-106 (300 µg/Kg) e albumina (240 mg/Kg) respectivamente foram injetados através da veia do dedo. Imediatamente depois da injeção, a resposta dos animais foi observada por 0-3 hrs depois do estímulo. Os sintomas para reação alérgica em animais foram registrados como mostrado na Tabela 2, e avaliado como mostrado na Tabela 3 (semi-quantitativo).

Tabela 2. Os sintomas para a reação alérgica nos animais

0 Normal	7 respirações curtas	14 andar regular
1 sem descanso	8 urinas	15 pulo
2 pouco pêlo	9 defecações	16 repouso
3 tremendo	10 lágrimas	17 cramps
4 nariz coçando	11 dificuldade respiratória	18 rotação
5 espirros	12 ofegante	19 respiração forte
6 tosse	13 purpura	20 morto

Tabela 3. Avaliação de graus da reação sistemática alérgica em animais e padrões semi-quantitativos

0	-	0	reação alérgica negativa
1-4 sintomas	+	1	reação alérgica fraco negativa
5-10 sintomas	++	2	reação alérgica positiva
11-19 sintomas	+++	3	forte reação alérgica positiva
20	++++	4	Muito forte reação alérgica positiva

A curva foi traçada usando pontos de tempo para a linha x e os graus de resposta alérgica (semiquantitativa) para a linha y, segundo as indicações da figura 39. Nenhuma reação alérgica foi encontrada nas cobaias do grupo de controle salino, isto é, da reação alérgica negativa. As cobaias no grupo da albumina morreram imediatamente depois da estimulação (<2min), isto é, reação alérgica positiva muito forte. As cobaias nos grupos PB-101 e PB-105 tiveram a resposta alérgica, isto é, reação alérgica positiva. PB-101 e PB-105 eram polipeptídeos contendo 39 resíduos de aminoácidos, e puderam induzir a produção do anticorpo *in vivo* após a dose crônica (Buse et al. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27 : 2628-2635.). E, PB-105 PEGuilado (PEG20000) PB-106 conjugado conduziram à reação alérgica negativa fraca nas cobaias. Este resultado indicou que a PEGuilação (PB-106) pode reduzir significativamente a imunogenicidade de PB-101 ou PB-105 e reação alérgica.

A curva traçada usando pontos de tempo para a linha x e o peso corporal das cobaias para a linha y (figura 40) mostrou que o peso corporal das cobaias no grupo salino durante a sensibilização aumentou continuamente (o peso corporal aumentou em aproximadamente 38% durante 18 dias do experimento). O peso corporal não diminuiu 4 dias após duas doses sucessiva de albumina, comparada com o grupo salino. Entretanto, o peso corporal das cobaias diminuiu respectivamente em aproximadamente 8% e 11% ($p < 0,05$), comparado com a dosagem de PB-101 e PB-105. O peso corporal das cobaias nos grupos PB-101, PB-105 e PB-106 recuperaram 12 dias após cessar a dosagem, que foi comparável com o do grupo salino.

Exemplo 24. Efeito de PB-105, de PB-106, de PB-119 e de PB-120 no peso corporal do rato e na quantidade de ingestão de alimentos

24 ratos saudáveis masculinos SD foram fornecidos, e o peso corporal destes era de aproximadamente 200 G. Os ratos foram distribuídos em 5 grupos: grupo salino (1 ml/kg, N = 4), PB-105 (100 µg/kg, N = 5), PB-106 (100 µg/kg, N = 5), PB-119 (100 µg/kg, N = 5) e PB-120 (100 µg/kg, N = 5). Solução salina e drogas foram injetados respectivamente subcuneamente em dias alternados para cada um por três vezes sucessivas. O peso

corporal e a mudança da ingestão de alimentos nos camundongos foram observados diariamente.

A curva traçada usando pontos de tempo para a linha x e o peso corporal dos camundongos para a linha y (figura 41A) mostrou que o peso corporal dos camundongos no grupo salino aumentou continuamente durante a dosagem (o peso corporal aumentou em 33,4% durante 9 dias do experimento). O peso corporal (por peso corporal-tempo AUC como um indicador) diminuiu em aproximadamente 5,3% ($p < 0,05$) 9 dias após três sucessivas dosagens de PB-105 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), comparado com o grupo salino. Dosagem de uma quantidade equivalente de PB-106, de PB-119 e de PB-120 conduziu a uma maior redução de peso corporal do que PB-105. O peso corporal (por peso corporal-tempo AUC como um indicador) diminuiu respectivamente em aproximadamente 7%, 8% e 8% ($p < 0,05$) no caso da dosagem de PB-106, PB-119 e PB-120, comparado com a dosagem de PB-105.

A curva traçada usando pontos de tempo para a linha x e uma quantidade da ingestão de alimentos por camundongos para a linha y (figura 41B) mostrou que a quantidade da ingestão de alimentos por camundongos no grupo salino permaneceu substancialmente durante a dosagem. A quantidade da ingestão de alimentos (em quantidade-tempo AUC da ingestão de alimentos como um indicador) diminuiu em aproximadamente 16% após três doses sucessivas de PB-105 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), comparada com o grupo salino. Dosagem de uma quantidade equivalente de PB-106, PB-119 e PB-120 conduziu a uma maior redução da ingestão de alimentos do que PB-105.

É bem conhecido que a Exenatida pode reduzir o peso corporal em pacientes obesos e induzir a resposta de náusea e vômito, onde os mecanismos de sua ação é associado com a inibição do centro de alimentação do sistema nervoso central e ativação do centro de vômito (Larsen. Mechanisms behind GLP-1 induced weight loss, Br J Diabetes Vasc Dis 2008; 8 (Suppl 2): S34—S41; Schick et al. Glucagonlike peptide 1 (7-36)-amide acts at lateral and medial hypothalamic sites to suppress feeding in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003;284:R1427–35). Entretanto, os conjugados de Exendina ou de variantes desta são difíceis de passar através da barreira sangue-cérebro devido ao peso molecular ampliado, e assim podem reduzir a resposta de vômito induzida por PB-101 (veja o exemplo 22). Consequentemente, antes do começo deste estudo, o depositante esperou que essa Exendina ou variantes destas reduziram o efeito da Exendina na redução da ingestão de alimentos e do peso corporal que foi intermediado pelo sistema nervoso central. Entretanto, o depositante descobriu surpreendentemente que os conjugados do PEG de Exendina ou sua variante tiveram o efeito significativamente aumentado na redução da ingestão de alimentos e do peso corporal, embora a Exendina do tipo selvagem e a variante de Exendina não conjugada ambas reduziram a ingestão alimentos e o peso corporal.

Exemplo 25. Experimentos Farmacocinéticos de PB-101 e PB-105

Ratos SD masculinos (peso corporal: 250-300 g, comprados do Shanghai Lab Animal Center, Chinese Science Academy) foram anestesiados aplicando hidrato de cloral 30 % (300 mg/kg, i.p.). A cateterização da artéria femoral e da veia foi realizada incisando na borda direita superior da grande virilha e dissecando a artéria femoral e veia (tubo de polietileno PE50, U.S. Becton Dickinson Corporation). O cateter da artéria direita foi usado para a amostragem de sangue, e o cateter da veia direita foi usado para dosagem. O tubo PE-50 foi conduzido do pescoço para trás com subcutanea dorsal. O cateter foi preenchido com a solução de heparina (200 U/ml), e a incisão foi suturada. Após a operação, os ratos foram colocados em gaiolas separadas, e recuperados por mais de 12 horas. Os ratos com cateteres estavam livres para movimentos e dietas nas gaiolas. Os ratos foram distribuídos no grupo PB-101 e no grupo PB-105 (3-6 ratos em cada grupo). 5 µg/kg do agente foi aplicado pela injeção de polus na veia femoral direita. As amostras de sangue foram tomadas respectivamente em 0.08, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 horas após a dosagem. As amostras de sangue foram colocadas no tubo Eppendorf e centrifugadas para a preparação do plasma (5000 RPM, 5 min), e armazenadas a -20 °C até o uso. A concentração de drogas nas amostras foi determinada pelo kit de Exenatida a EIA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. USA) após a preparação completa de cada grupo de amostras do plasma. Curvas de droga-tempo de PB-101 e de PB-105 foram traçadas usando a concentração do plasma para a linha y e o tempo para a linha x. Os resultados mostraram que PB-105 e PB-101 tiveram a distribuição e o afastamento similares nos ratos.

A análise estatística do parâmetro do método não-compartmental foi realizada empregando o software Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), para calcular parâmetros farmacocinéticos de PB-101 e PB-105 (C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$, MRT, CL and V_{ss} , etc.). Os resultados foram mostrados na tabela 4. A meia-vida plasmática de PB-101 e de PB-105 foi respectivamente $4,8 \pm 0,7$ e $4,9 \pm 1,4$ horas (PB-105 vs PB-101, $P > 0,05$). E a área sob a curva de curvas de droga-tempo foi respectivamente $45,4 \pm 1,6$ e $47,9 \pm 19,0$ ng*hr/ml (PB-105 vs PB-101, $P > 0,05$). Os resultados experimentais mostraram que PB-105 e PB-101 tiveram propriedades farmacocinéticas similares.

Tabela 4. Parâmetros farmacocinéticos de PB-101 e PB-105 (3-6 ratos em cada grupo).

	N	C_{max} (ng/ml)	AUC_{0-t} (ng*h/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/ml)
PB-101	3	33.0±2.0	45.4±1.6	85.2±4.4
PB-105	6	36.8±10.6	47.9±19.0	103.8±51.1

	T1/2 (h)	MRT (h)	CL (ml/(h*kg))	Vss (ml/kg)
PB-101	4.8±0.7	6.9±0.7	59.0±3.1	403.2±21.3
PB-105	4.9±1.4	7.2±2.2	117.7±58.5	563.8±186.1

Exemplo 26. Experimento da farmacocinética do conjugado de PB-105 e do PEGuilado deste

Ratos masculinos SD (peso corporal: 250-300 g, comprado do Shanghai Lab Animal Center, Chinese Science Academy) foram anestesiados aplicando o hidrato de cloral 30% (300 mg/kg, i.p.). O cateterismo da artéria femoral e da veia foi realizado incisando na borda direita superior da grande virilha e dissecando a artéria femoral e veia (tubo do polietileno PE50, U.S. Becton Dickinson Corporation). Cateter da artéria direita foi usado para a amostragem do sangue, e o cateter da veia direita foi usado para dosagem. O tubo PE-50 foi conduzido do pescoço para trás com subcutanea dorsal. O cateter foi preenchido com a solução de heparina (200 U/ml), e a incisão foi suturada. Após a operação, os ratos foram colocados em gaiolas separadas, e recuperados por mais de 12 horas. Os ratos com cateteres estavam livres para movimentos e dietas nas gaiolas. Os ratos foram distribuídos em 6 grupos (3 ratos em cada grupo): PB-105, PB-110, PB-106, PB-107, PB-108 e PB-109. 5 µg/kg do agente foram aplicados pela injeção de polus na veia femoral direita, e 0,2 ml de sangue foram tomados em pontos diferentes de tempo. Para as primeiras 48 horas após a dosagem, a amostragem do sangue foi realizada usando o tubo PE50, e após 48 horas, a amostragem do sangue foi realizada pelo sangramento da veia da cauda. Especificamente, grupo PB-105 (0.08, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 horas após dosagem), grupo PB-110 (0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 horas após dosagem), grupo PB-106 (0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 horas após dosagem), grupo PB-107 (0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144 horas após dosagem), grupos PB-108 e PB-109 (0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 horas após dosagem). As amostras de sangue foram colocadas no tubo de Eppendorf e centrifugadas para a preparação do plasma (5000 RPM, 5 min), e armazenadas a -20 °C até o uso. A concentração de drogas nas amostras foi determinada pelo kit de Exenatida EIA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. USA) após a preparação completa de cada grupo de amostras do plasma. As curvas de droga-tempo de conjugado PEGuilado foram traçadas usando a concentração do plasma na linha y e o tempo para a linha x. Os resultados mostraram que os conjugados de PB-105 e do PEGuilado exibiram a distribuição rápida e o afastamento lento (veja figura 43).

A análise estatística do parâmetro do método não-compartmental foi realizada empregando o software Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), para calcular

parâmetros farmacofinéticos de conjugado de PB-105 e de PEGuilados destes (C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$, MRT, CL and V_{ss} , etc.). Os resultados foram mostrados na tabela 5. A meia-vida plasmática de PB-105 foi $2,9 \pm 0,1$ horas, e meia-vida plasmática do conjugado de PEGuilado foi aumentado com o aumento do peso molecular do PEG. A

5 área sob a curva da curva de droga-tempo de PB-105 foi $18,2 \pm 1,9$ ng*hr/ml, e a área sob a curva da curva de droga-tempo do conjugado PEGuilado foi aumentada com o aumento do peso molecular do PEG. As figuras 44A e 44B mostraram respectivamente a relação entre o peso molecular do PEG e o conjugado PEGuilado e a meia-vida plasmática, área sob a curva da curva de droga-tempo.

10 Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos de PB-105 e de conjugados PEGuilados destes (3 ratos em cada grupo)

	C_{max} (ng/ml)	AUC_{0-t} (ng*hr/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng*hr/ml)	
PB-105	23.0 ± 2.8	18.2 ± 1.9	24.5 ± 2.2	
PB-110	76.1 ± 14.5	101.0 ± 25.8	165.5 ± 45.3	
PB-106	149.2 ± 5.7	942.5 ± 84.6	1146.0 ± 65.2	
PB-107	128.2 ± 15.5	1485.2 ± 123.0	1879.3 ± 82.1	
PB-108	148.1 ± 24.5	1780.7 ± 279.9	2202.5 ± 318.8	
PB-109	240.1 ± 20.9	5478.8 ± 654.3	7033.4 ± 861.6	
	$T_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	CL (ml/hr*kg)	V_{ss} (ml/kg)
PB-105	2.9 ± 0.1	4.1 ± 0.2	207.8 ± 20.9	846.3 ± 79.0
PB-110	6.1 ± 0.8	9.6 ± 1.0	37.5 ± 13.5	340.1 ± 92.9
PB-106	42.6 ± 8.1	47.3 ± 11.6	4.4 ± 0.3	209.0 ± 57.3
PB-107	70.5 ± 2.6	75.3 ± 9.5	2.7 ± 0.1	201.6 ± 27.3
PB-108	74.8 ± 4.5	90.2 ± 10.2	2.3 ± 0.3	193.6 ± 50.0
PB-109	103.6 ± 2.4	102.0 ± 6.8	0.7 ± 0.1	74.8 ± 10.4

As variantes de Exendina de acordo com a presente invenção melhoraram as propriedades farmacocinéticas, reduzem significativamente a glicose sanguínea, e apresentam atividades biológicas comparáveis ou melhores. Os conjugado das variantes de

15 Exendina que são sítio-especificamente acoplados aos polímeros através do tiolato nas cisteínas prolongam significativamente a meia-vida de variantes de Exendina e permanecem com a atividade biológica elevada.

A presente invenção foi ilustrada por exemplos específicos. Entretanto, um técnico no assunto pode compreender que a presente invenção não está limitada aos exemplos

20 específicos, e um técnico no assunto pode fazer alguma variação ou modificação no escopo da presente invenção sem sair do espírito e do escopo da presente invenção. Esta variação e modificação estão no escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado da variante de Exendina apresentando a atividade do agonista do receptor do GLP-1, **caracterizado** pelo fato que uma ou mais frações do polímero são conjugadas à variante de Exendina e particularmente ao resíduo de cisteína da variante de Exendina, e que uma ou mais frações de Exendina (apresentam)têm um peso molecular de 5 kDa a 40 kDa, preferencialmente de 20 kDa a 40 kDa, e mais preferencialmente de 20 kDa a 35 kDa.

2. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato que uma ou mais frações do polímero (apresentam)têm um peso molecular de 20 kDa a 30 kDa, por exemplo, de 21 kDa a 29 kDa, ou de 23 kDa a 27 kDa

3. Conjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato que a variante de Exendina apresenta uma sequência de aminoácido na qual um ou mais resíduos são substituídos pela cisteína, em comparação com a sequência do tipo selvagem da Exendina, preferencialmente a sequência do tipo selvagem da Exendina é selecionada do grupo que consiste de: sequência da Exendina-4 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 (SEQ ID NO: 1), sequência da Exendina-3 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 (SEQ ID NO: 2).

4. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado** pelo fato que a variante de Exendina apresenta uma substituição de cisteína no terminal C da variante da Exendina, preferencialmente apresenta uma substituição de cisteína nas posições correspondendo a Ser na posição 39 da SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO: 2.

5. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado** pelo fato que a variante de Exendina apresenta a sequência selecionada do grupo que consiste de:

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-Cys (SEQ ID NO: 3);

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-Cys-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 4);

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-Cys-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5);

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Cys-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 6);

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-Cys-Tyr (SEQ ID NO : 7); ou

His-dAla-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-Cys (SEQ ID NO: 8).

6. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado** pelo fato que uma ou mais frações de polímeros são cada uma independentemente polietilenoglicol.

7. Método para preparar o conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato que compreende contatar uma variante de Exendina com um polímero.

8. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato que compreende uma quantidade eficaz do conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e opcionalmente um veículo farmacêutico aceitável.

9. Uso do conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato que é para a produção de um medicamento para reduzir a glicose sanguínea.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato que o medicamento é utilizado no tratamento da diabetes, incluindo a diabetes tipo 1 e tipo 2, em particular a diabetes tipo 2.

11. Kit, **caracterizado** pelo fato que compreende o conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e instruções para o uso.

12. Uso de Exendina ou uma variante desta conjugada a uma ou mais frações do polímero, **caracterizado** pelo fato que é para a produção de um medicamento para a redução do peso corporal, onde uma ou mais frações do polímero são preferencialmente frações de polietilenoglicol.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato que o conjugado da Exendina ou a variante desta é conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

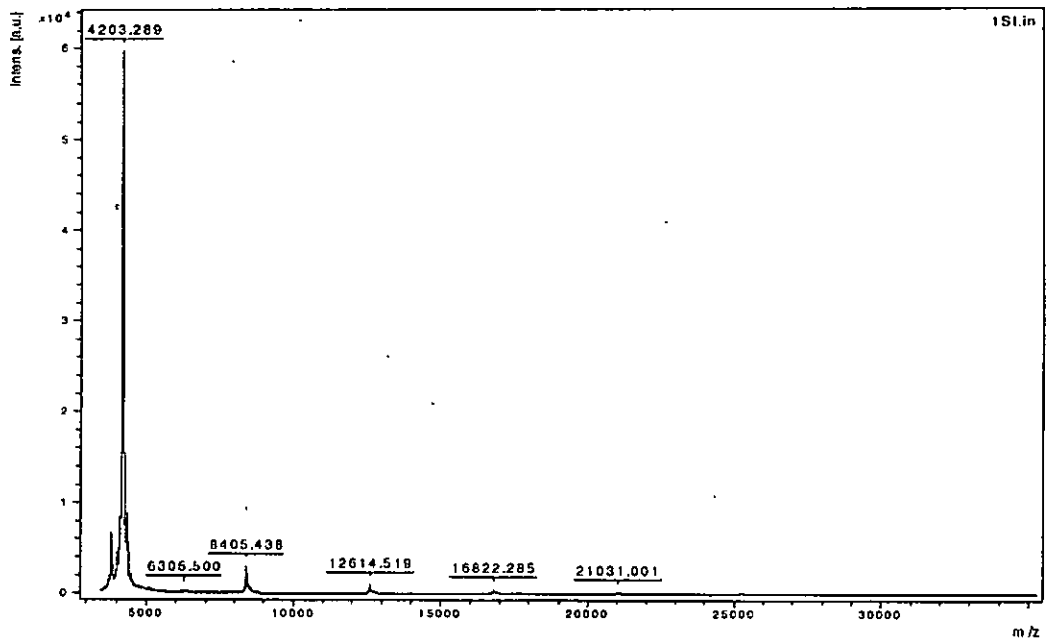


Fig. 1

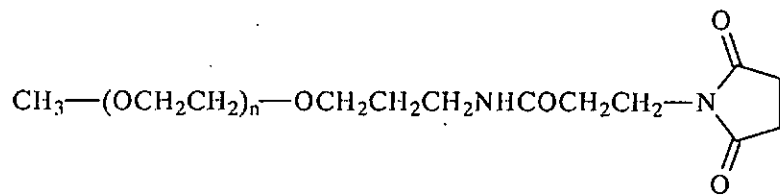


Fig. 2

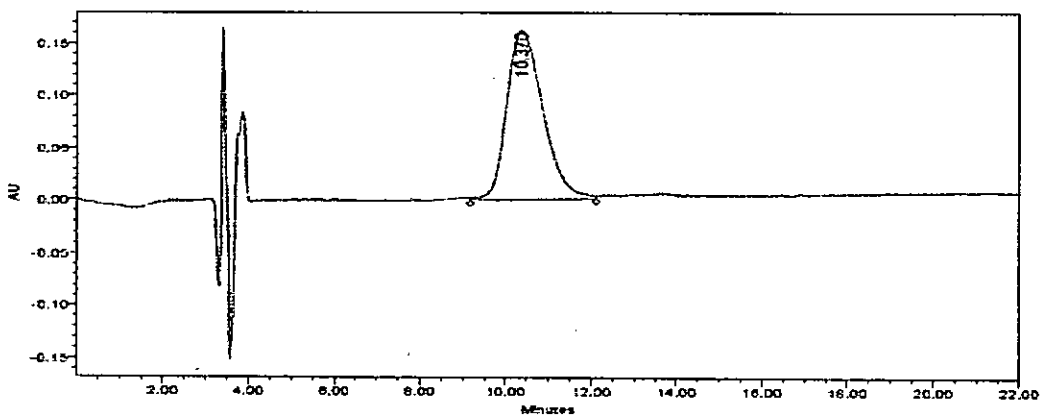


Fig. 3

Fig. 6

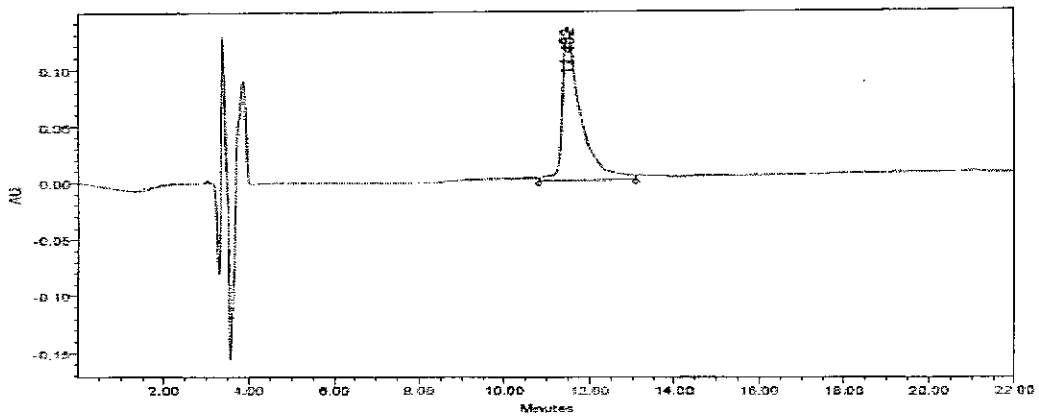


Fig. 7

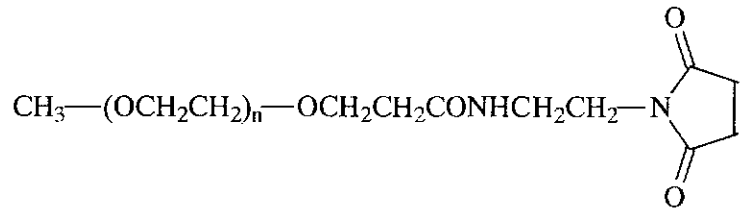


Fig. 8

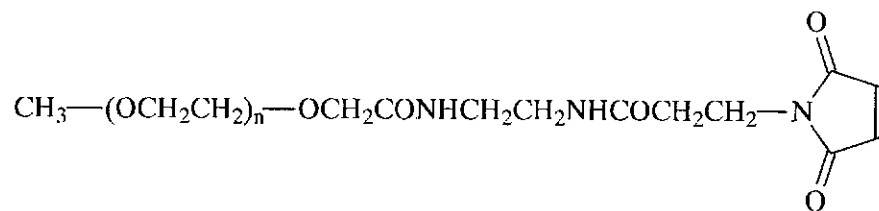


Fig. 9

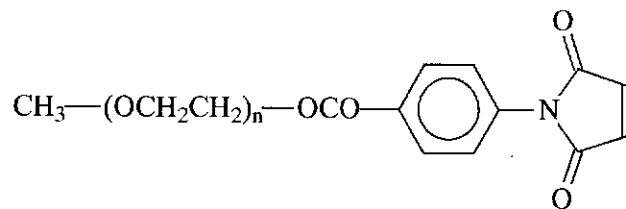


Fig. 10

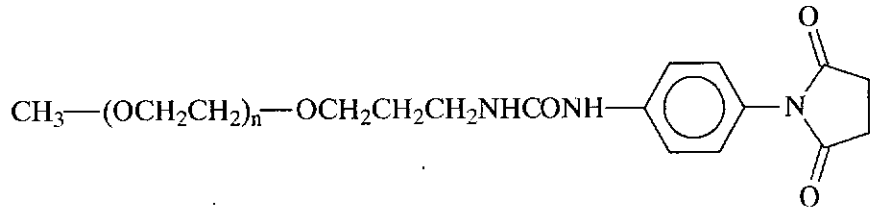


Fig. 11

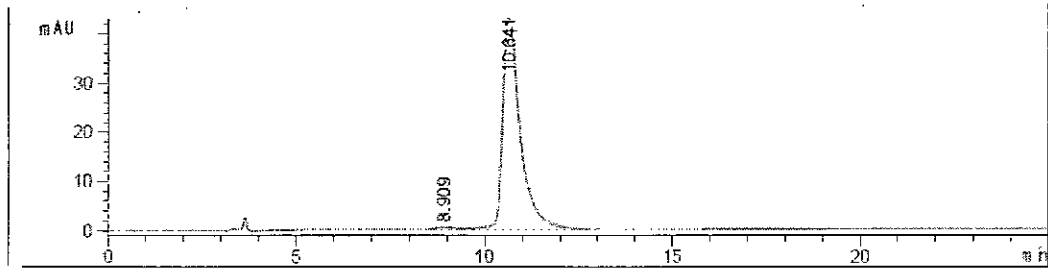


Fig. 12

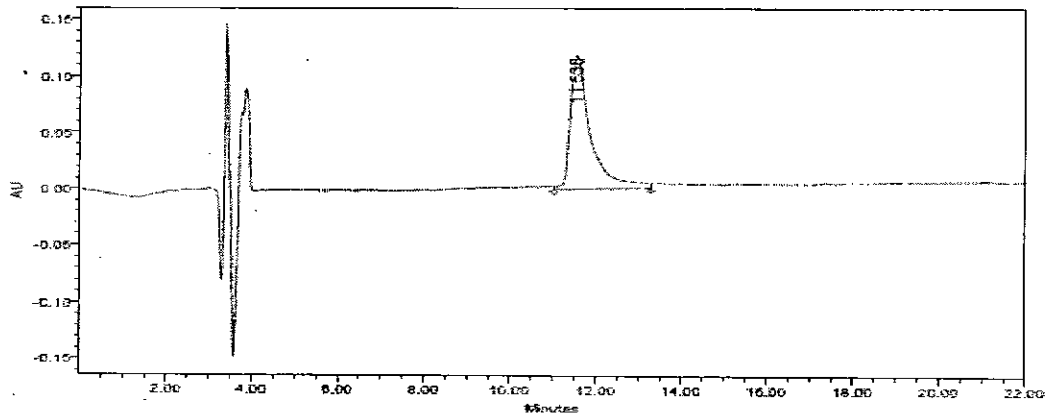


Fig. 13

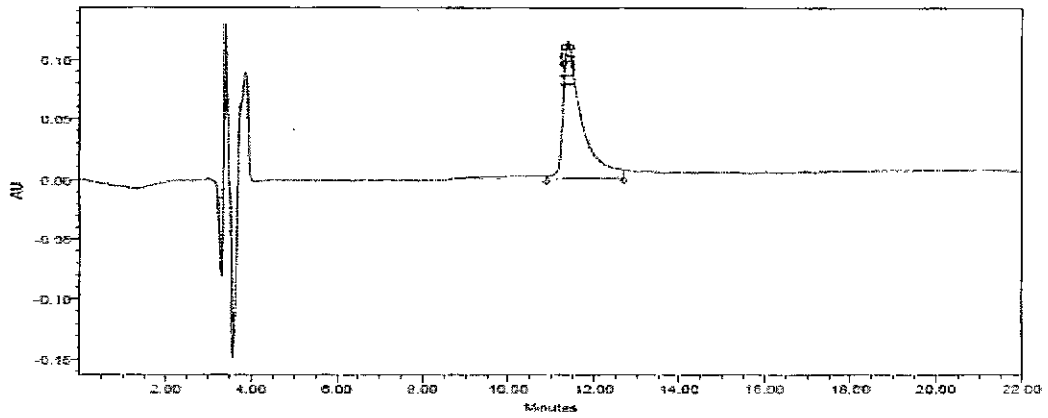


Fig. 14

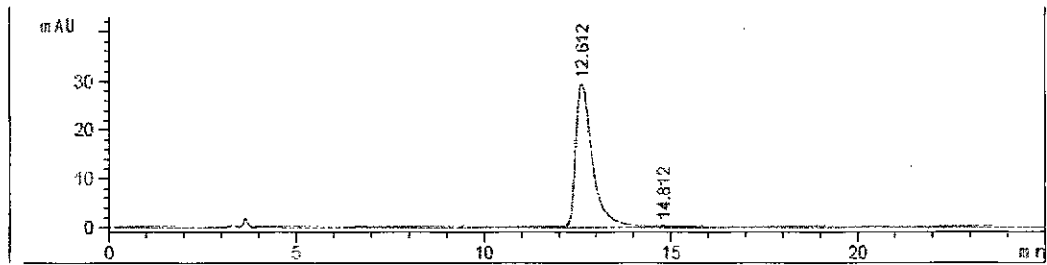


Fig. 15

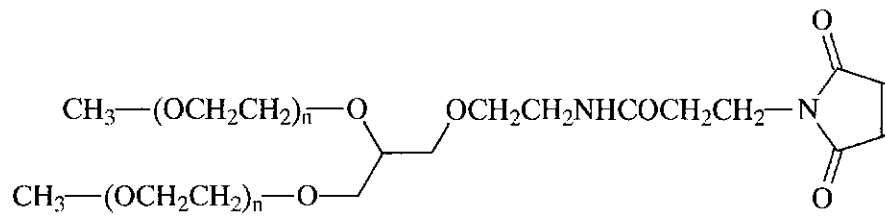


Fig. 16

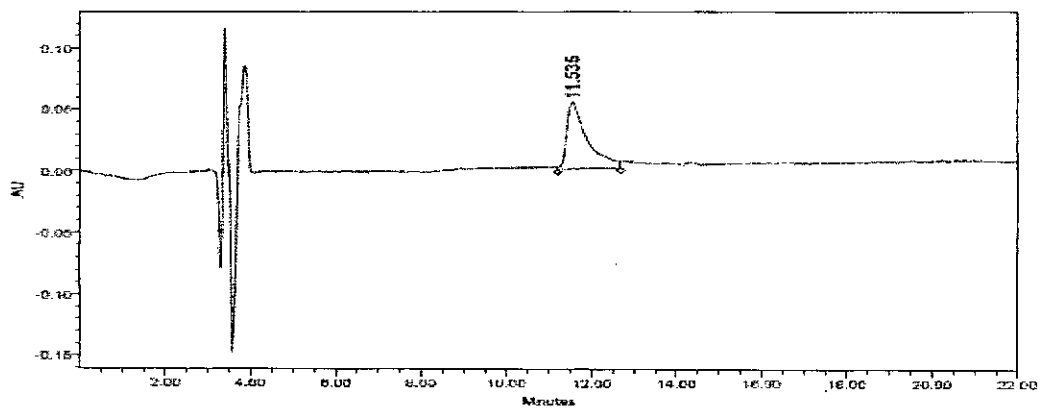


Fig. 17

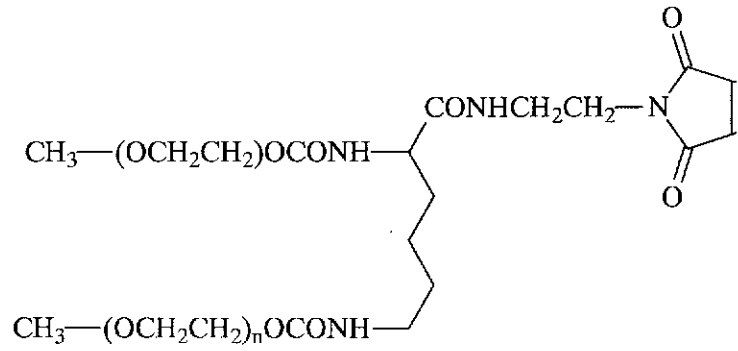


Fig. 18

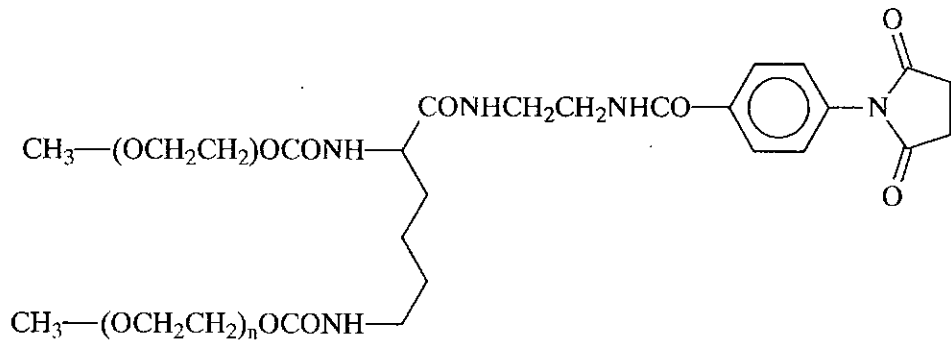


Fig. 19

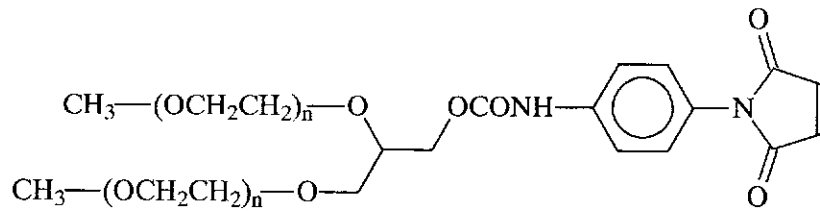


Fig. 20

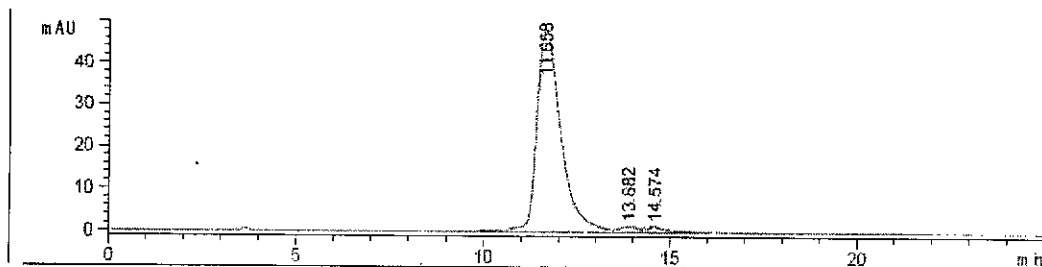


Fig. 21

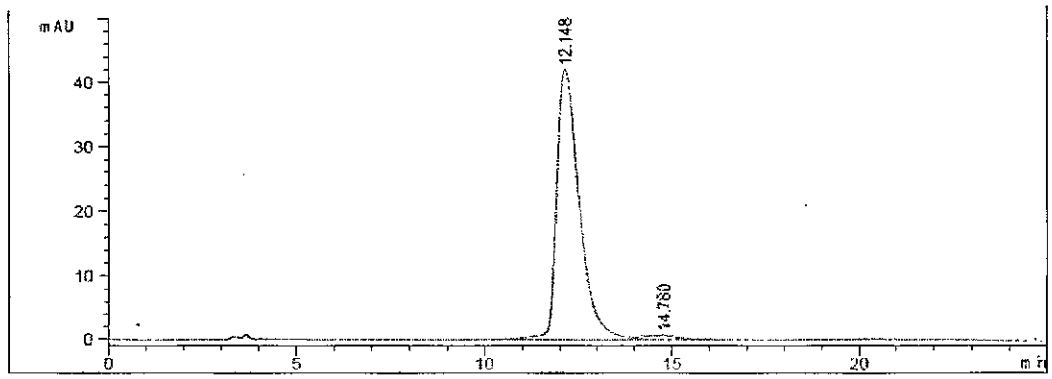


Fig. 22

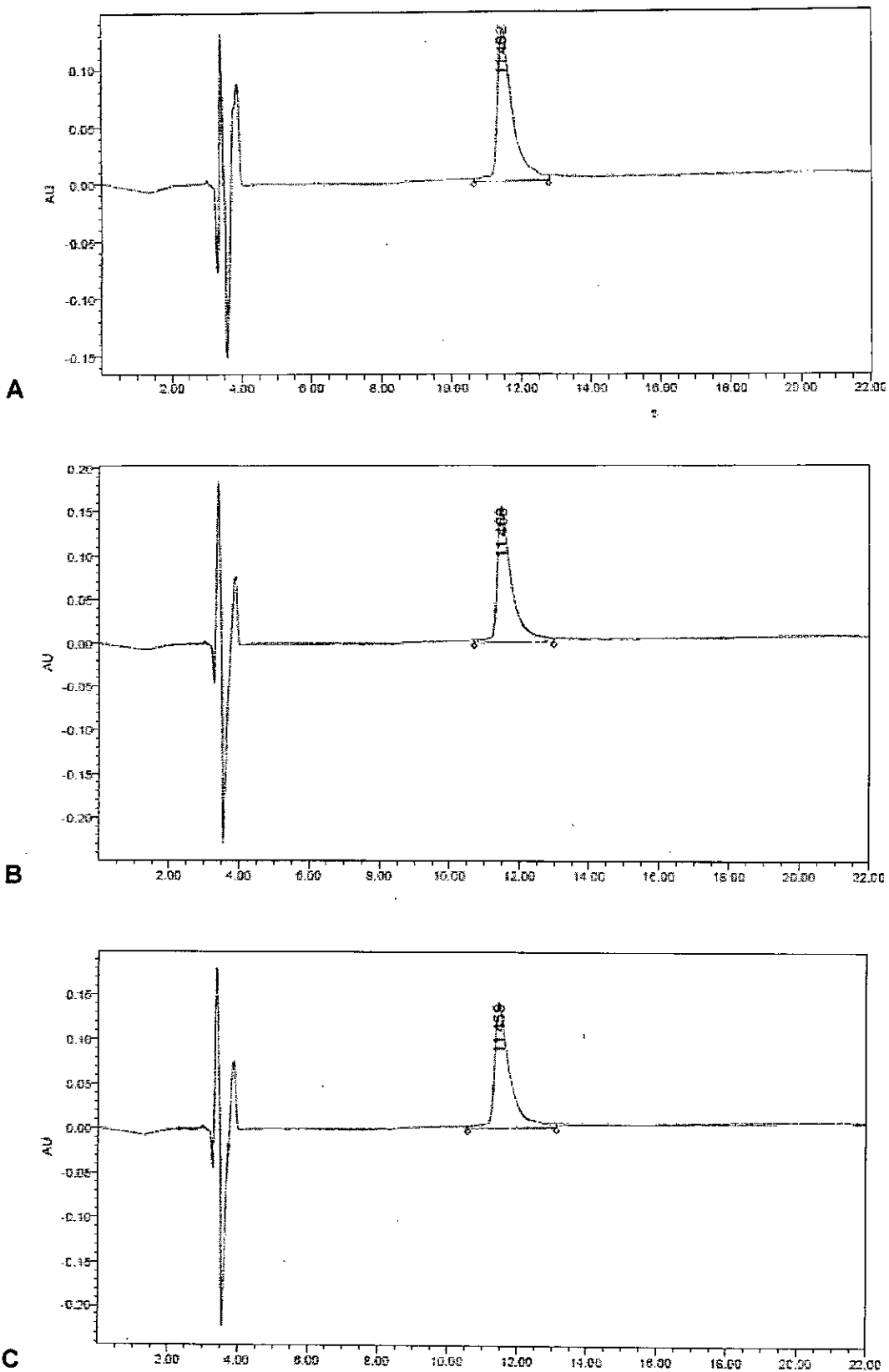


Fig. 23

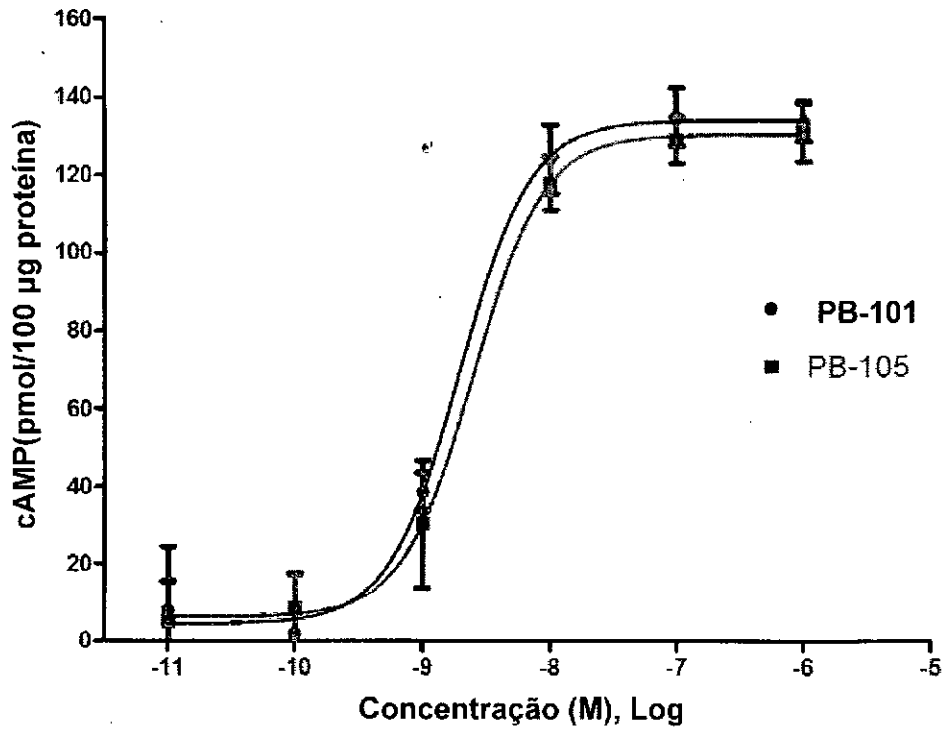


Fig. 24

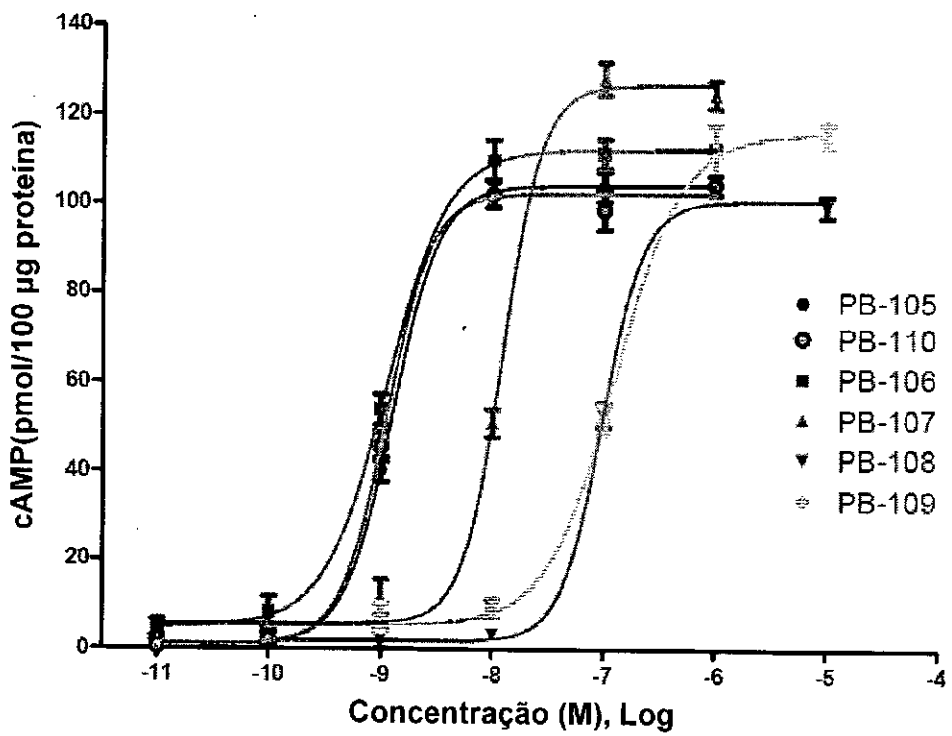


Fig. 25

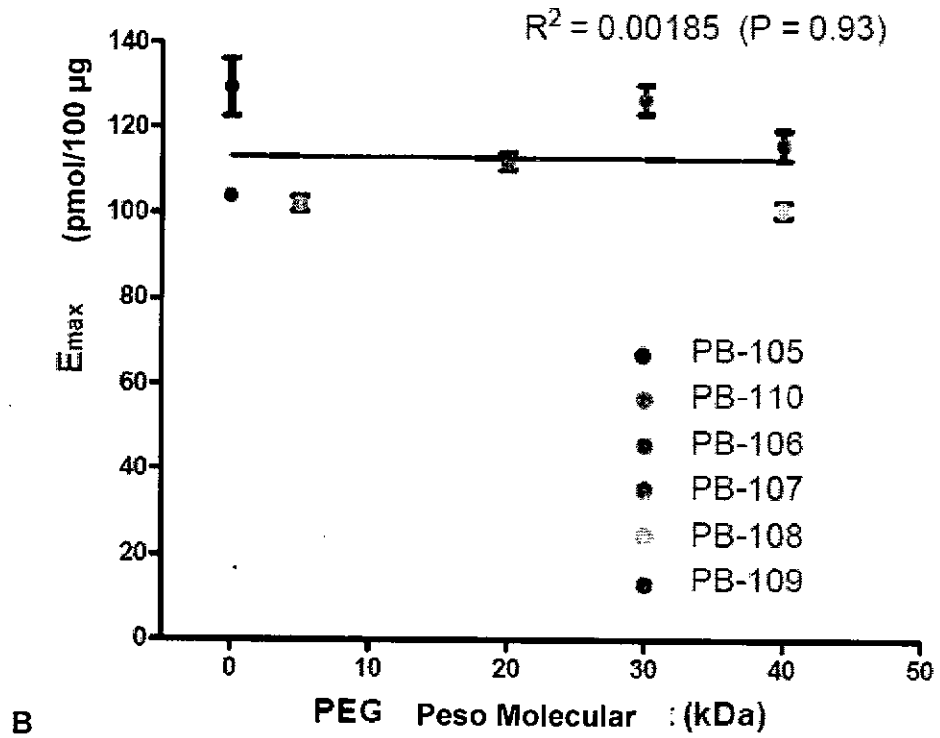
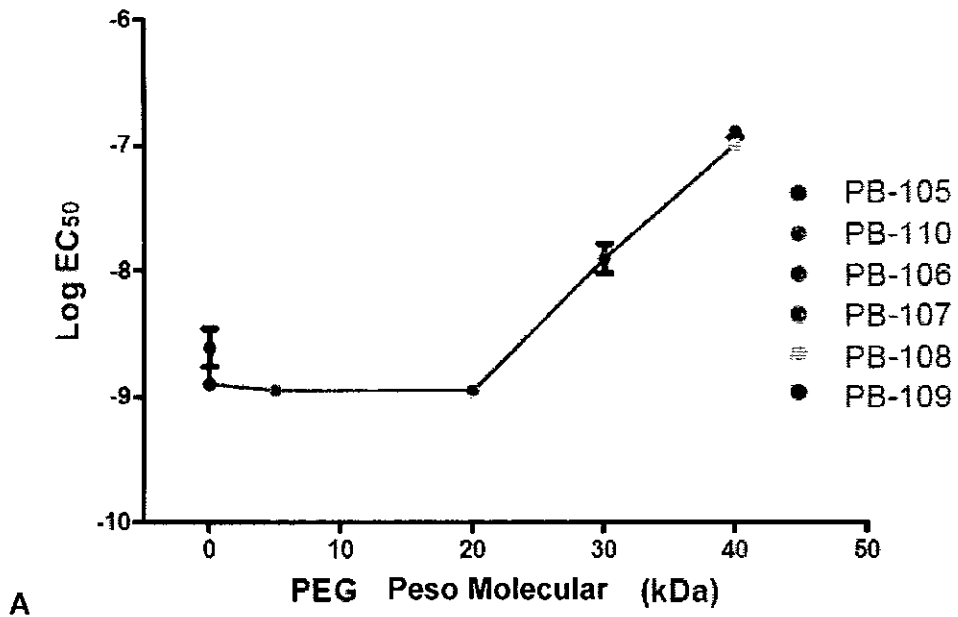


Fig. 26

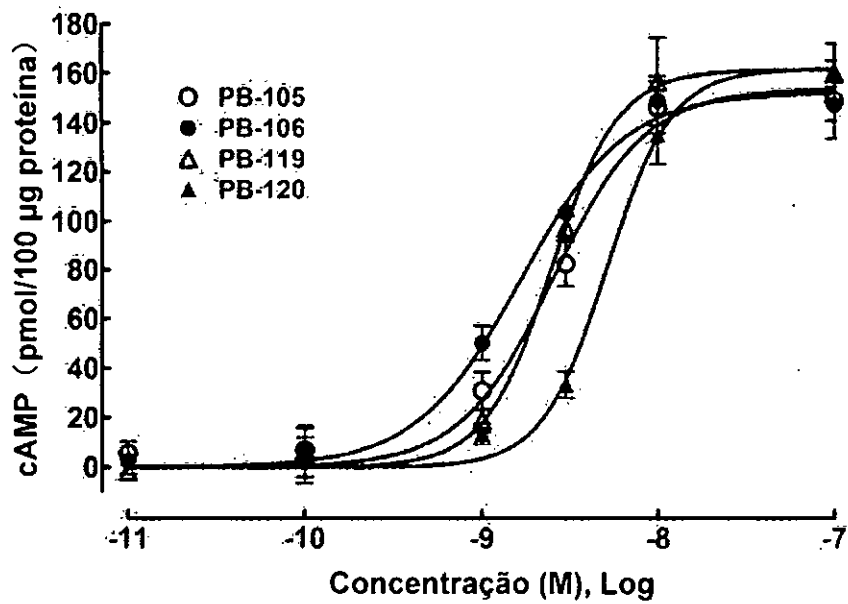


Fig. 27

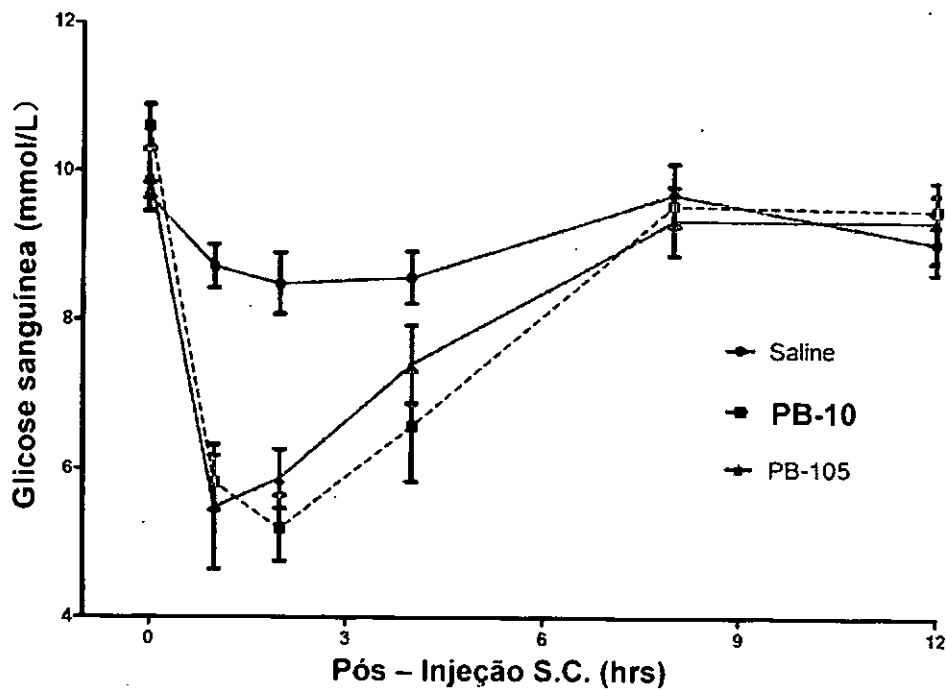


Fig. 28

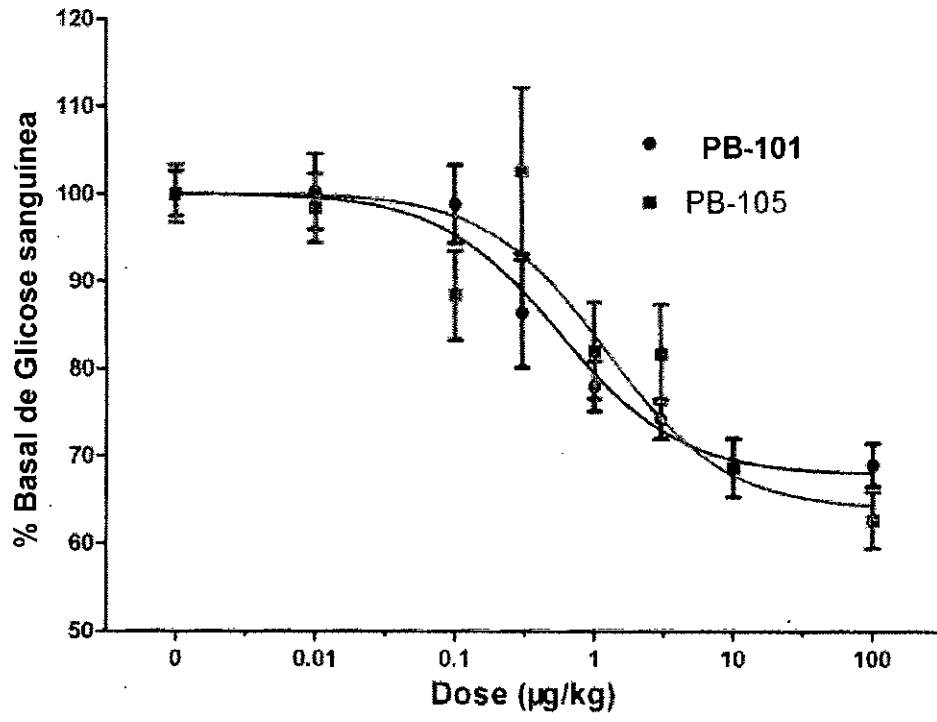


Fig. 29

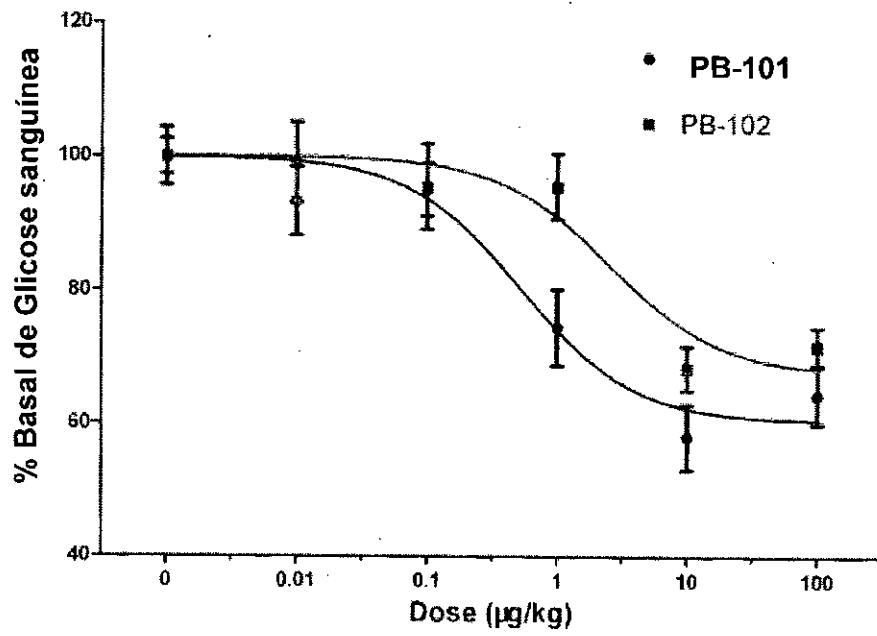


Fig. 30

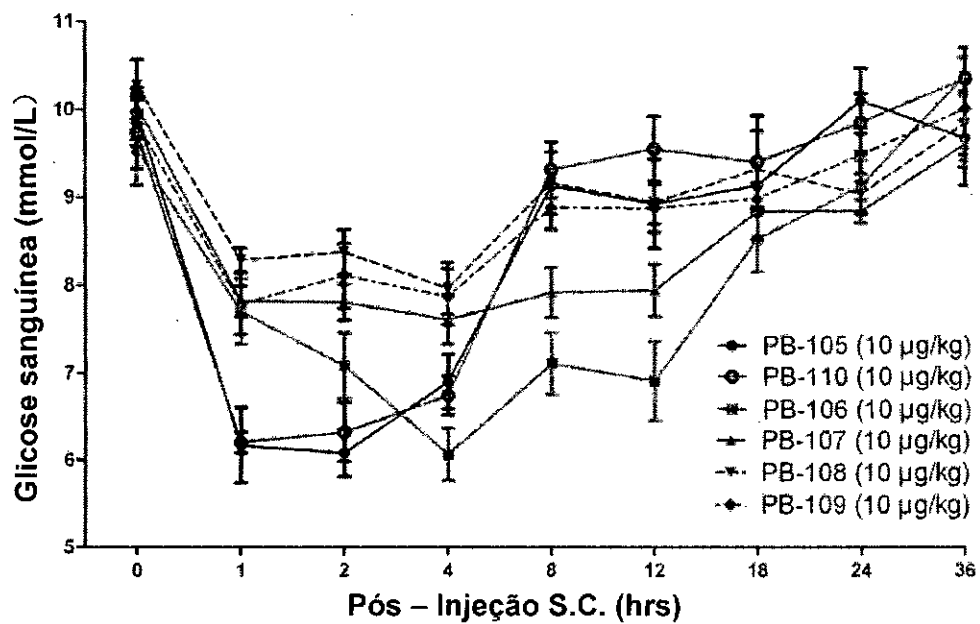
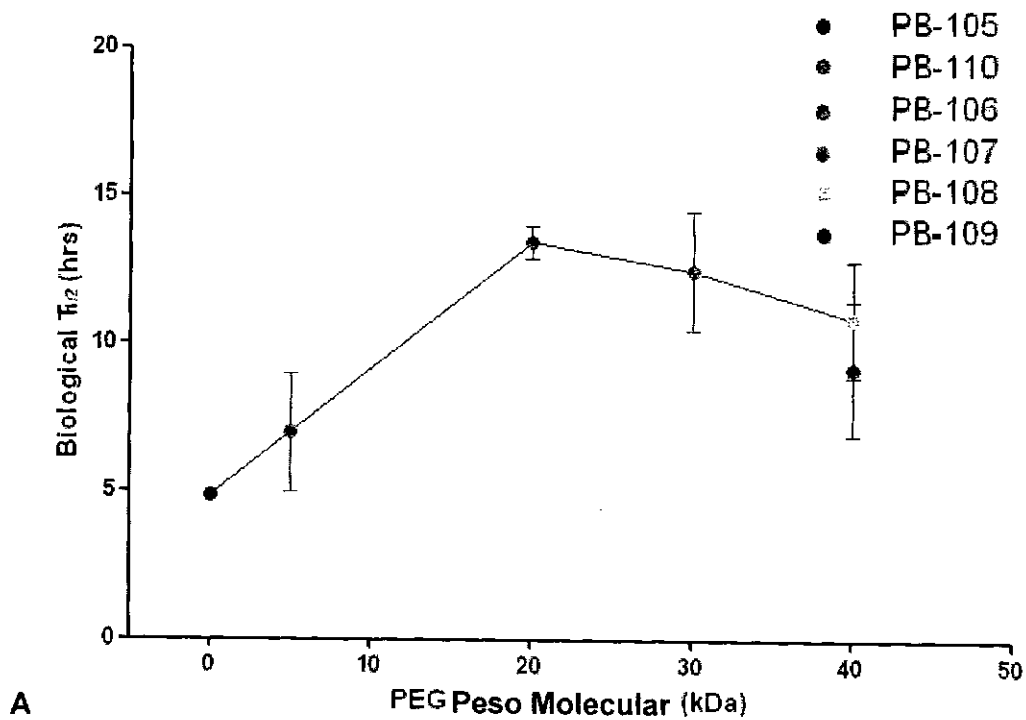


Fig. 31



A

Fig. 32

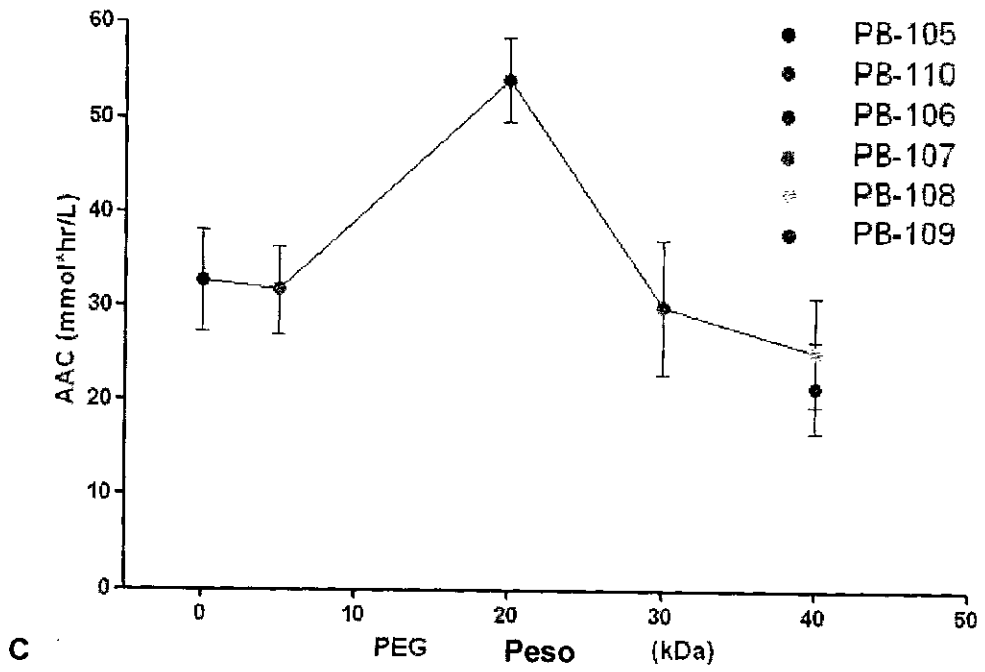
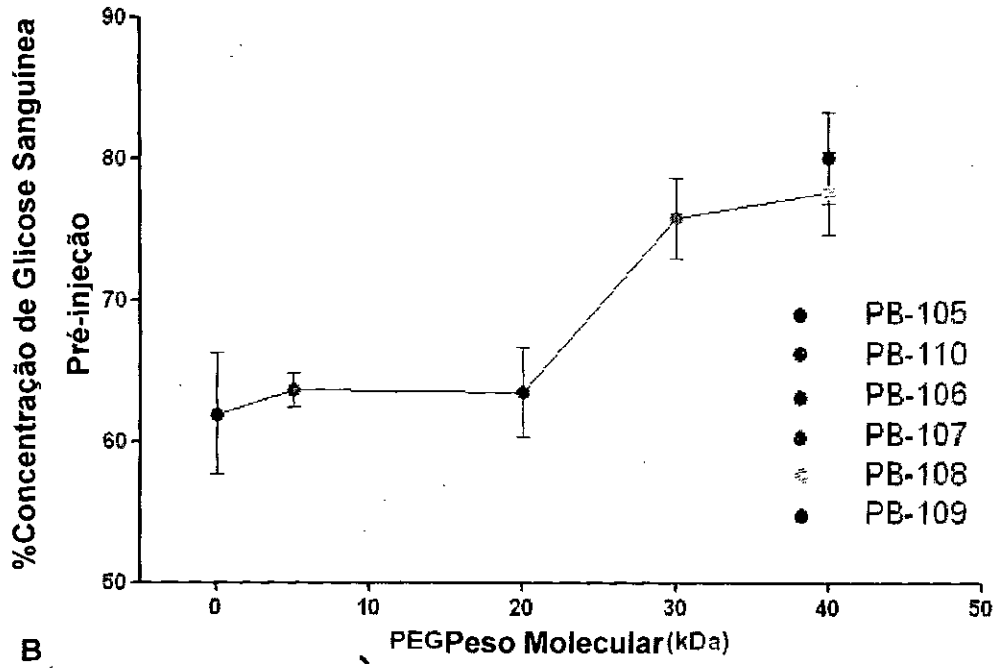


Fig. 32

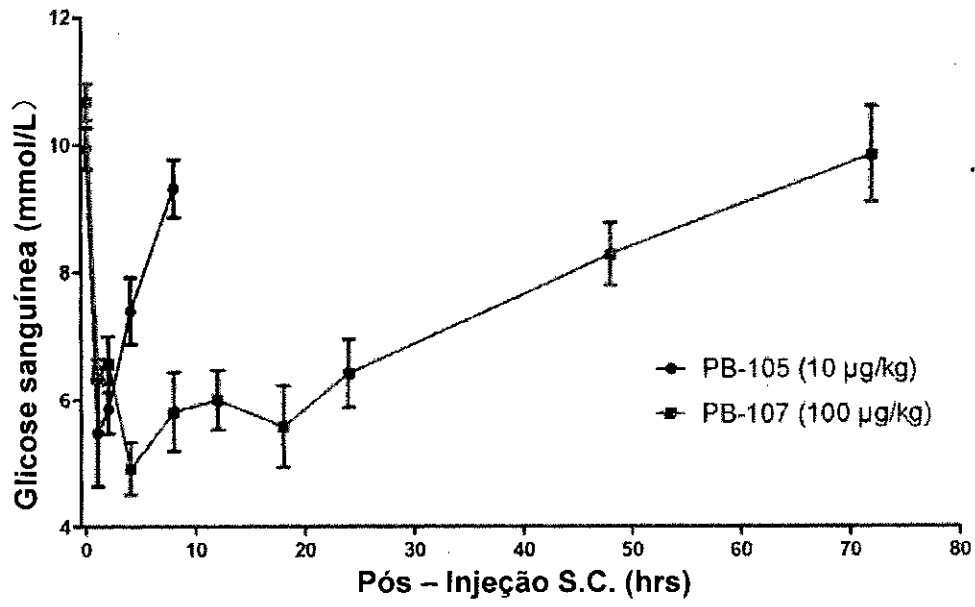


Fig. 33

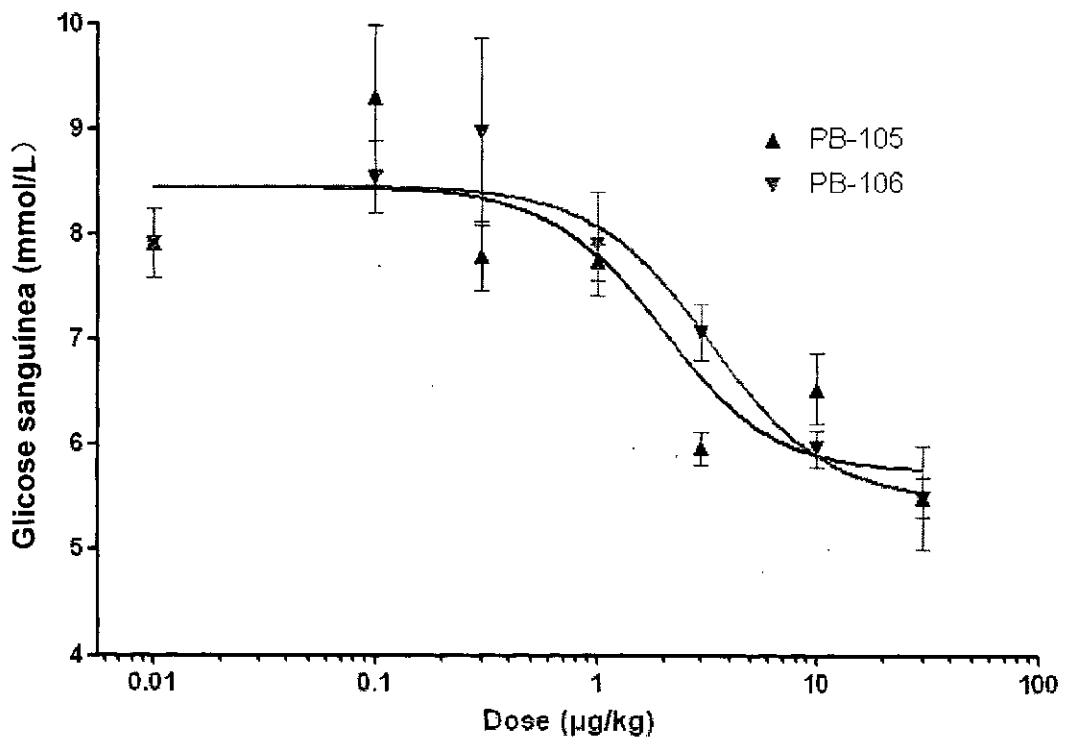


Fig. 34

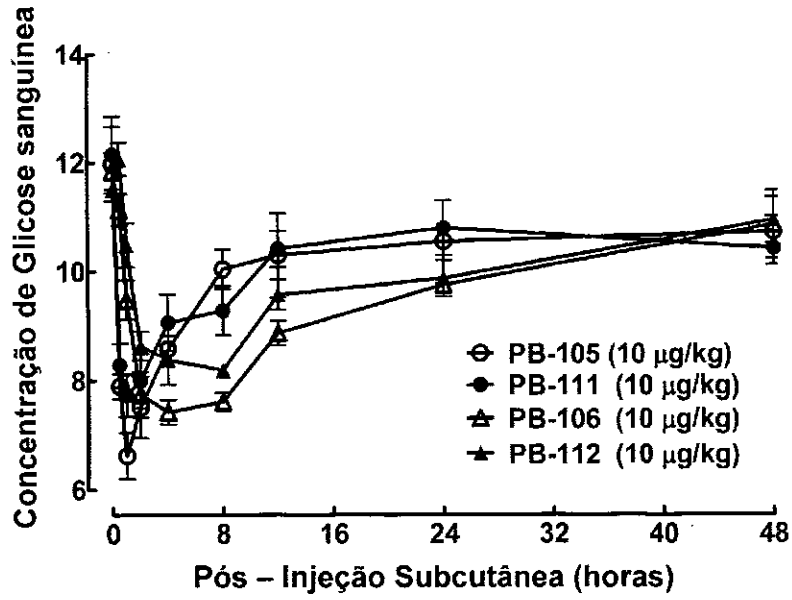


Fig. 35

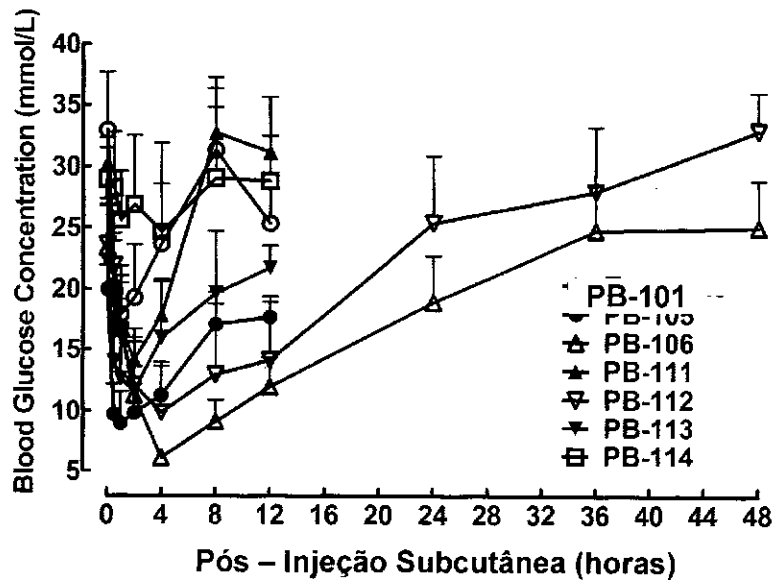


Fig. 36

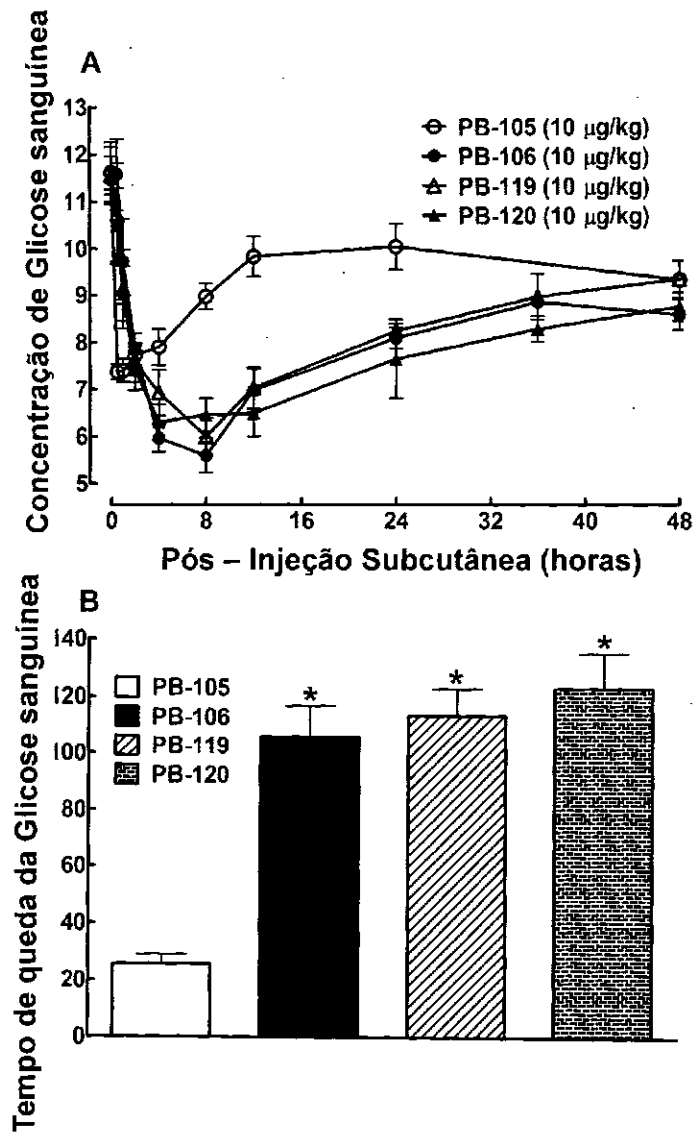


Fig. 37

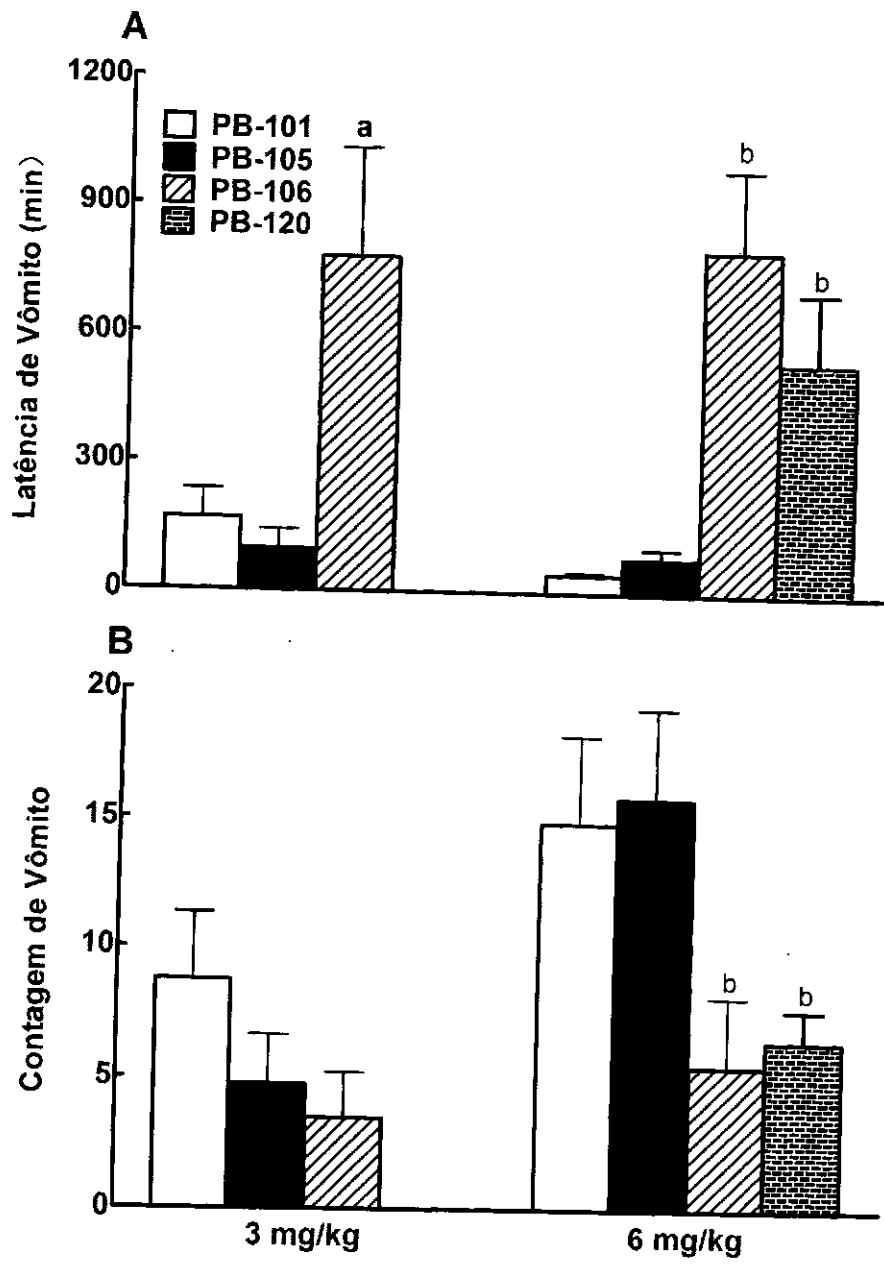


Fig. 38

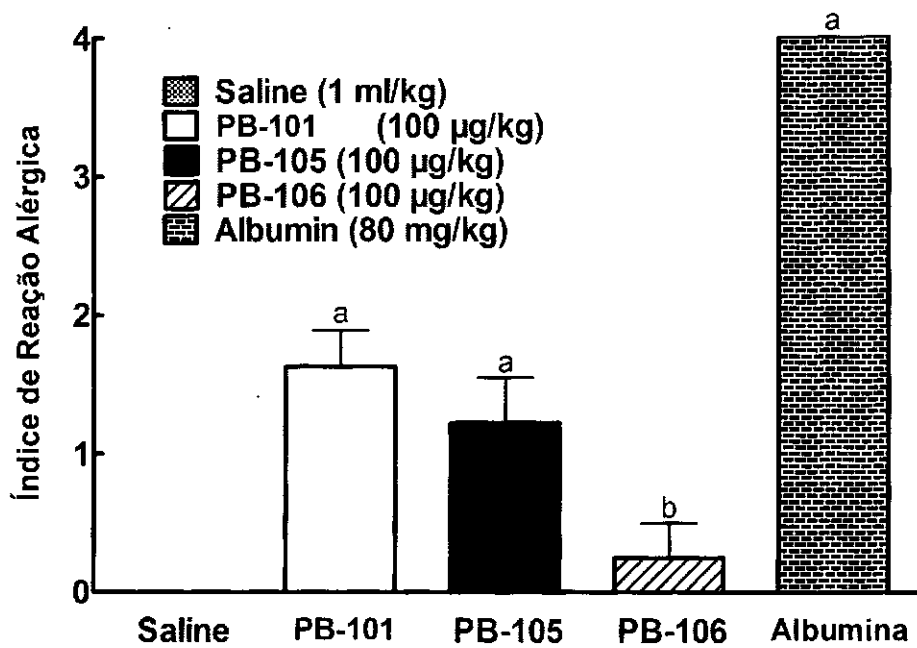


Fig. 39

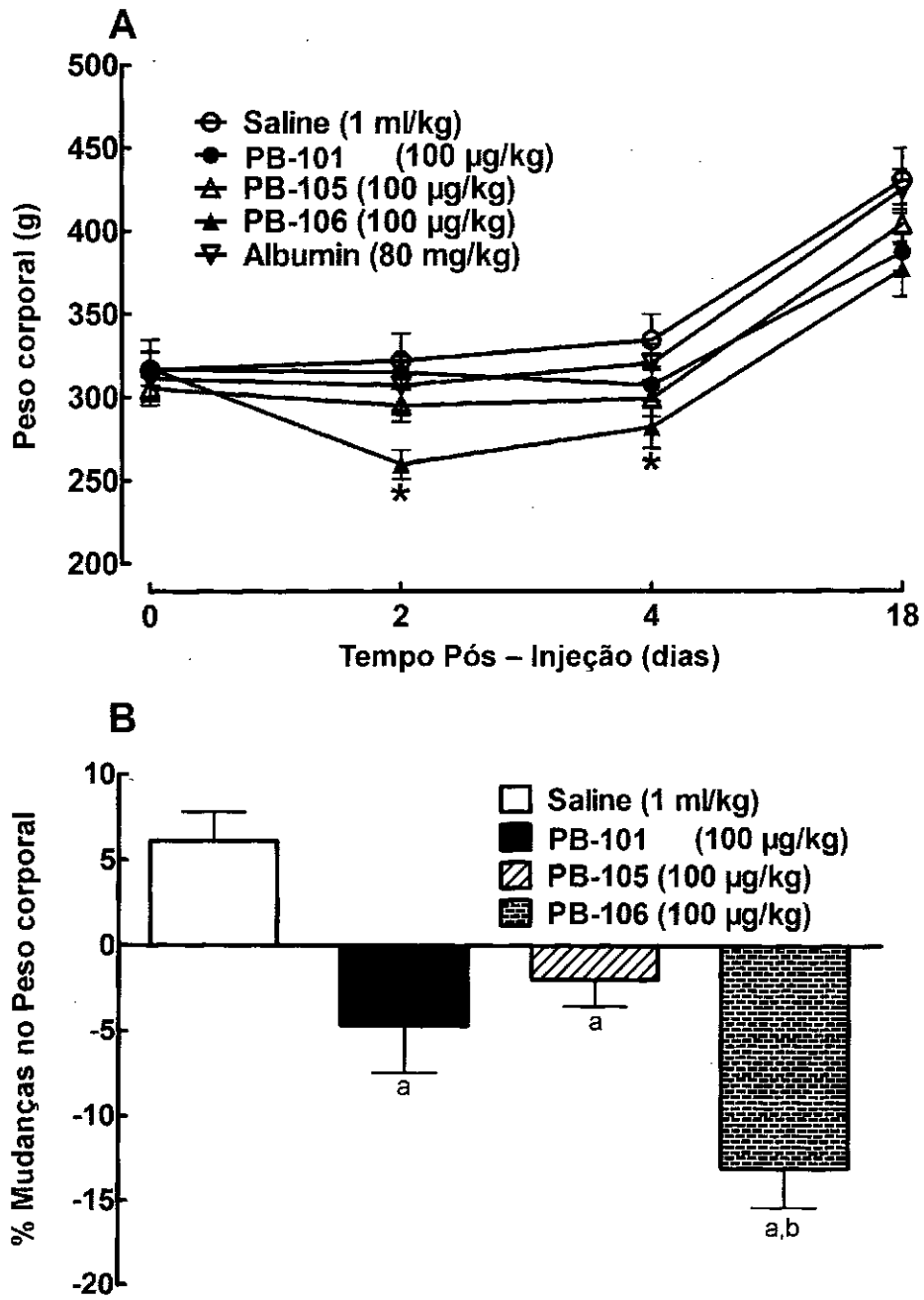


Fig. 40

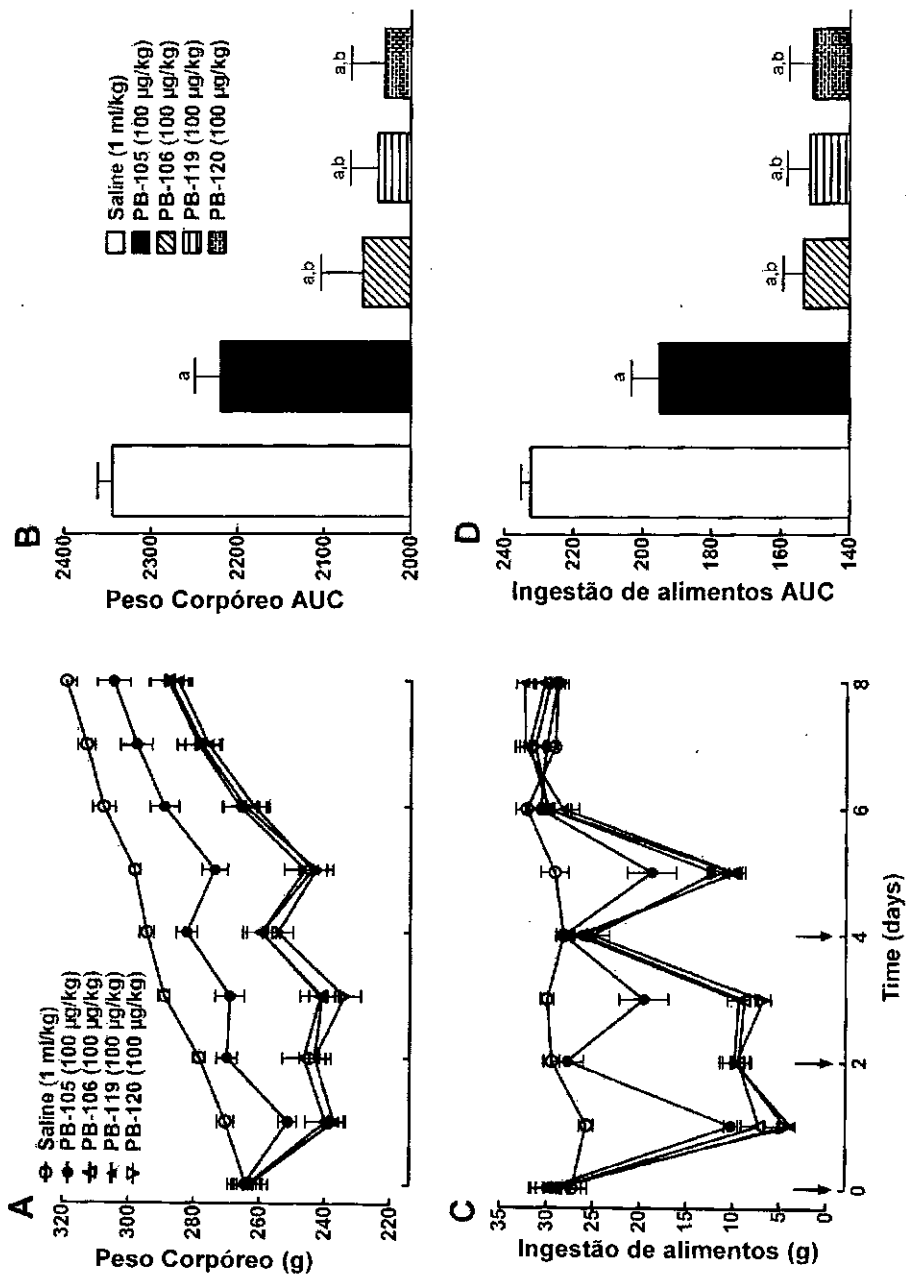


Fig. 41

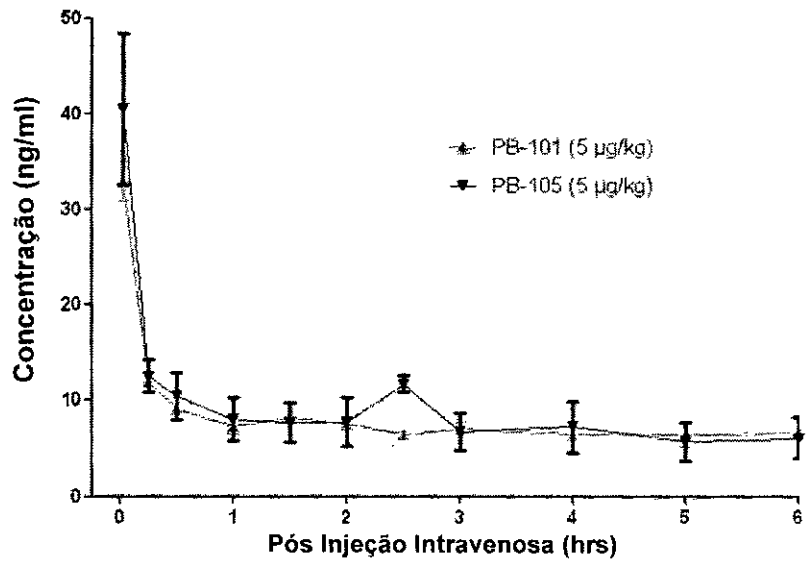


Fig. 42

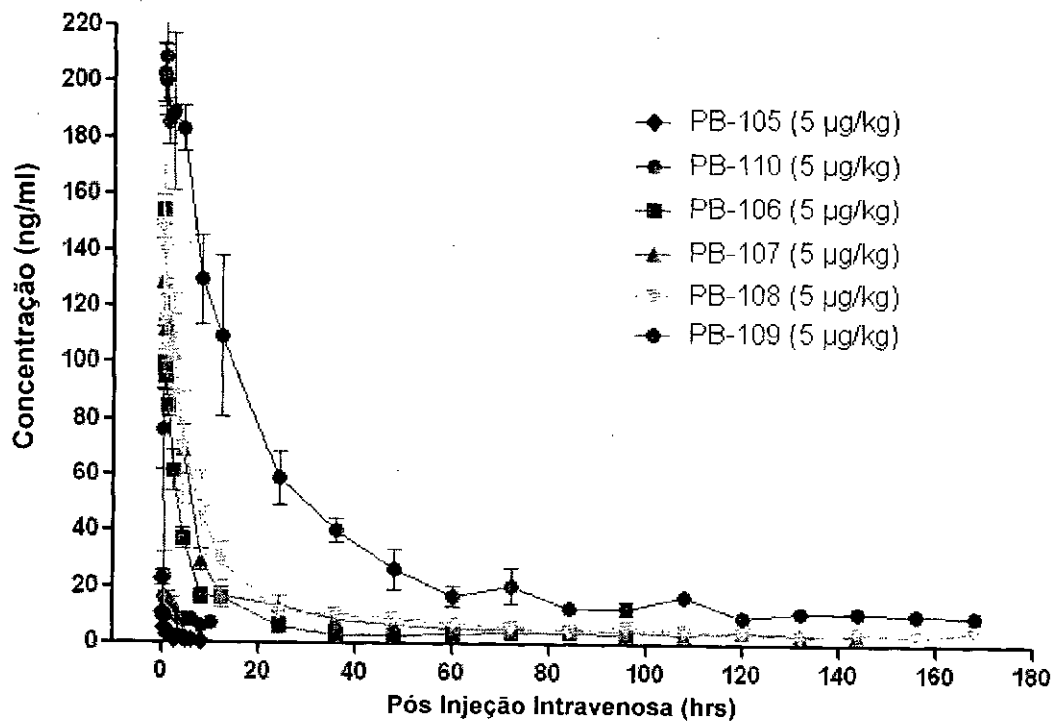
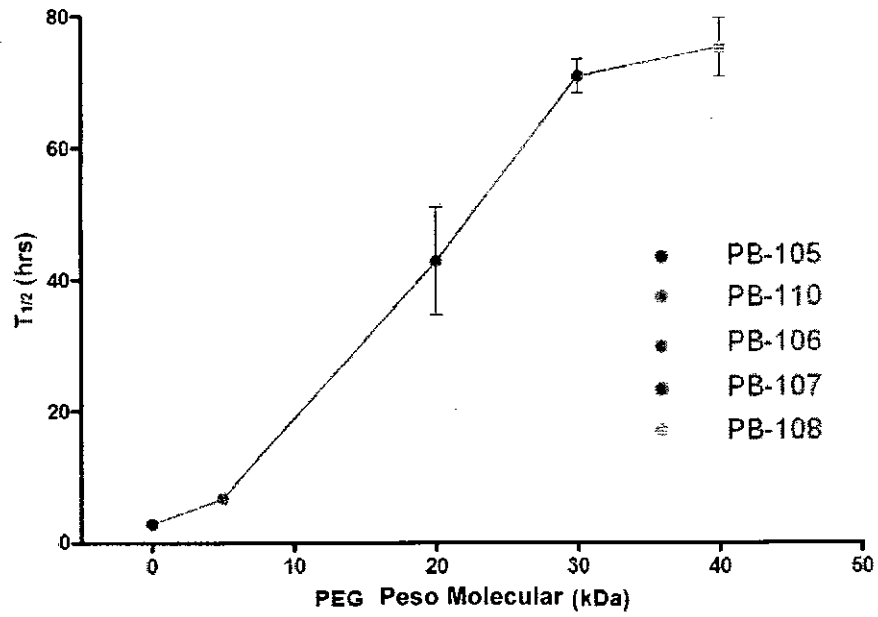
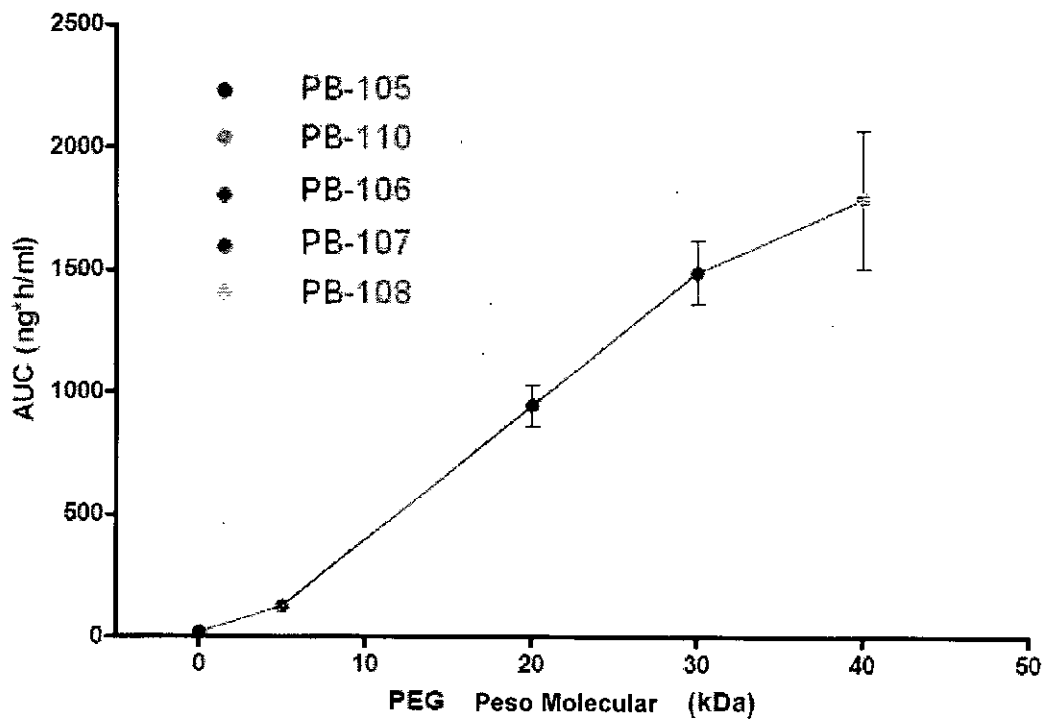


Fig. 43



A



B

Fig. 44

Resumo da Patente de Invenção para: **“NOVA VARIANTE DE EXENDINA E CONJUGADO DESTA”**.

A invenção fornece uma nova variante de Exendina e um conjugado da variante de Exendina que conjuga o polímero neste, a composição farmacêutica compreendendo estes
5 e o uso destes para tratar doenças tais como redução da glicose sanguínea, tratar diabetes, especialmente diabetes do tipo II. A invenção também fornece o uso do conjugado Exendina para baixar o peso corporal.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



5C6B247A5BBBCF4F

Campo 2



4E67BB1EE5C01871

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências - PCT-CN10-072094.txt
- Data de Geração do Código: 05-12-2011
- Hora de Geração do Código: 11:33:17
- Código de Controle:
 - Campo 1: 5C6B247A5BBBCF4F
 - Campo 2: 4E67BB1EE5C01871