

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 581**

51 Int. Cl.:

A61K 47/30 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012 PCT/KR2012/005137**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13002580**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12804683 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2727605**

54 Título: **Análogo de exendina-4 pegilado con polietilenglicol o derivado del mismo, método de preparación del mismo y composición farmacéutica para evitar o tratar diabetes, que contiene el mismo como principio activo**

30 Prioridad:

28.06.2011 KR 20110062858

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2018

73 Titular/es:

**THERALY PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
7751 Coriander Place
Elkridge, Maryland 21075 , US**

72 Inventor/es:

**LEE, SUNG KWON;
KIM, WON BAE;
LEE, SEULKI y
KIM, TAE HYUNG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 674 581 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análogo de exendina-4 pegilado con polietilenglicol o derivado del mismo, método de preparación del mismo y composición farmacéutica para evitar o tratar diabetes, que contiene el mismo como principio activo

5

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a un análogo de exendina-4 pegilado con polietilenglicol o un derivado del mismo, un método de preparación del mismo, y una composición farmacéutica para evitar o tratar la diabetes que contiene el mismo como principio activo como se explica en las reivindicaciones adjuntas.

10

Antecedentes de la técnica

Entre las tecnologías farmacéuticas, la pegilación de péptidos y proteínas con finalidad de tratamiento es la tecnología más eficaz. La pegilación de péptidos y proteínas aumenta su peso molecular, la defensa de sitio de la degradación de proteínas y la defensa de sitio de la naturaleza inmunogénica, lo que consiguientemente aumenta la semivida in vivo de las medicaciones y reduce la naturaleza inmunogénica de péptidos y proteínas. Por lo tanto, la tecnología de pegilación tiene un efecto de aumentar el efecto de tratamiento solucionando los problemas de las medicaciones originales, y debido a dicha resistencia, desempeña un papel importante en el aumento de los efectos del sistema de administración de medicación de proteína y péptido pegilado.

15

20

Además, los péptidos y proteínas aumentan el efecto de tratamiento por medio de la unión covalente con polietilenglicol (PEG). Dicha tecnología aumenta el peso molecular, defiende un sitio de metabolismo y la inhibición de un sitio de naturaleza inmunogénica, aumentando la semivida in vivo y la estabilidad y reduciendo la naturaleza inmunogénica. Además, se reduce la eliminación renal de péptidos y proteínas unidos con PEG debido al aumento de los pesos moleculares de péptidos y proteínas por medio de PEG, de manera que la PEGilación tiene las ventajas de aumentar los efectos tanto farmacocinéticos como farmacodinámicos.

25

Los sitios de reacción de pegilación de péptidos y proteínas se encuentran dispersados de forma aleatoria y, ocasionalmente, están próximos a los sitios bioactivos. Sin embargo, la pegilación tradicional emplea métodos de pegilación no específicos que no consideran el sitio de reacción de PEG, número de enlaces de PEG y la actividad biológica. Sin embargo, dicho método de PEGilación no específico reduce los efectos de tratamiento introduciendo conformación suficiente mediante la producción de diversos isómeros con unión PEG de tipo ramificado que tienen diferentes características fisicoquímicas, biológicas y farmacocinéticas. Los métodos de PEGilación específicos se han estudiado para solucionar dichos problemas, y recientemente se están desarrollando métodos de PEGilación específicos con objeto de constituir un método de maximización de los efectos de tratamiento de medicación, ya que se está desarrollando ingeniería genética y tecnología de introducción de grupos funcionales selectivos. En la técnica relacionada, previamente se ha llevado a cabo un estudio para la unión selectiva de PEG en un sitio con N-terminal tras la retirada de un sitio de reacción por medio de sustitución de un sitio de amina con diferentes amino ácidos usando un método de ingeniería genética para el factor de simulación de granulocitos (G-CSF) y el receptor de factor de necrosis tumoral.

30

35

40

Además, se han llevado a cabo estudios que usan una tecnología que provoca la PEGilación selectiva de un sustituyente tras la introducción de un sustituyente específico usando métodos de ingeniería genética y tecnología de sustitución para medicaciones tales como estafiloquinasa, interferón α -2, variable de fragmento de cadena individual de anticuerpo (ScFV).

45

El documento WO 2004/022004 de Bayer Pharmaceuticals Corp describe agonistas de receptor GLP-1 modificados que comprenden un agonista de receptor GLP-1 unido a un polímero de polietilenglicol que tienen un peso molecular mayor de 30 kD, y formulaciones relacionadas y dosis y métodos de administración de los mismos con fines terapéuticos. Más particularmente, estos agonistas de receptor GLP-1 modificados, composiciones y métodos se ha demostrado que son útiles para proporcionar una opción de tratamiento para aquellos individuos afectados por un trastorno metabólico tales como diabetes y estados pre-diabéticos tales como impedimento de tolerancia a la glucosa y glucosa en ayunas alterada, mediante la introducción de la secreción de insulina dependiendo de glucosa, sin reducir la motilidad gastrointestinal.

50

55

Exendina-4 es una sustancia de polipéptido y es el primer análogo de incretina, una medicación para diabetes preparada mediante la síntesis de exendina-4, una sustancia salivar de monster Gila. Exendina-4 es diferente de exendina-3 únicamente para los sitios n.º 2 y 3, se sabe que tiene una semivida más larga que el péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) que es una medicación para la diabetes que tiene una semivida más corta de dos minutos para DPP-IV, una enzima que es resistente para la degradación directa de la enzima incretina que se produce en el estómago de los mamíferos tras la ingestión de DPP-IV (dipeptidil peptidasa-4) para desempeñar funciones fundamentales de promoción de la secreción de insulina y rebaja del nivel de azúcar en sangre y también, muestra 2-4 horas de semi-vida en el experimento in vivo, y se ha confirmado que puede alcanzar suficiente concentración en sangre con 2-3 veces de inyección intraperitoneal al día.

60

65

Además, se sabe que exendina-4 controla la motilidad del tracto gastrointestinal, reduce la ingesta de alimento y evita el glucagón de plasma sanguíneo, y recientemente se ha autorizado exendina-4 sintética de tipo microesfera PLGA (nombre de producto: Byetta) por parte de US FDA y su liberación está casi lista. Sin embargo, debido a que este producto Byetta LAR ha complicado el proceso de preparación y tiene una semivida corta para exendina-4, que es de aproximadamente 4-6 horas, se requiere la administración frecuente de exendina-4 de dosis elevada, y existe el problema del control de liberación de medicación basado en la eliminación rápida debido al peso molecular bajo, menor de 4200, y a problemas tales como la naturaleza inmunogénica.

Por lo tanto, al tiempo que se estudia un método para reducir la frecuencia de administración de exendina-4 y solucionar el problema de peso molecular bajo de exendina-4, los inventores han completado la presente invención tras haber confirmado el hecho de que resulta posible aumentar el rendimiento de producción de exendina-4 PEGilada y el efecto de tratamiento de medicaciones para llevar a cabo la PEGilación selectiva por medio de un amino ácido de cisteína (Cys) en el sitio (sitio nº. 40) a continuación del sitio nº. 39 del terminal-C de exendina-4.

15 **Divulgación de la invención**

PROBLEMA TÉCNICO

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un análogo de exendina-4 en el que se introduce una cisteína (Cys) en el sitio N°. 40 de un terminal-C y se somete a PEGilación con polietilenglicol (PEG) o derivados del mismo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método de preparación de un análogo de exendina-4.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de enfermedades provocadas por hipersecreción de insulina, que contienen un análogo de exendina-4 como principio activo.

Solución técnica

Con el fin de lograr los objetivos, la presente invención proporciona un análogo de exendina-4 de acuerdo con la Reivindicación 1.

La presente invención proporciona también un método de preparación del análogo de exendina-4 de acuerdo con la reivindicación 10.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades provocadas por la hipersecreción de insulina que contienen el análogo de exendina-4 como principio activo.

40 **EFFECTOS VENTAJOSOS**

Llevando a cabo la PEGilación selectiva de acuerdo con la invención, se puede aumentar el rendimiento de un análogo de exendina-4 en el que se introduce una cisteína (Cys) en el sitio nº. 40 del terminal-C y se somete a PEGilación con polietilenglicol (PEG) o derivados del mismo, y se puede aumentar el efecto de tratamiento de medicaciones, y de este modo se puede usar de forma beneficiosa el análogo de exendina-4 como composición para prevenir o tratar enfermedades provocadas por la hipersecreción de insulina.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática que ilustra la PEGilación de exendina-4 en el que se introduce cisteína (Cys 40) en el terminal-C del ejemplo 1 de la presente invención.

La Figura 2 es una vista esquemática que ilustra la PEGilación para la amina de licina de exendina-4 del ejemplo comparativo 1 de la presente invención.

La Figura 3 es una vista esquemática que ilustra la PEGilación para el terminal-N de exendina-4 del ejemplo comparativo 2 de la presente invención.

La Figura 4 es una vista que ilustra la absorbancia de luz del ejemplo 1 de la presente invención.

La Figura 5 es una vista que ilustra la absorbancia de luz de los ejemplos comparativos 1a a 1c de la presente invención.

La Figura 6 es una vista que ilustra la absorbancia de luz del ejemplo comparativo 2 de la presente invención.

La Figura 7 es una vista que ilustra el rendimiento de producción del ejemplo 1 de la presente invención.

La Figura 8 es un dibujo que ilustra el rendimiento de producción de los ejemplos comparativos 1a a 1c de la presente invención.

5 La Figura 9 es una vista que ilustra el rendimiento de producción del ejemplo comparativo 2 de la presente invención.

La Figura 10 es una vista que ilustra la afinidad de un análogo de exendina-4 unido con PEG a un receptor de GLP-1 de acuerdo con un ejemplo de la presente invención.

10 La Figura 11 es una vista que ilustra análogos de exendina-4 unidos con PEG de los ejemplos 4 y S de la presente invención.

15 La Figura 12 es una vista que ilustra el nivel de glucosa en sangre para ratones diabéticos a los que se ha administrado un análogo de exendina-4 ligado a PEG de acuerdo con un ejemplo de la presente invención.

MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

20 La presente invención proporciona un análogo de exendina-4 de acuerdo con la Reivindicación 1.

El peso molecular de un polietilenglicol o uno de sus derivados de acuerdo con la presente invención es de 5-60 kDa, y preferentemente de 20-50 kDa.

25 Específicamente, el derivado de polietilenglicol está seleccionado entre succinimidilpropionato de metoxipolietilenglicol, metoxipolietilenglicol N-hidroxisuccinimida, metoxipolietilenglicol propionaldehído, metoxipolietilenglicol maleimida. Preferentemente, el derivado de polietilenglicol es metoxipolietilenglicol maleimida trimérica.

30 Además, la presente invención proporciona un método de preparación de un análogo de exendina-4 PEGilado con polietilenglicol o un derivado del mismo, que incluye un proceso de disolución de exendina-4 en el que se introduce cisteína en el sitio n°. 40 del terminal-C, y polietilenglicol o uno de sus derivados en solución salina de tampón de fosfato y se hacen reaccionar a temperatura ambiente de acuerdo con las reivindicaciones.

35 Específicamente, se puede preparar un análogo de exendina-4 PEGilado con polietilenglicol o un derivado del mismo mediante la adición de exendina-4 en la que se introduce cisteína en el sitio n°. 40 del terminal-C, y polietilenglicol o un derivado del mismo en una solución salina de tampón de fosfato en una relación molar de 1:1-3 en solución salina de tampón de fosfato que tiene un intervalo de pH de 7,2-7,8, preferentemente pH 7,5, disolución de estos ingredientes, y reacción durante 1-3 horas a temperatura ambiente y cromatografía en columna tras completarse la reacción.

40 Cuando la solución salina de tampón de fosfato no está dentro del intervalo de pH, el rendimiento puede disminuir. Tras preparar el análogo de exendina-4 PEGilado con polietilenglicol o el derivado del mismo, se puede confirmar la estructura molecular del análogo de exendina-4 por medio de espectroscopia de masas, cromatografía de líquidos, análisis de difracción de rayos-X, polarimetría y comparación entre los valores calculados y los valores medidos de los elementos representativos que constituyen el análogo de exendina-4.

45 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades provocadas por hipersecreción de insulina, que contienen un análogo de exendina-4 como principio activo.

50 Las enfermedades provocadas por la hipersecreción de insulina pueden incluir diabetes de Tipo 1, diabetes de tipo 2 y complicaciones de diabetes.

55 Como resultado de haber medido la afinidad frente a un receptor de GLP-1 del análogo de exendina-4 PEGilado con polietilenglicol o un derivado del mismo de acuerdo con la presente invención, el valor de IC50 fue 1,04 nM, y se confirmó que éste mostraba 120 veces más actividad que el compuesto del ejemplo 1 (Nter-PEG-Ej4) (IC50 = 121.78 nM) (en referencia al ejemplo experimental 1, Tabla 3 y FIG 10).

60 Además, para una mejor comprensión, la Figura 11 muestra un diagrama esquemático de la exendina-4 de la presente invención unida con un PET trimérico en el sitio C40.

65 Cuando el peso molecular del PEG unido es 23K, se usa PEG de 3KD como espaciador PEG, y PEG que tiene un peso molecular de 10 KD se une al terminal del 3KD (ejemplo 4). Además, de forma similar a esto, cuando el peso molecular del PEG unido es 50, se usa PEG de 10KD como espaciador PEG, y PEG que tiene un peso molecular de 20 KD se une al terminal del 10KD (ejemplo 5). En este momento, como resultado de haber medido el tiempo necesario para que el nivel de glucosa en sangre suba de nuevo hasta 8,35 mmol/l tras haber inyectado exendina-4

del ejemplo 4 (C40-PEG23K-Ej4) y ejemplo 5 (C40-PEG50K-Ej4), se mantuvo un bajo nivel de glucosa en sangre desde 45,5-56,1 horas tras la administración de la medicación (en referencia al ejemplo experimental 2, Tabla 4 y Figura 12), lo que se confirmó que era más de dos veces de C40-PEG20K-Ej4 (23,2 horas) y el grupo de control (7,3 horas), permitiendo un mantenimiento 7-8 veces más estable del nivel de glucosa en sangre.

5 Por lo tanto, el compuesto de exendina-4 unido a PEG específico del sitio C40 de acuerdo con la presente invención puede solucionar el inconveniente de la eliminación rápida de las medicaciones debido al bajo peso molecular de la exendina-4 existente, tiene excelente afinidad por el receptor GLP-1, y tiene una intensa capacidad de
10 mantenimiento de la glucosa en sangre baja, capaz de mantener el nivel de glucosa en sangre en un nivel hasta 3-4 días después de la administración de la medicación, de forma que se puede usar de manera beneficiosa para evitar o tratar la diabetes de tipo 1 relacionada con hipersecreción de insulina, diabetes de tipo 2 y enfermedades relacionadas con complicaciones de diabetes.

15 Cuando se usa la composición de la presente invención como medicación, se puede administrar la composición farmacéutica que contiene el análogo de exendina-4 PEGilado con polietilenglicol o un derivado de la misma, tras haber formulado para dar lugar a varias formas de administración orales y no orales, como las siguientes en caso de administración clínica. Para la formulación destinada a administración oral, por ejemplo, existen comprimidos, microgránulos, cápsulas duras/blandas, líquidos, suspensiones, emulsionantes, jarabes, gránulos, elixires, trociscos y estas formulaciones incluyen diluyentes (por ejemplo: lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o
20 glicina), modificadores de deslizamiento (ejemplo: sílice, talco, estearato y su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol) además del principio activo. Los comprimidos también pueden incluir aglutinantes tales como silicato de aluminio y magnesio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetil celulosa de sodio y/o polivinil pirrolidina, y pueden incluir agentes desintegrantes tales como almidón, agar, ácido algínico o una sal de sodio del mismo o una mezcla de ebullición y/o absorbentes, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes si fuese
25 necesario.

La composición farmacéutica que contiene el análogo de exendina-4 PEGilado con polietilenglicol o un derivado del mismo puede administrarse por vía no oral, y la administración se lleva a cabo por medio de inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular o inyección intratorácica.

30 En este momento, el análogo de exendina-4 PEGilado con polietilenglicol o un derivado del mismo puede prepararse para dar lugar a una suspensión o líquido, por medio de mezcla del mismo con un estabilizador o tampón en agua, para dar lugar a una formulación destinada a administración no oral, y esto se puede preparar en una ampolla o forma de administración unitaria en un vial. La composición se esteriliza y/o puede incluir adyuvantes tales como
35 antisépticos, estabilizadores, agentes de hidratación o estimuladores de emulsión, sales destinadas a controlar la presión osmótica y/o tampones, y otras sustancias beneficiosas para los tratamientos, y se pueden formular de acuerdo con los métodos tradicionales de mezcla, granulación o revestimiento.

40 La dosis del cuerpo humano de la composición farmacéutica que contiene el análogo de exendina-4 PEGilado con polietilenglicol o un derivado del mismo de acuerdo con la presente invención puede variar dependiendo de la edad, peso corporal, sexo, forma de administración, estado de salud y nivel de enfermedad de los pacientes, y se puede administrar por vía oral o por ruta no oral, siguiendo las decisiones de los doctores y farmacéuticos, con una dosis preferida de 0,01 a 200 mg/kg/día.

45 MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención se explica con detalle en los ejemplos y ejemplos experimentales siguientes.

Ejemplos 1-5 (Los ejemplos 1-3 representan los ejemplos de referencia):

50 Producción de exendina-4 unida con PEG específica del sitio C40

Para preparar exendina-4 unida con PEG específica del sitio C40, se usó exendina-4-Cys en la que se introduce cisteína en el sitio terminal-C (sitio N^o. 40) (exendina-Cys, peso molecular: 4290,7, secuencia: SEQ ID NO: 1:

55 HGGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPSC), y monometoxi PEG activado con maleimida (mPEG-MAL, PM: 5, 20 kDa (tipo lineal), 20 kDa (tipo ramificado), 23, 50 kDa (tipo trímero)) adquirido en Nippon Oil and Fats, NOF, Tokyo, y se usó.

60 Para preparar exendina-4 unida con PEG específica del sitio -# 40 del terminal-C, se disolvió por completo exendina-4-Cys y mPEG-MAL (PM: 5, 20 (tipo lineal), 20 (tipo ramificada), 23, 50 kDa) en una relación molar de 1:2 en una solución salina de tampón de fosfato 20 mM (pH 7,5) y se hizo reaccionar durante dos horas a temperatura ambiente (referencia a la Figura 1). Después de la reacción, se separó la solución sometida a reacción por medio de
65 cromatografía en fase reversa con columna Capcell-pak RP-18 (250 x 10 mm, 5 µm, Shiseido, Japan) a una velocidad de flujo de 5,0 ml/min. Se controló la separación con rayos ultravioleta a una longitud de onda de 215 nm. Se separó la fase móvil usando un método de gradiente de concentración lineal (36-42 % B durante 30 minutos)

para agua destilada TFA 0,1 % (fase móvil A) y acetonitrilo TFA 0,1 % (fase móvil B) (referencia a la Figura 4).

Los picos separados por medio del método se recogieron por separado, se retiró acetonitrilo usando gas de nitrógeno, y se concentró la solución retirada usando Centricon-10 (valor de corte de PM de 3000, Millipore Corp., Billerica, MA). Se almacenó la sustancia preparada a 4 °C y se preparó por medio de mezcla de 1 µl de solución de muestra-matriz-muestra y 2 µl de solución de matriz, y se preparó la solución de matriz disolviendo ácido α-cianohidroxinámico (α-CHCA) con solución de agua/CAN (50:50) que contenía 0,1 % (v/v) TFA. Se colocó 1 µl de la solución de muestra-matriz en una placa de muestra, se secó a vacío y se analizó con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y espectrómetro de masas MALDI-TOF, y se analizó la reacción de unión PEG específica del sitio C40 (C40-PEG-Ej4) A 0, 20, 40, 60 y 80 minutos y se mostró con una relación de área de cromatograma en comparación con el estado inicial de exendina-4 y C40-PEG-Ej4. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 7.

Tabla 1

	Tiempo de reacción	Rendimiento (%)
Ejemplo 1 C40-PEG _{5K} -Ej4 (lineal)	80 min.	93 %
Ejemplo 2 C40-PEG _{20K} -Ej4 (lineal)	80 min.	89%
Ejemplo 3 C40-PEG _{20K} -Ej4 (ramificado)	80 min.	91%
Ejemplo 4 C40-PEG _{23K} -Ej4 (trímero)	80 min.	90%
Ejemplo 5 C40-PEG _{50K} -Ej4 (trímero)	80 min.	85%

Como se muestra en la Tabla 1, el tiempo de reacción fue de 80 minutos de media, llevándose a cabo la producción con un rendimiento por encima de un 90 % de media (referencia a la Figura 7).

Ejemplo comparativo 1: Producción de exendina-4 unida a PEG no específica

Se llevó a cabo un método equivalente al del ejemplo 1 exceptuando el uso de exendina-4 (peso molecular: 4186,6, secuencia: SEQ ID NO: 2 HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS) y monometoxi PEG activada con succinimidilo (mPEG-SPA, PM: 5, 20 kDa (tipo lineal)) en lugar de usar exendina-4-Cys introducida con cisteína y monometoxi PEG activado con maleimida, para preparar la exendina-4 unida a PEG no específica (referencia a la Figura 2 y la Figura 5).

Se adquirió monometoxi PEG activado con succinimidilo (mPEG-SPA) a partir de Nippon Oils and Fats, NOF, Tokyo, y se usó.

Tabla 2

	Tiempo de reacción	Rendimiento (%)
Ejemplo comparativo 1		
Ejemplo comparativo 1a Lys ¹² -PEG _{20K} -Ej4	80 min.	20%
Ejemplo comparativo 1b Lys ²⁷ -PEG _{20K} -Ej4	80 min.	31%
Ejemplo comparativo 1c Lys ^{12,27} -PEG _{20K} -Ej4	80 min.	25%

Como se muestra en la Tabla 2, el tiempo de reacción de la reacción de unión de PEG con amina primaria no específica fue de 80 minutos de media, siendo el rendimiento medio de un 20% para el ejemplo Comparativo 1a(Lys¹²-PEG_{20K}-Ej4) y de un 31 % para el ejemplo Comparativo 1 b (Lys²⁷-PEG_{20K}-Ej4) (referencia a la Figura 8).

Ejemplo comparativo 2: Producción de exendina-4 unida con PEG específica del terminal-N

Se llevó a cabo un método equivalente al del ejemplo 1 exceptuando el uso de exendina-4 (peso molecular: 4186,6, secuencia: HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS) y monometoxi PEG aldehído (mPEG-ALD, PM: 5 kDa (lineal)) en lugar de usar exendina-4-Cys introducida con cisteína y monometoxi PEG activado con maleimida, para preparar la exendina-4 unida a PEG no específica (referencia a la Figura 3 y la Figura 6).

Se adquirió monometoxi PEG-aldehído en Nippon Oils and Fats, NOF, Tokyo y se usó.

Como resultado de ello, el tiempo de reacción de la reacción de unión de PEG específica del terminal-N (N_{ter}-PEG_{5K}-

Ej4) fue de 720 minutos, con un rendimiento medio de un 72 % (referencia a la Figura 9).

Ejemplo Comparativo3: Análisis de afinidad de unión al receptor celular RIN-m5F del análogo de exendina-4 unido con PEG

Se llevó a cabo el siguiente experimento para llevar a cabo la afinidad del receptor GLP-1 (GLP-1R) de los análogos de exendina-4 unidos a PEG del Ejemplo 1 (C40-PEG_{5K}-Ej4), Ejemplo comparativo 1a (Lys¹²-PEG_{5K}-Ej4), Ejemplo Comparativo 1b (Lys²⁷-PEG_{5K}-Ej4) y Ejemplo Comparativo 2(N_{ter}-PEG_{5K}-Ej4) preparado en el Ejemplo 1, Ejemplos comparativos 1 y 2.

Se inocularon células de isleta (RIN-m5F, ATCC, Manassas, VA) que expresaban la cantidad bruta del receptor de GLP-1 (GLP-1 R) en placas de 12 pocillos. Se lavó dos veces con tampón de unión (NaCl de 120 mM, MgSO₄ 1,2 mM, acetato de sodio 13 mM, 5 mM de KCl, 1,2 g/l de Tris, 2 g/l de albúmina de suero bovino, 1,8 g/l de glucosa, pH 7,6) tras 48 horas y el análogo de exendina-4 unido a PEG no marcado (intervalo de concentración final: 0,001-1000 nM) y exendina-4 marcada con una concentración de 30 pM de I-125 (9-39, PerkinElmer, Boston, MA) se trataron de forma simultánea. Se llevó a cabo un lavado completo con PBS que incluía 1 mg/ml de albúmina de suero bovino trascurridas dos horas. Se degradaron finalmente de forma homogénea las células durante 15 minutos usando tampón de lisis celular (NaOH 0,5 N con SDS al 1 %) y se midió el nivel de radiación de I-125 usando un contador gamma (GMI, Inc., Ramsey, MN). Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 10.

Tabla 3

	IC ₅₀ (nM)
Ejemplo 1 (C40-PEG _{5K} -Ej4)	1,04 nM
Ejemplo comparativo 1a (Lys ¹² -PEG _{5K} -Ej4)	6,45 nM
Ejemplo comparativo 1b (Lys ²⁷ -PEG _{5K} -Ej4)	2,42 nM
Ejemplo comparativo 2 (N _{ter} -PEG _{5K} -Ej4)	121,78 nM
Grupo de control (exendina-4)	0,23 nM

Como se muestra en la Tabla 3, se confirmó que el valor de IC₅₀ del Ejemplo 1(C40-PEG_{5K}-Ej4) de acuerdo con la presente invención fue de 1. Se midió 04 nM tras la afinidad del receptor GLP-1. Se confirmó que se muestra actividad dos veces mejor que el Ejemplo Comparativo 1b (Lys²⁷-PEG_{5K}-Ej4) (valor de IC₅₀ = 2,42 nM), y 6 veces mejor que el Ejemplo Comparativo 1a (Lys¹²-PEG_{5K}-Ej4) (valor de IC₅₀= 6,45 nM). Además, se confirmó que el Ejemplo 1 (C40-PEG_{5K}-Ej4) de acuerdo con la presente invención muestra actividad 120 veces mejor que el Ejemplo Comparativo 2(N_{ter}-PEG_{5K}-Ej4) (valor de IC₅₀= 121,78 nM).

Por lo tanto, la composición de exendina-4 unida a PEG específica del sitio C40 de acuerdo con la presente invención no solo puede solucionar la debilidad de la rápida eliminación de la medicación debido al bajo peso molecular de exendina-4, sino que también puede usarse de forma beneficiosa como medicación para la diabetes debido a que la afinidad del receptor GLP-1 muestra una actividad biológica similar a exendina-4 (referencia a la Figura 10).

Ejemplo experimental 1: Evaluación de la sostenibilidad de la glucosa en sangre baja en ratones diabéticos de tipo 2 no en ayunas

Se llevó a cabo el siguiente experimento para evaluar la sostenibilidad de la glucosa en sangre baja de la composición de exendina-4 unida a PEG específica del sitio C40 de acuerdo con la presente invención en ratones diabéticos de tipo 2.

Se usaron ratones diabéticos de tipo 2 C57BL/6 db/db (machos, 4-5 semanas, Central Lab. Animal Inc.) y se expusieron los animales a ciclos de luz de 12 horas y se alimentaron tras estabilización durante dos semanas, permitiendo la ingesta libre de alimento y agua. Se gestionaron los animales de acuerdo con las recomendaciones de National Institute of Health (NIH) y autorizado por el Institutional Animal Care and Use Committee of Sungkyunkwan University, y se llevó a cabo el experimento con criterios morales.

Se inyectaron por vía intraperitoneal C40-PEG_{5K}-Ej4 (lineal), Se inyectaron por vía intraperitoneal C40-PEG_{20K}-Ej4 (lineal), C40-PEG_{20K}-Ej4 (ramificado), C40-PEG_{23K}-Ej4 (trímero) and C40-PEG_{50K}-Ej4 (trímero) preparados a partir del Ejemplo 1 a 5 y Lys²⁷-PEG_{20K}-Ej4 preparado en el Ejemplo Comparativo 1b, con una dosis de 25 nmol/kg en ratones macho db/db (6-7 semanas), se tomaron muestras de sangre en la vena de la cola de los ratones tras un tiempo de ayuno: 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 horas y se midió la concentración de glucosa en sangre con un Sensor ACCU-CHEK (Roche Diagnostics Corp., USA). Después, se midió de forma adicional el tiempo de sostenimiento de glucosa en sangre baja (nivel de glucosa en sangre < 8,35 mmol/l (150 mg/dl)) y se

muestra en la Tabla 4 y en la Figura 12. En el presente experimento, se usó exendina-4 como grupo de control.

Tabla 4

Tiempo (h)	Nivel de glucosa en sangre (mmol/l) (media)									
	C40-PEG-EX4					Ejemplo 1b (Lys ²⁷ -PEG _{20k} -Ej4)	Grupo de control (Ej-4)	Grupo no tratado		
	Ejemplo 1 (PEG _{5k})	Ejemplo 2 (PEG _{30k})	Ejemplo 3 (PEG _{30k})	Ejemplo 4 (PEG _{23k})	Ejemplo 5 (PEG _{50k})					
0	23,38	24,28	24,44	24,22	24,56	24,13	22,61	24,23		
0,5	7,62	7,96	7,86	7,97	7,63	7,97	6,95	24,21		
1	7,36	6,13	6,89	6,99	6,25	6,56	6,41	23,44		
2	5,09	5,29	5,04	4,96	5,45	5,24	5,80	24,58		
3	4,46	4,18	4,15	4,11	4,64	4,22	5,85	22,96		
4	4,93	4,34	4,66	4,54	4,23	4,29	8,02	24,54		
6	5,73	4,9	4,67	4,87	4,26	4,85	10,69	23,43		
8	9,04	4,57	5,11	4,66	4,69	5,13	16,01	24,94		
12	16,2	5,86	7,89	4,9	4,87	5,40	23,89	22,47		
24	21,1	8,54	15,09	5,52	5,11	12,98	-	24,42		
36	-	11,47	20,14	8,08	6,31	17,34	-	23,92		
48	-	15,34	24,21	8,66	7,26	20,45	-	22,66		
60	-	20,45	23,76	11,34	8,87	23,02	-	23,41		
72	-	23,02	-	14,12	13,49	-	-	22,26		
96	-	-	-	18,79	17,07	-	-	24,51		
120	-	-	-	24,53	23,02	-	-	23,75		

5 Como se muestra en la Tabla 4, el tiempo necesario para que el nivel de glucosa en sangre de exendina-4 unida con PEG específica del sitio C40 de los Ejemplos 1 a 5 de acuerdo con la presente invención volviera a aumentar de nuevo a 8,35 mmol/l se confirmó que era más prolongado que exendina-4 (7,3 horas) y especialmente para el Ejemplo 4 (C40-PEG_{23K}-Ej4) y el Ejemplo 5 (C40-PEG_{50K}-Ej4) en los que se había introducido PEG trímero, el nivel de glucosa en sangre se mantuvo durante 45,5 horas y 56,1 horas, respectivamente (referencia a la Figura 12).

10 Por lo tanto, se puede usar la composición de exendina-4 unida con PEG específica del sitio C40 de acuerdo con la presente invención, de forma beneficiosa, como medicación para la diabetes, habiendo solucionado la debilidad de la eliminación rápida de la medicación debido al bajo peso molecular de exendina-4 y por consiguiente manteniendo los niveles de glucosa en sangre bajos 7-8 veces más estables que los ejemplos Comparativos.

15 Mientras tanto, se puede formular el análogo de exendina-4 unido con PEG específico de sitio C40 de acuerdo con la presente invención en diversas formas. Lo siguiente es una ilustración de unos cuantos métodos de formulación que incluyen el análogo de exendina-4 unido con PEG específico del sitio C40 de acuerdo con la presente invención como principio activo, y la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplo de formulación 1: Producción de polvos

20 Análogo de exendina-4 unida con PEG específica del sitio C40 2 g
Lactosa 1 g
Se mezclaron los ingredientes y se organizaron en envases sellados para preparar los polvos.

Ejemplo de formulación 2: Producción de comprimidos

25 Análogo de exendina-4 unida con PEG específica del sitio C40 100 mg
Almidón de maíz 100 mg
Lactosa 100 mg
Estearato de magnesio 2 mg
30 Se mezclaron los ingredientes y se comprimieron de acuerdo con los métodos de preparación generales para la preparación de comprimidos.

Ejemplo de formulación 3: Producción de cápsula

35 Análogo de exendina-4 unida con PEG específica del sitio C40 100 mg
Almidón de maíz 100 mg
Lactosa 100 mg
Estearato de magnesio 2 mg
40 Se mezclaron los ingredientes y se organizaron en cápsulas de gelatina de acuerdo con los métodos de preparación generales para la preparación de cápsulas.

Ejemplo de formulación 4: Producción de inyecciones

45 Análogo de exendina-4 unida con PEG específica del sitio C40 100 mg
Manitol 180 mg
Na₂HPO₄·H₂O 26 mg
Agua destilada 2974 mg
Se incluyeron los ingredientes con la cantidad proporcionada de acuerdo con los métodos de preparación generales para la preparación de inyecciones.

50 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

55 Llevando a cabo la PEGilación selectiva de acuerdo con la invención, se puede aumentar el rendimiento de un análogo de exendina-4 en el que se introduce una cisteína (Cys) en el sitio n°. 40 del terminal-C y se somete a PEGilación con polietilenglicol (PEG) o derivados del mismo, y se puede aumentar el efecto de tratamiento de medicaciones y de este modo se puede usar de forma beneficiosa el análogo de exendina-4 como composición para prevenir o tratar enfermedades provocadas por la hipersecreción de insulina.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> B&L Delipharm, Corp.
- 5 <120> Análogo de exendina-4 pegilado con polietilenglicol o derivado del mismo, método de preparación del mismo, y composición farmacéutica para evitar o tratar diabetes, que contiene el mismo como principio activo
- <130> PABBF/P54793EP
- 10 <140> 12804683.6
- <141> 28-06-2012
- <150> KR-10-2011-0062858
- <151> 28-06-2011
- 15 <150> PCT/KR2012/005137
- <151> 28-06-2012
- <160> 2
- 20 <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
- <211> 40
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> exendina-4 de *Heloderma suspectum* con un C adicional en el extremo carboxilo
- 30 <400> 1

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1          5          10          15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
          20          25          30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys
          35          40
    
```

- 35 <210> 2
- <211> 39
- <212> PRT
- <213> *Heloderma suspectum*

- 40 <400> 2

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1          5          10          15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
          20          25          30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
          35
    
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un análogo de exendina-4 en el que hay introducida una cisteína (Cys) en el sitio nº. 40 del extremo terminal-C de la exendina-4 está PEGilado con un tipo trimérico de polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo, en donde el derivado de polietilenglicol está seleccionado entre succinimidilpropionato de metoxipolietilen glicol, metoxipolietilenglicol N-hidroxisuccinimida, metoxipolietilenglicol propionaldehído, metoxipolietilenglicol maleimida.
- 10 2. El análogo de exendina-4 de la reivindicación 1, en el que el polietien glicol o el derivado del mismo tienen un peso molecular de 5-60 kDa.
- 15 3. El análogo de exendina-4 de la reivindicación 2, en el que el polietien glicol o el derivado del mismo tienen un peso molecular de 20-50 kDa.
- 15 4. El análogo de exendina-4 de la reivindicación 1, en el que, el derivado de polietilenglicol es metoxipolietilenglicol maleimida trimérica.
- 20 5. Un método de preparación del análogo de exendina-4 de la reivindicación 1, comprendiendo el método: disolver exendina-4, en la que hay introducida una cisteína en el sitio nº. 40 del extremo terminal-C de la exendina-4, y un tipo trimérico de polietilenglicol o un derivado del mismo en una solución salina tampón de fosfato; y hacer reaccionar los ingredientes disueltos a temperatura ambiente, en donde el derivado de polietilenglicol está seleccionado entre succinimidilpropionato de metoxipolietilen glicol, metoxipolietilenglicol N-hidroxisuccinimida, metoxipolietilenglicol propionaldehído, metoxipolietilenglicol maleimida.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en donde la solución salina tampón de fosfato tiene un intervalo de pH de 7,2-7,8.
- 30 7. El método de la reivindicación 5, en el que la relación molar de la reacción de la exendina-4 que tiene la cisteína introducida y el polietilenglicol o un derivado del mismo es de 1:1-3.
- 30 8. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad provocada por la hipersecreción de insulina, en donde la composición comprende un análogo de exendina-4 de la reivindicación 1 como principio activo.
- 35 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad provocada por la hipersecreción de insulina es diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 o complicaciones de diabetes.

Fig. 1

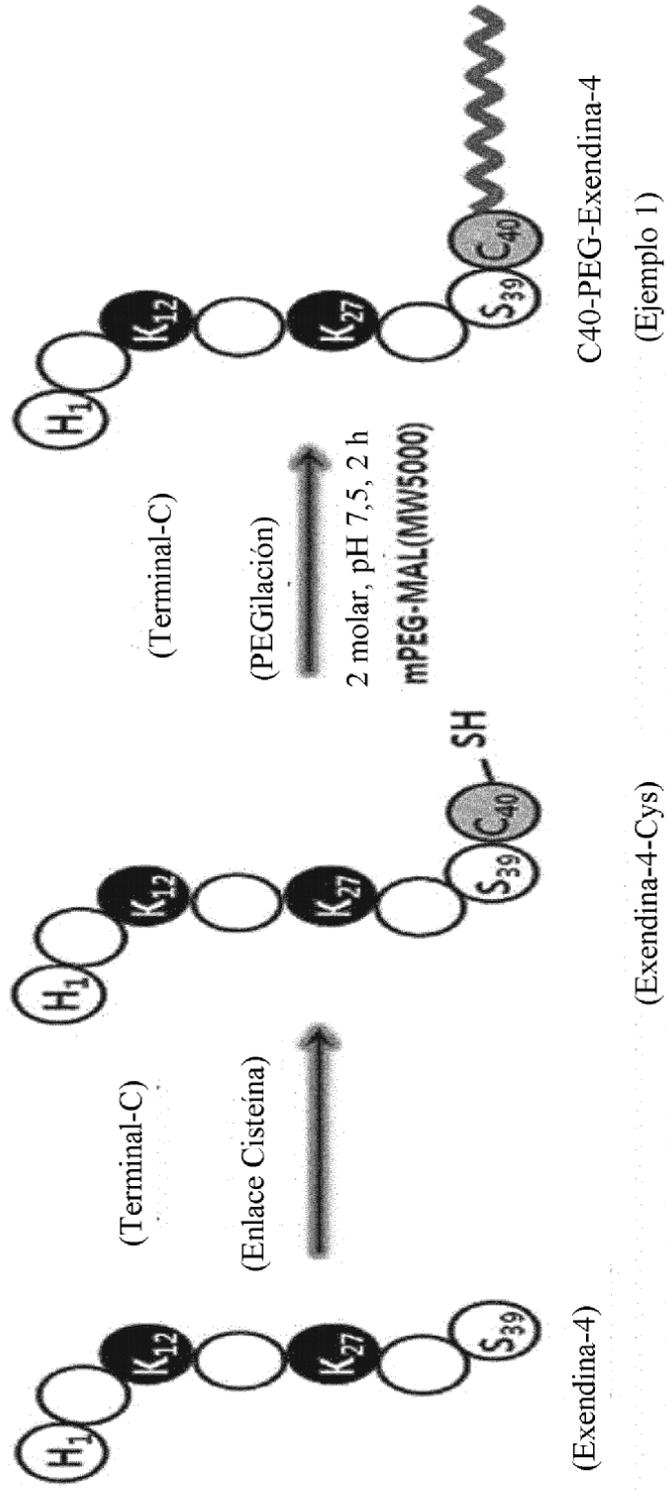


Fig. 2

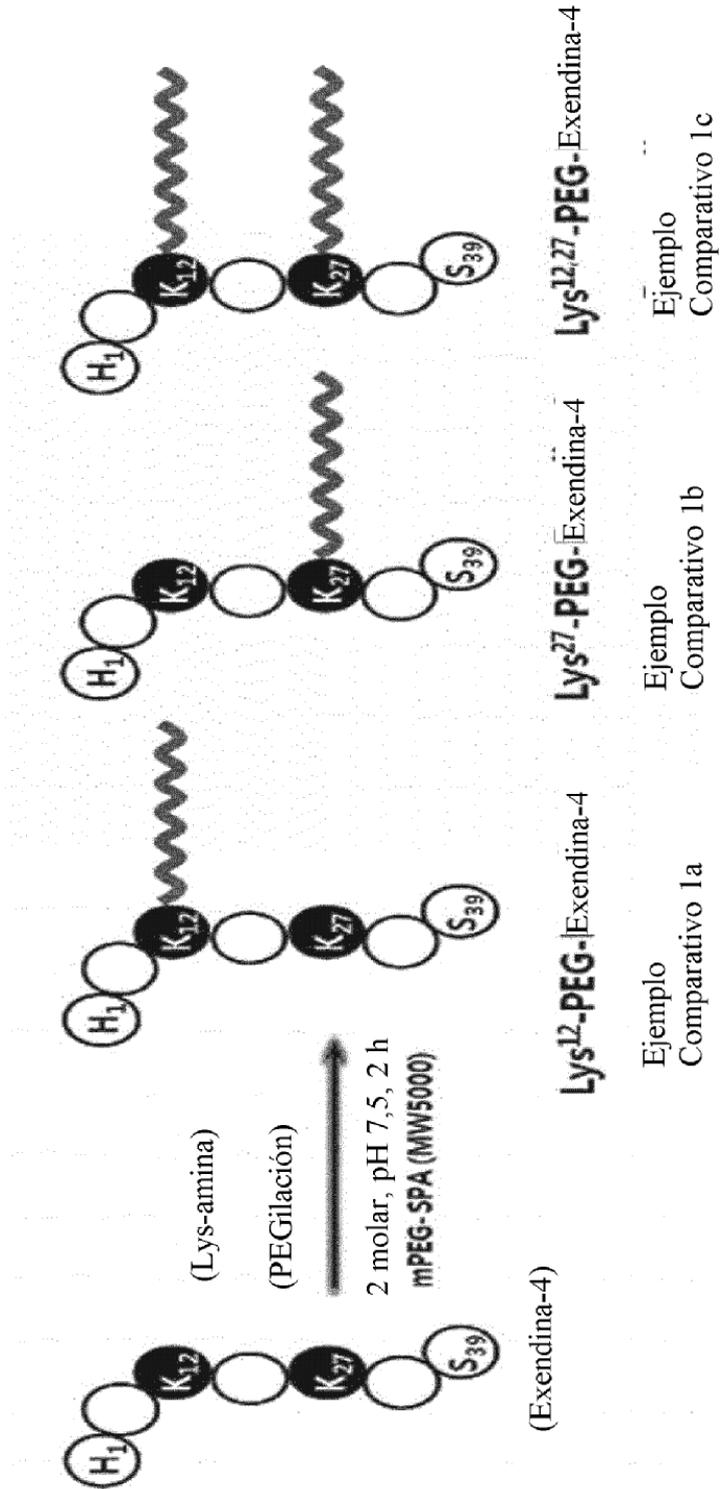


Fig. 3

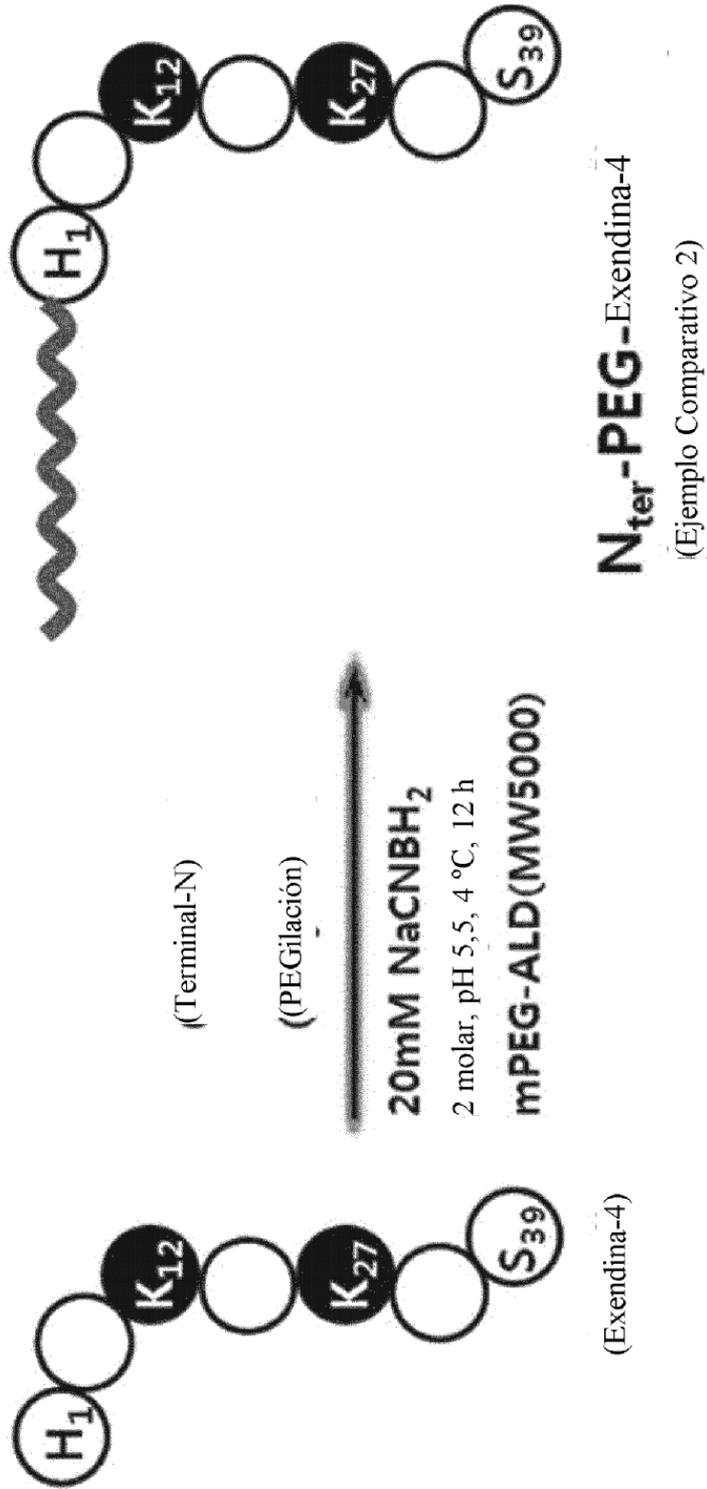


Fig. 4

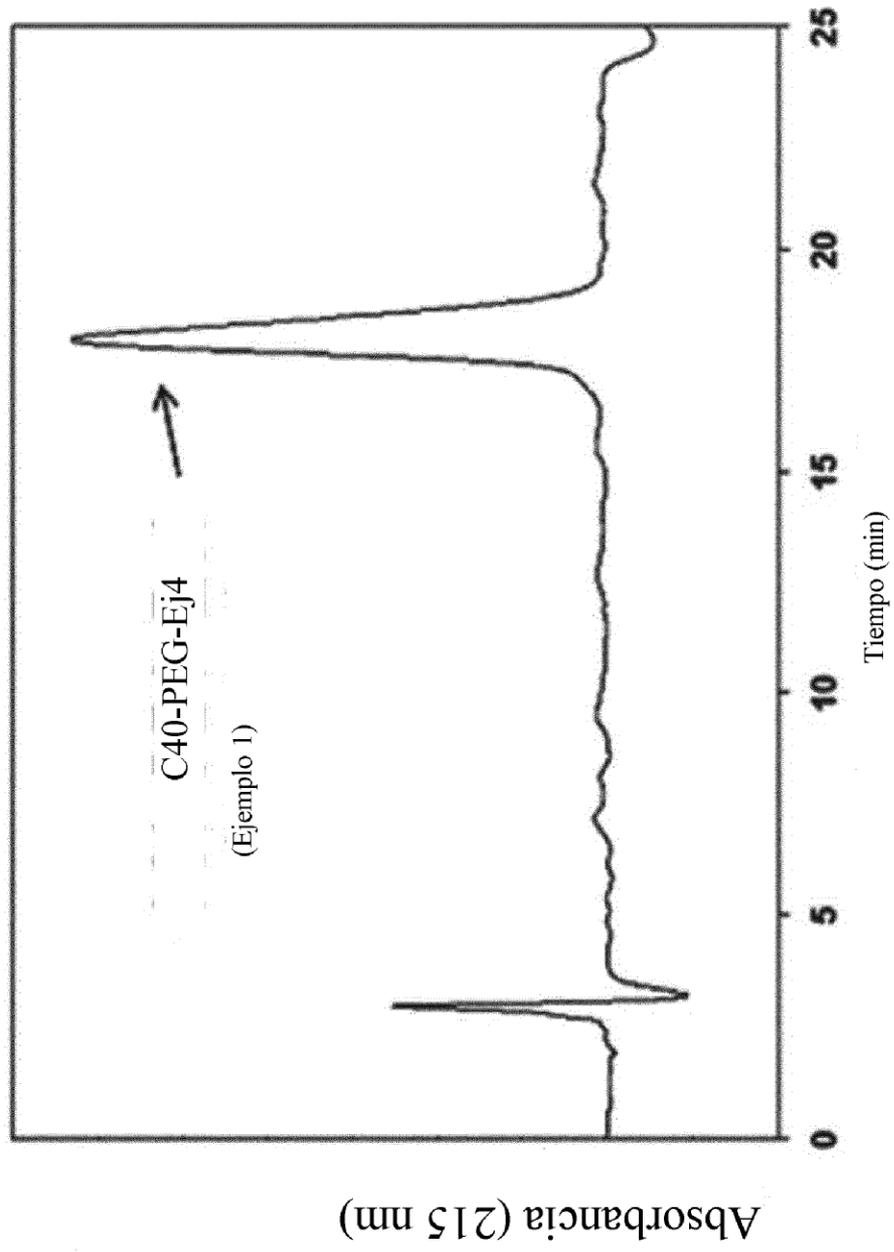


Fig. 5

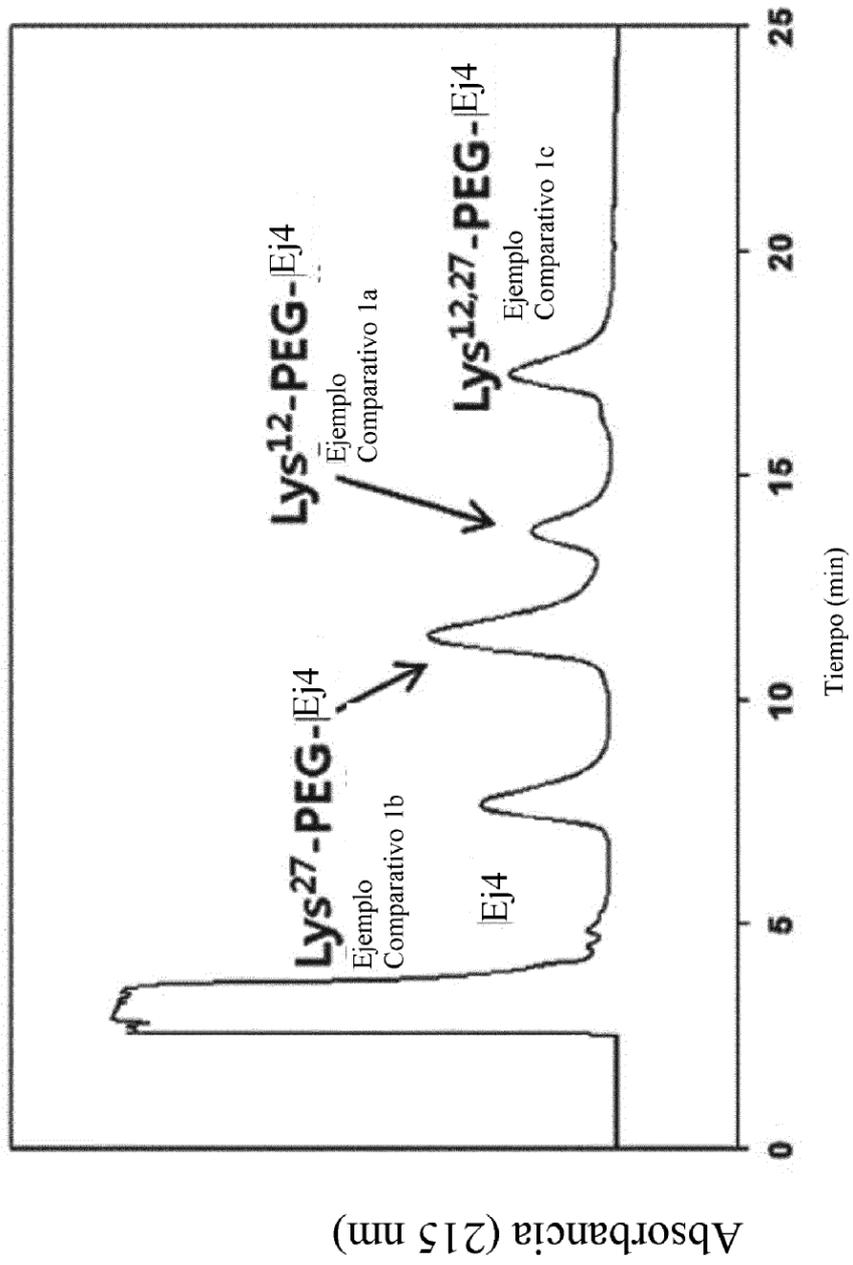


Fig. 6

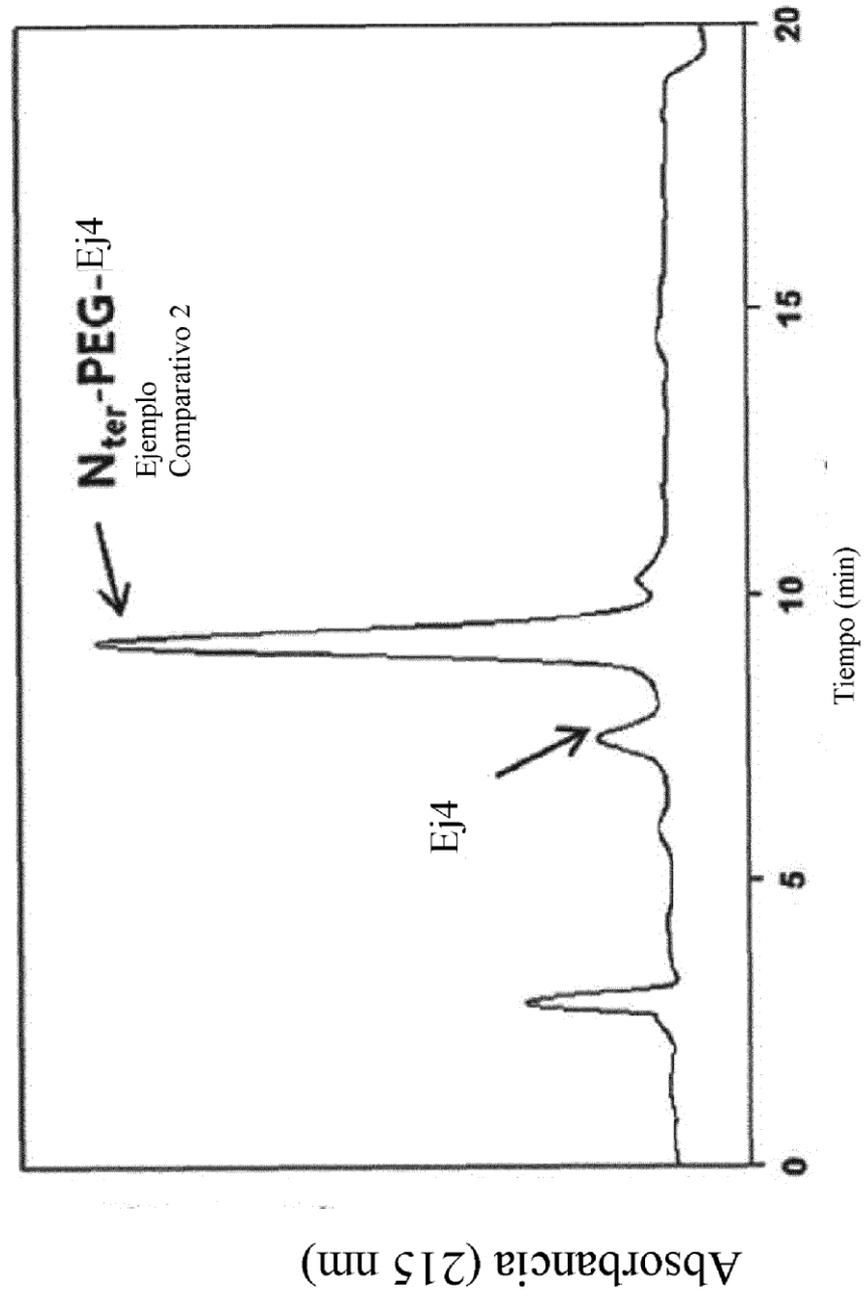


Fig. 7

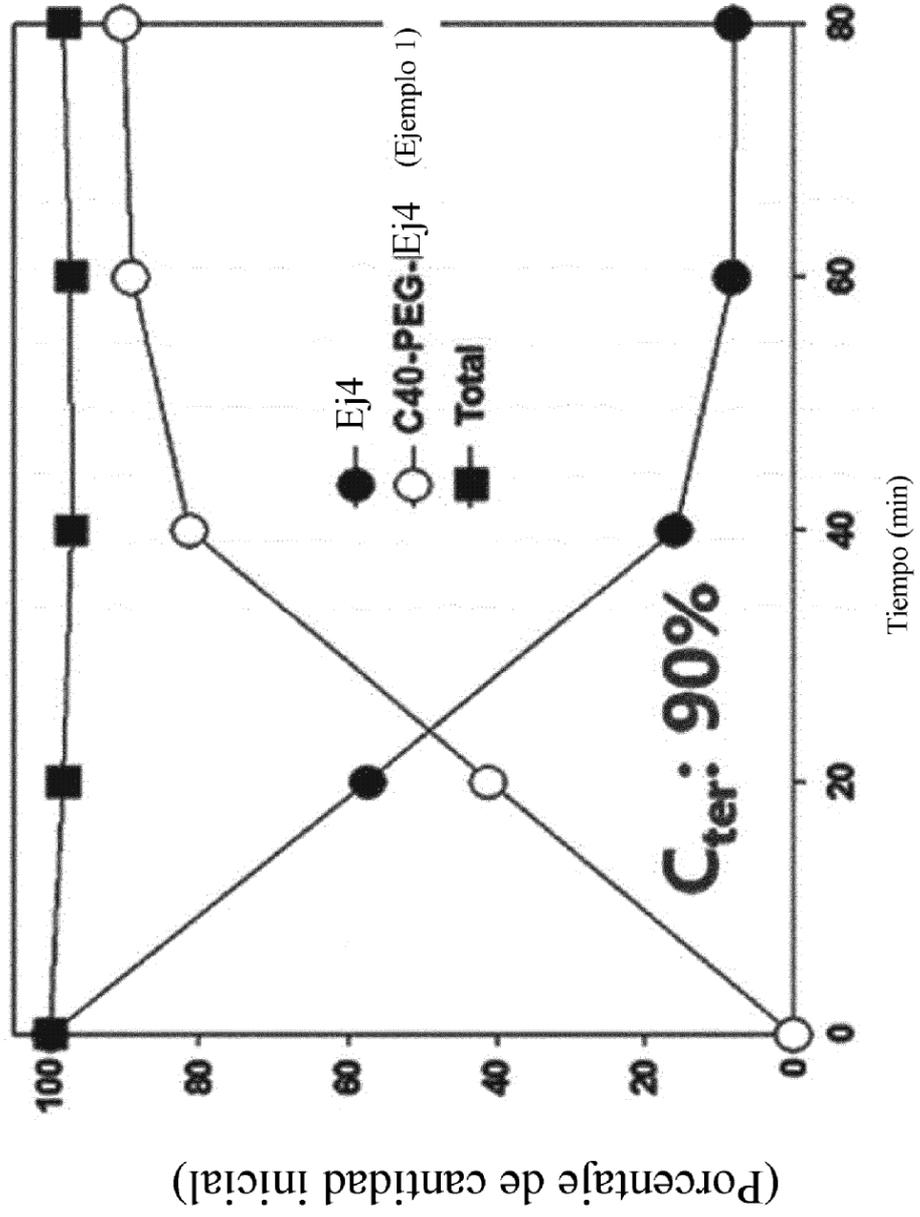
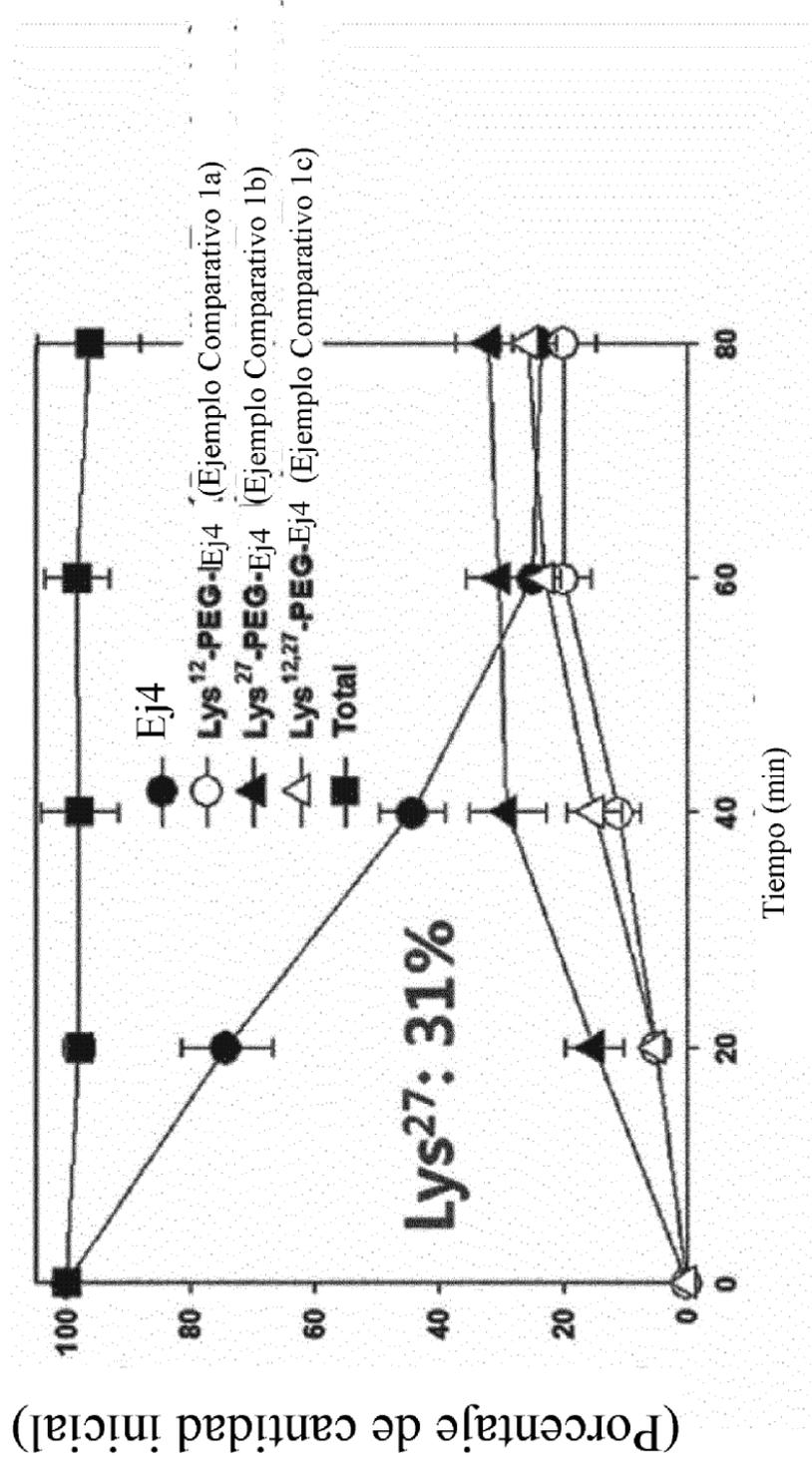


Fig. 8



(Porcentaje de cantidad inicial)

Fig. 9

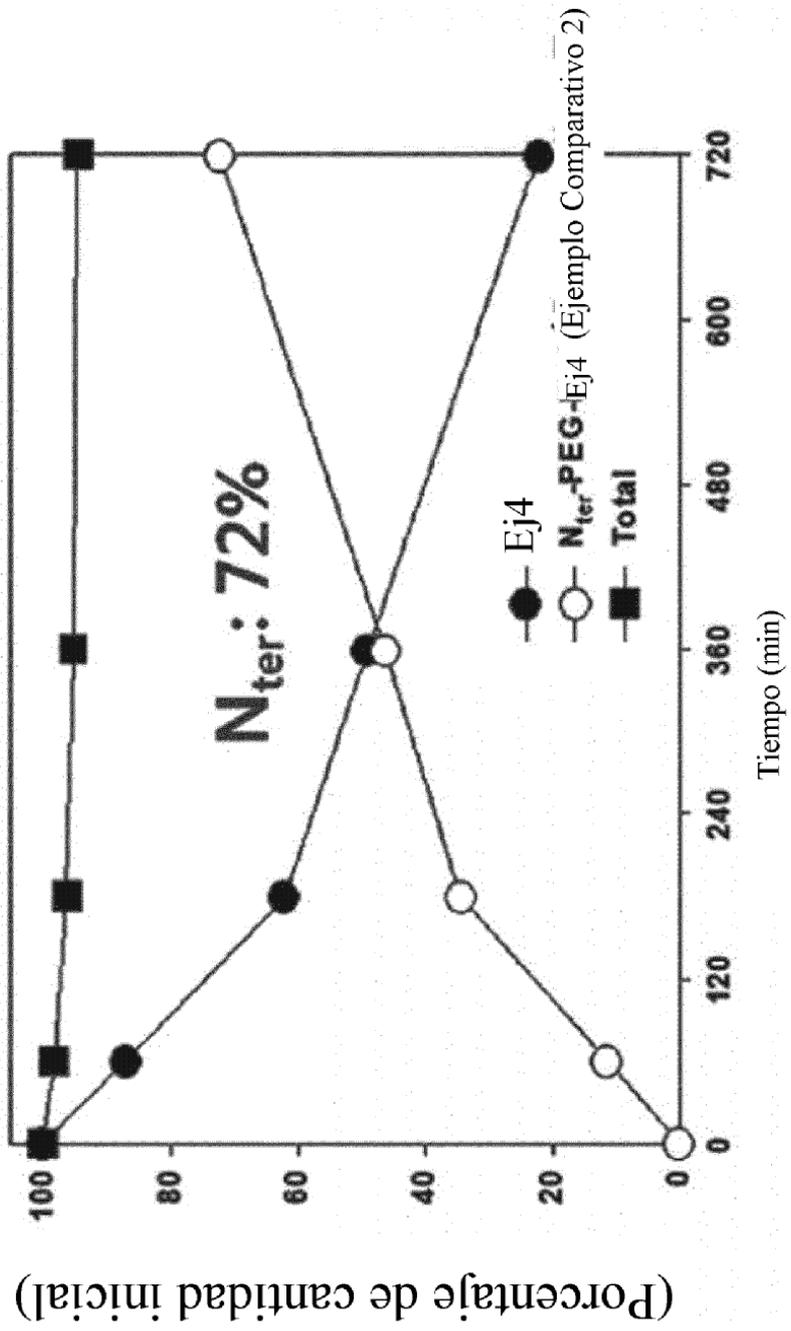


Fig. 10

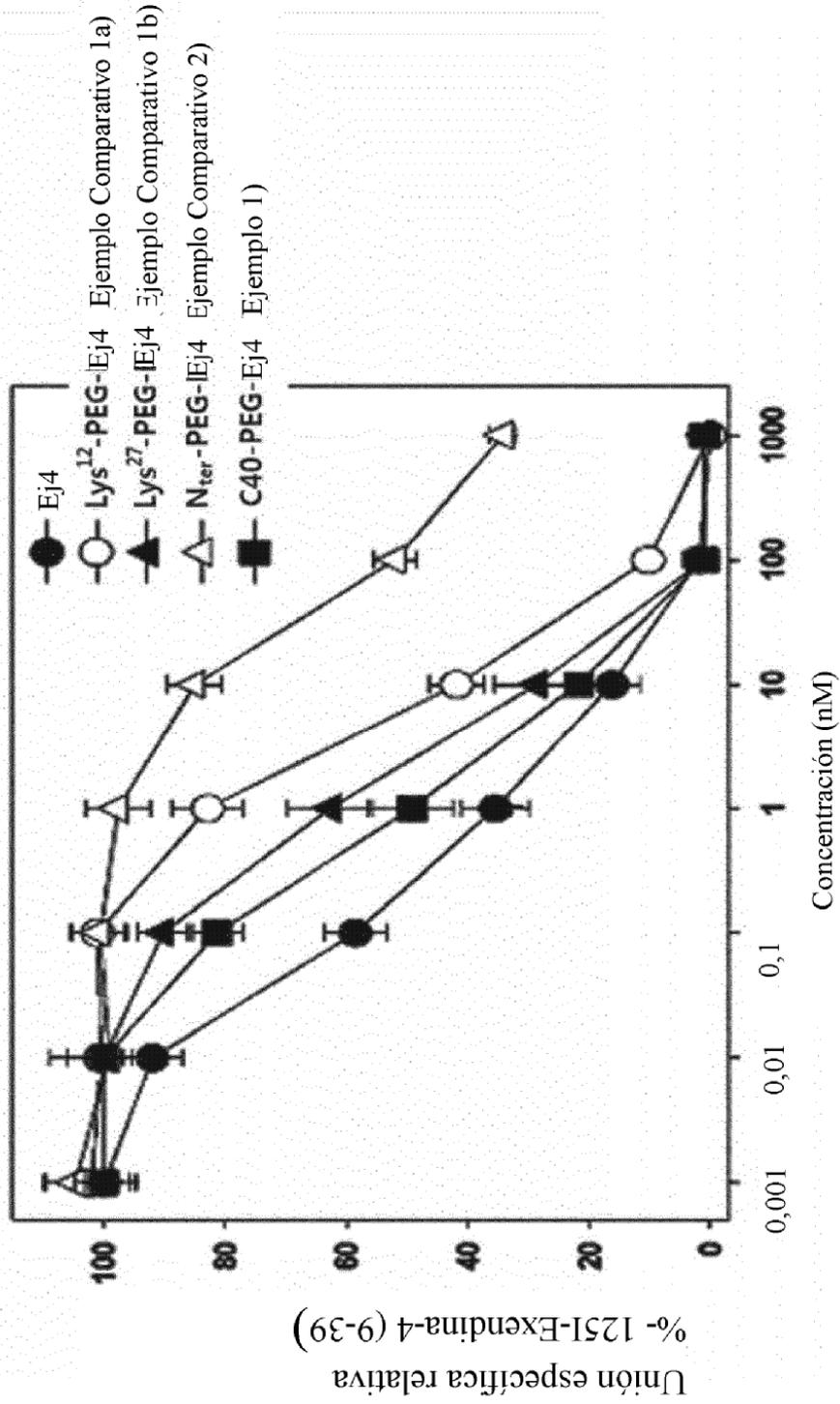


Fig. 11

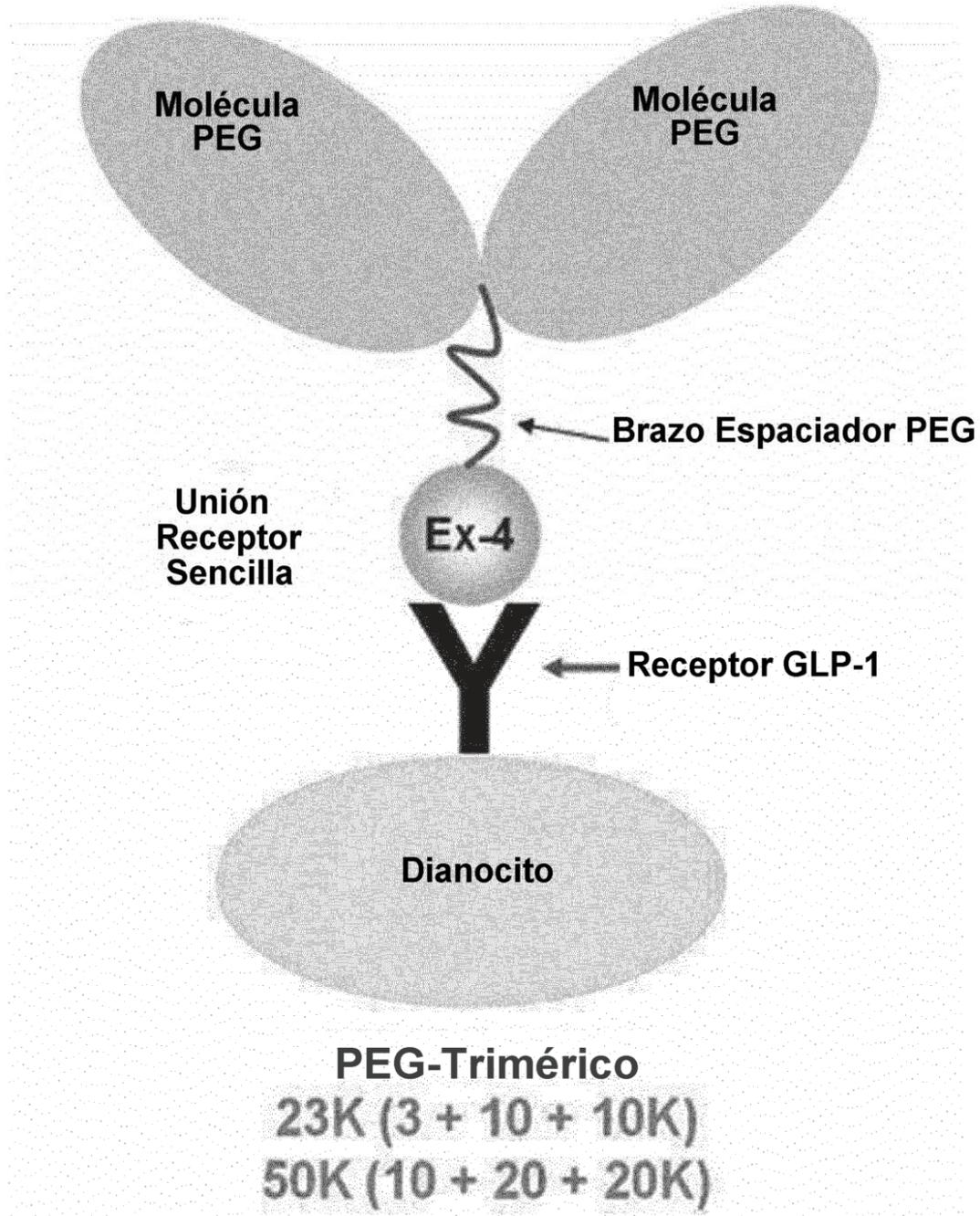


Fig. 12

