

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0609676-0 A2**

(22) Data de Depósito: 11/05/2006  
(43) Data da Publicação: 18/10/2011  
(RPI 2128)



\* B R P I 0 6 0 9 6 7 6 A 2 \*

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 47/48  
C07K 14/605  
A61P 3/10

(54) **Título:** COMPOSTO DE GLP-1 PEGUILADO, E, USO DO MESMO

(30) **Prioridade Unionista:** 13/05/2005 US 60/680688

(73) **Titular(es):** ELI LILLY AND COMPANY

(72) **Inventor(es):** Andrew Mark Vick, John Philip Mayer, Rohn Lee Millican, Wolfgang Glaesner

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006018284 de 11/05/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2006/124529de 23/11/2006

(57) **Resumo:** COMPOSTO DE GLP-1 PEGUILADO, E, USO DO MESMO. A invenção fornece compostos de GLP- 1 acoplados a duas moléculas de polietilenoglicol ou derivado deste, resultando em um peptídeo biologicamente ativo com uma meia vida prolongada e uma depuração mais lenta quando comparado com aquelas de peptídeo não PEGuilado. Estes compostos e composições de GLP- 1 PEGuilado são úteis para tratar condições ou desordens beneficiadas por diminuição de glicose sanguínea, diminuição de consumo alimentar, diminuição de esvaziamento gástrico ou intestinal, aumento de população de célula beta ( $\beta$ ), ou diminuição de motilidade gástrica ou intestinal.

## “COMPOSTO DE GLP-1 PEGUILADO, E, USO DO MESMO”

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a compostos de peptídeo 1 tipo glucagon (GLP-1) modificado com polietilenoglicol (PEG) e composições relacionadas e métodos úteis para tratar condições ou desordens beneficiadas por diminuição de glicose sanguínea, diminuição de consumo alimentar, diminuição de esvaziamento gástrico ou intestinal, aumento de número e/ou função de célula beta ( $\beta$ ) e/ou inibição de apoptose de célula B, ou diminuição de motilidade gástrica ou intestinal.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

GLP-1 induz numerosos efeitos biológicos tal como estimulando secreção de insulina, inibindo secreção de glucagon, inibindo esvaziamento gástrico, inibindo motilidade gástrica ou motilidade intestinal, estimulando utilização de glicose, e induzindo perda de peso. GLP-1 pode adicionalmente atuar para prevenir a deterioração de célula- $\beta$  pancreática que ocorre à medida que diabete melito não dependente de insulina (NIDDM) progride. Uma característica significativa de GLP-1 é sua capacidade de estimular secreção de insulina sem o risco associado de hipoglicemia. GLP-1 induz secreção de insulina apenas quando níveis de glicose estão elevados ao contrário de outras terapias que atuam aumentando expressão de insulina independente de se níveis de glicose estão elevados.

A utilidade de terapia envolvendo peptídeos GLP-1 foi limitada pelo fato de que GLP-1(1-37) é fracamente ativo, e os dois peptídeos truncados naturalmente ocorrentes, GLP-1(7-37)OH e GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, são rapidamente depurados *in vivo* e têm meias vidas *in vivo* extremamente curtas. È conhecido que dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) endogenamente produzida inativa peptídeos GLP-1 circulantes removendo os resíduos de histidina e alanina N terminais e é uma grande razão para a curta meia vida *in vivo*.

Embora várias abordagens tenham resultado em compostos de GLP-1 com uma meia vida mais longa ou maior potência do que aquelas de GLP-1 nativo, compostos adicionais são necessários para adicionalmente diminuir depuração e aumentar meia vida com isso otimizando a capacidade de GLP-1 ser útil como um terapêutico que pode ser administrado um número mínimo de vezes durante um período de tempo prolongado. Pedidos Internacionais Nos. PCT/US2004/006082 e PCT/US2000/11814 descrevem acoplamento covalente de um ou mais moléculas de PEG com vários compostos de GLP-1 e exendina. Estes compostos podem ter uma meia vida em excesso de 24 horas levando em conta menos administrações do composto de GLP-1 PEGuilado embora mantendo um alto nível sanguíneo do composto por um período de tempo prolongado.

Pesquisa adicional elucidou um problema caracterizado pelo fato de que a separação de PEG de um composto de GLP-1 PEGuilado ou exendina ocorre durante vida útil prolongada. Como um resultado, o peptídeo GLP-1 ou exendina livre aumenta o perfil inicial de exposição à concentração de pico através da janela terapêutica. Isto tem a possibilidade de aumentar os efeitos colaterais de náusea e vômito.

A presente invenção procura superar os problemas associados com a vida útil prolongada e o potencial de separação de PEG do composto de GLP-1 PEGuilado ou exendina introduzindo dois sítios de PEGuilação em um composto de GLP-1 ou exendina e então PEGuilando estes dois sítios de PEGuilação simultaneamente. As vantagens desta abordagem são pelo menos quádruplas. Primeiro, PEGuilação do compostos irá melhorar dramaticamente as meias vidas in vivo dos compostos. Segundo, PEGuilação do compostos irá desacelerar a taxa de absorção do composto e assim, reduzir estímulo inicial da droga que se acredita ser responsável pelos efeitos colaterais. Terceiro, PEGs lineares podem ser usados diretamente para PEGuilação e irão simplificar o procedimento de síntese. Quarto, PEGuilação acoplada irá

aliviar as questões associadas com vida útil prolongada e o potencial de separação de PEG do composto de GLP-1 PEGuilado ou exendina diminuindo a probabilidade de que ambos PEGs sejam separados da mesma molécula de peptídeo GLP-1 ou exendina.

5                   Adicionalmente, introduzir dois sítios de PEGuilação em um composto de GLP-1 ou exendina na extremidade C terminal do composto e então PEGuilar estes dois sítios de PEGuilação simultaneamente resultou em compostos PEGuilados tendo maior atividade sobre estes compostos PEGuilados caracterizados pelo fato de que pelo menos um dos sítios de PEGuilação não é na extremidade C terminal do peptídeo. Ademais, acoplar um ligante compreendendo dois sítios de PEGuilação na extremidade C terminal de um composto de GLP-1 e então PEGuilar estes dois sítios de PEGuilação simultaneamente resultou em compostos de GLP-1 PEGuilados tendo maior atividade do que aqueles compostos PEGuilados caracterizados pelo fato de que os sítios de PEGuilação são acoplados na extremidade C terminal de um composto de GLP-1 sem um ligante.

15                   Tais compostos de GLP-1 PEGuilados podem ser usados terapeuticamente para tratar indivíduos com desordens incluindo, mas não limitadas a, diabete, obesidade, anormalidades de motilidade gástrica e/ou intestinal, deficiência de célula beta ( $\beta$ ) (por exemplo células  $\beta$  insuficientes ou não funcionando), e anormalidades de esvaziamento gástrico e/ou intestinal com uma vantagem particular sendo que os compostos de GLP-1 PEGuilados da invenção requerem doses menores durante um período de 24 horas, aumentando tanto a conveniência para um indivíduo com necessidade de tal terapia como a probabilidade de adaptação do indivíduo com requerimentos de dosagem.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A invenção descrita neste lugar fornece compostos de GLP-1 acoplados covalentemente a duas moléculas de polietilenoglicol (PEG), ou

um derivado deste caracterizado pelo fato de que cada PEG é acoplado em um resíduo de cisteína, resultando em compostos de GLP-1 PEGuilados com uma meia vida de eliminação de pelo menos uma hora, ou pelo menos 3, 5, 7, 10, 15, 20 horas ou pelo menos 24 horas. Os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção têm um valor de depuração de 200 ml/h/kg ou menos, ou 180, 150, 120, 100, 80, 60 ml/h/kg ou menos, ou menos do que 50, 40 ou 20 ml/h/kg.

Compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção compreendem uma seqüência de aminoácidos da fórmula:

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Cys<sub>45</sub>-Xaa<sub>46</sub> Fórmula I (SEQ ID NO: 1)

10 em que Xaa<sub>8</sub> é: D-Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, ou Thr;

Xaa<sub>22</sub> é: Gly, Glu, Asp, ou Lys;

Xaa<sub>33</sub> é: Val ou Ile

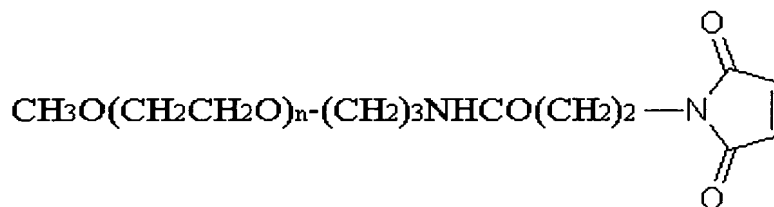
Xaa<sub>46</sub> é: Cys ou Cys-NH<sub>2</sub>

15 e em que uma molécula de PEG é acoplada covalentemente a Cys<sub>45</sub> e uma molécula de PEG é acoplada covalentemente a Cys<sub>46</sub> ou Cys<sub>46</sub>-NH<sub>2</sub>.

20 Preferivelmente, para os compostos de GLP-1 PEGuilados de Fórmula I: Xaa<sub>8</sub> é Gly ou Val; Xaa<sub>22</sub> é Gly ou Glu; Xaa<sub>33</sub> é Val ou Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys ou Cys-NH<sub>2</sub>. Também preferíveis são os compostos de GLP-1 PEGuilados de Fórmula I, em que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Val ou Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys ou Cys-NH<sub>2</sub>. Também preferíveis são os compostos de GLP-1 PEGuilados de Fórmula I, em que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Val; e Xaa<sub>46</sub> é Cys. Também preferíveis são os compostos de GLP-1 PEGuilados de Fórmula I, em que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Val; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub>. Também preferíveis são os compostos de GLP-1 PEGuilados de Fórmula I, em que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e

Xaa<sub>46</sub> é Cys. Também preferíveis são os compostos de GLP-1 PEGuilados de Fórmula I, em que Xaa<sub>s</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub>.

Os polímeros de polietilenoglicol ("PEG") usados na invenção têm pesos moleculares entre 500 e 100.000 daltons, ou entre 5.000 e 40.000 daltons, ou entre 20.000 e 60.000 daltons, ou entre 20.000 e 40.000 daltons, e podem ser moléculas lineares ou ramificadas, e podem ser derivados de polietilenoglicol como descrito na técnica. A molécula de PEG acoplada covalentemente a compostos de GLP-1 na presente invenção não é pretendida para ser limitada a um tipo particular. Preferivelmente o PEG é um Metóxi PEG maleimida linear de 20 quilodaltons. Mais preferivelmente o PEG é:



A presente invenção abrange um método de estimular o receptor de GLP-1 em um indivíduo com necessidade de tal estimulação, dito método compreendendo a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um composto de GLP-1 PEGuilado descrito neste lugar. Indivíduos com necessidade de estimulação de receptor de GLP-1 incluem aqueles com diabetes não dependente de insulina, hiperglicemia induzida por estresse, obesidade, desordens de motilidade ou esvaziamento gástrico e/ou intestinal incluindo, por exemplo, síndrome do intestino irritável, deficiência de célula beta (β), e dispepsia funcional.

## 20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Peptídeo Tipo Glucagon 1 (GLP-1) é um peptídeo de 37 aminoácidos secretado pelas células L do intestino em resposta à ingestão de alimento. Numerosos análogos e derivados de GLP-1 foram descritos na técnica. A presente invenção descreve modificações para compostos de GLP-1 que resultam em meia vida de eliminação prolongada e/ou depuração reduzida. Incorporação de resíduos de cisteína em sítios de aminoácidos

particulares do peptídeo fornece um grupo tiol ao qual um polietilenoglicol (PEG) ou derivado de PEG pode ser covalentemente acoplado resultando em um composto de GLP-1 PEGuilado.

O termo "composto de GLP-1" como usado neste lugar, inclui  
5 GLP-1 nativo, [GLP-1(7-37)OH ou GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>], análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, fragmentos biologicamente ativos de GLP-1, GLP-1 prolongado ou um análogo ou fragmento de um peptídeo GLP-1 prolongado, análogos de exendina-4 e derivados de exendina-4. Preferivelmente, um análogo de GLP-1 tem a seqüência de aminoácidos de GLP-1(7-37)OH ou um  
10 peptídeo GLP-1 prolongado de forma que 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos diferem do aminoácido na posição correspondente de GLP-1(7-37)OH ou um fragmento de GLP-1(7-37)OH ou modificado de forma que 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos diferem do aminoácido na posição correspondente de um peptídeo GLP-1 prolongado.

O termo "PEGuilado" quando se referindo a um composto de  
15 GLP-1 da presente invenção se refere a um composto de GLP-1 que é quimicamente modificado por acoplamento covalente de duas moléculas de polietilenoglicol ou um derivado deste. Além disso, é pretendido que o termo "PEG" se refira a polietilenoglicol ou um derivado deste como são conhecidos  
20 na técnica (veja, por exemplo, Patentes U.S. 5.445.090; 5.900.461; 5.932.462; 6.436.386; 6.448.369; 6.437.025; 6.448.369; 6.495.659; 6.515.100 e 6.514.491). Preferivelmente, em compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção, PEG (ou um derivado deste) é acoplado covalentemente a dois resíduos de cisteína introduzidos no composto de GLP-1.  
25 Preferivelmente, os dois resíduos de cisteína introduzidos no composto de GLP-1 estão em posição 45 e 46.

"Atividade insulínica" se refere à capacidade de estimular secreção de insulina em resposta a níveis elevados de glicose, com isso causando absorção de glicose por células e níveis plasmáticos de glicose

diminuídos. Atividade insulíntrópica pode ser verificada por métodos conhecidos na técnica, incluindo usando experimentos *in vivo* e ensaios *in vitro* que medem atividade de ligação de receptor de GLP-1 ou ativação de receptor, por exemplo, ensaios empregando células de ilhotas pancreáticas ou células de insulinoma, como descrito em Patente Européia 619.1322 para Gelfand, *et al.*, e Patente U.S. 5.120.712, respectivamente. Atividade insulíntrópica é rotineiramente medida em humanos medindo níveis de insulina ou níveis de C-peptídeo. Para os propósitos da presente invenção um ensaio *in vitro* de sinalização de receptor de GLP-1 é usado para determinar se um composto de GLP-1 PEGuilado da presente invenção irá exibir atividade insulíntrópica *in vivo*. Atividade insulíntrópica é uma atividade que pode ser usada para demonstrar que o composto de GLP-1 PEGuilado é biologicamente ativo. Todos os compostos de GLP-1 PEGuilados exemplificados da invenção têm atividade insulíntrópica (Veja Exemplo 6).

"Potência *in vitro*" como usado neste lugar, é a medida da capacidade de um peptídeo para ativar o receptor de GLP-1 em um ensaio baseado em célula. Potência *in vitro* é expressa como o "EC<sub>50</sub>" que é a concentração eficaz de composto que resulta em 50% de atividade em um único experimento de dose-resposta. Para os propósitos da presente invenção, potência *in vitro* é determinada usando um ensaio de fluorescência que emprega células HEK-293 que expressam estavelmente o receptor de GLP-1 humano. Estas células HEK-293 integraram estavelmente um vetor de DNA tendo um elemento de resposta de cAMP (CRE) dirigindo expressão do gene de luciferase. A interação de um composto de GLP-1 ou um composto de GLP-1 PEGuilado com o receptor inicia um sinal que resulta em ativação do elemento de resposta de cAMP e subsequente expressão de luciferase. Os valores de EC<sub>50</sub> para os compostos de GLP-1 PEGuilados listados em Exemplo 3 foram determinados usando o ensaio de luciferase descrito acima. Valores relativos de potência *in vitro* podem ser estabelecidos executando



Val8-GLP-1(7- 37)0H ou GLP-1 nativo como um controle e designando ao controle um valor referência de 100%.

O termo "meia vida plasmática" se refere ao tempo no qual metade das moléculas relevantes circula no plasma antes de serem depuradas.

5 Um termo usado alternativamente é "meia vida de eliminação." O termo "prolongada" ou "maior" usado no contexto de meia vida plasmática ou meia vida de eliminação indica que existe um aumento estatisticamente significativo na meia vida de um composto de GLP-1 PEGuilado em relação àquela da molécula de referência (por exemplo, a forma não PEGuilada do peptídeo ou  
10 o peptídeo nativo) se determinadas em condições comparáveis. Preferivelmente um composto de GLP-1 PEGuilado da presente invenção tem uma meia vida de eliminação de pelo menos uma hora, mais preferivelmente pelo menos 3, 5, 7, 10, 15, 20 horas e mais preferivelmente pelo menos 24 horas. A meia vida relatada neste lugar em Exemplos 4 e 5 são a meia vida de  
15 eliminação; é aquela que corresponde à taxa log-linear terminal de eliminação. Aqueles versados na técnica compreendem que meia vida é um parâmetro derivado que muda como uma função tanto de depuração como volume de distribuição.

Depuração é a medida da capacidade corporal de eliminar uma  
20 droga. À medida que depuração diminui devido, por exemplo, a modificações para uma droga, é esperado que meia vida aumente. Entretanto, esta relação recíproca é exata apenas quando não existe nenhuma mudança no volume de distribuição. Uma relação aproximada útil entre a meia vida log-linear terminal ( $t$ ), depuração ( $C$ ), e volume de distribuição ( $V$ ) é dada pela equação:

$$t_{1/2} \approx 0,693 (V/C).$$

25 Depuração não indica quanta droga está sendo removida mas, ao contrário, o volume de fluido biológico tal como sangue ou plasma que deveria ser completamente livre de droga para responder pela eliminação. Depuração é expressa como um volume por unidade de tempo. Os compostos de GLP-1

PEGuilados da presente invenção têm um valor de depuração de 200 ml/h/kg ou menos, ou 180, 150, 120, 100, 80, 60 ml/h/kg ou menos, ou 50, 40 ou 20 ml/h/kg ou menos (Veja Exemplo 4 e 5).

Na presente invenção, um aminoácido Cys é incorporado em posições 45 e 46 dos compostos de GLP-1. A molécula resultante é PEGuilada aos aminoácidos Cys resultando em uma molécula modificada que retém toda ou uma porção de atividade biológica embora tendo uma meia vida maior do que aquela da molécula não modificada ou do que aquela da molécula nativa.

Os compostos de GLP-1 para uso na presente invenção podem ser preparados usando métodos padrão de técnicas de síntese de peptídeo em fase de solução ou fase sólida.

Uma vez que um composto de GLP-1 é preparado e purificado, ele é PEGuilado ligando covalentemente duas moléculas de PEG ao composto de GLP-1. Uma ampla variedade de métodos foi descrita na técnica para conjugar covalentemente PEGs aos peptídeos (para artigo de revisão veja, Roberts, M. et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:459-476, 2002). PEGuilação de peptídeos no terminal carboxi pode ser realizada através de acoplamento enzimático usando peptídeo recombinante de GLP-1 como um precursor ou métodos alternativos conhecidos na técnica e descritos. Veja por exemplo Patente Norte-Americana 4.343.898 ou *International Journal of Peptide & Protein Research*.43:127-38, 1994. Um método para preparar os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção envolve o uso de PEG-maleimida para acoplar diretamente PEG a um grupo tiol do peptídeo. A introdução de uma funcionalidade de tiol pode ser atingida adicionando ou inserindo um resíduo de Cys sobre ou dentro do peptídeo em posições descritas acima. Uma funcionalidade de tiol também pode ser introduzida sobre a cadeia lateral do peptídeo (por exemplo acilação de grupo E-amino de lisina de um ácido contendo tiol). Um processo de PEGuilação da

presente invenção utiliza adição de Michael para formar um ligante de tioéster estável. A reação é altamente específica e ocorre em condições brandas na presença de outros grupos funcionais. PEG maleimida foi usada como um polímero reativo para preparar conjugados bioativos de PEG-proteína bem definidos. É preferível que o procedimento use um excesso molar composto de GLP-1 contendo tiol em relação a PEG maleimida para dirigir a reação até conclusão. As reações são preferivelmente realizadas entre pH 4,0 e 9,0 em temperatura ambiente por 1 a 40 horas. O excesso de peptídeo contendo tiol não PEGuilado é prontamente separado do produto PEGuilado por métodos convencionais de separação. Condições exemplares requeridas para PEGuilação de compostos de GLP-1 são descritas em Exemplo 1 e 2. PEGuilação de cisteína pode ser realizada usando PEG maleimida ou PEG maleimida bifurcado. Um PEG preferido é um Metóxi PEG maleimida linear de 20 quilodaltons.

Em sua forma típica, PEG é um polímero linear com grupos hidroxila terminais e tem a fórmula  $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ , onde  $n$  é de cerca de 8 a cerca de 4000. O hidrogênio terminal pode ser substituído por um grupo protetor tal como um grupo alquila ou arila. Preferivelmente, PEG tem pelo menos um grupo hidróxi, mais preferivelmente ele é um grupo hidróxi terminal. Ele é este grupo hidróxi que é preferivelmente ativado para reagir com o peptídeo. Existem muitas formas de PEG úteis para a presente invenção. Numerosos derivados de PEG existem na técnica e são adequados para uso na invenção. (Veja, por exemplo, Patentes U.S. 5.445.090; 5.900.461; 5.932.462; 6.436.386; 6.448.369; 6.437.025; 6.448.369; 6.495.659; 6.515.100 e 6.514.491 e Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* 6:150-165, 1995). A molécula de PEG acoplada covalentemente a compostos de GLP-1 na presente invenção não é pretendida para ser limitada a um tipo particular. Peso molecular de PEG é preferivelmente de 500-100.000 daltons e mais preferivelmente de 20.000-

60.000 daltons e mais preferivelmente de 20.000-40.000 daltons. PEG pode ser linear ou ramificado.

Compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção têm uma atividade biológica *in vitro* que é pelo menos 0,5% daquela de GLP-1 nativo ou de Val<sub>8</sub>-GLP-1(7-37)OH. Compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção têm uma atividade biológica *in vitro* que é pelo menos 1% daquela de GLP-1 nativo ou de Vals-GLP-1(7-37)OH. Compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção têm uma atividade biológica *in vitro* que é pelo menos 3% daquela de GLP-1 nativo ou de Val<sub>8</sub>-GLP-1(7-37)OH. Tal atividade biológica pode ser determinada pelo ensaio de potência *in vitro* como descrito neste lugar (Exemplo 3) ou por outros ensaios de GLP-1 conhecidos na técnica. Embora alguns compostos de GLP-1 PEGuilados da invenção possam ter atividade biológica inferior do que aquela de GLP-1 nativo ou de Vals-GLP-1(7-37)OH se medida em um ensaio particular; esta diminuição de atividade é compensada pela meia vida prolongada e/ou menor valor de depuração do composto.

Administração dos compostos de GLP-1 PEGuilados pode ser através de qualquer via conhecida por ser eficaz pelo médico de verso habitual. Parenteral periférica é um tal método. Administração parenteral é geralmente entendida na literatura médica como a injeção de uma forma de dosagem no corpo por uma seringa estéril ou algum outro dispositivo mecânico tal como uma bomba de infusão. Vias parenterais periféricas podem incluir vias de administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, e intraperitoneal. Os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção também podem ser cômodos para administração por vias oral, retal, nasal, ou respiratória inferior, que são vias não parenterais. Destas vias não parenterais, a via respiratória inferior e a via oral são preferidas.

Os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção podem ser usados para tratar uma ampla variedade de doenças e condições.

Os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção exercem primariamente seus efeitos biológicos atuando em um receptor referido como o "receptor de GLP-1." Indivíduos com doenças e/ou condições que respondem favoravelmente à estimulação de receptor de GLP-1 ou à administração de compostos de GLP-1 portanto podem ser tratados com os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção. Estes indivíduos são ditos "estarem com necessidade de tratamento com compostos de GLP-1" ou "com necessidade de estimulação de receptor de GLP-1". Ao incluídos indivíduos com diabetes não dependente de insulina, diabetes dependente de insulina, derrame (veja WO 00/16797), infarto do miocárdio (veja WO 98/08531), obesidade (veja WO 98/19698), mudanças catabólicas depois de cirurgia (veja Patente U.S. 6.006.753), dispepsia funcional e síndrome do intestino irritável (veja WO 99/64060). Também são incluídos indivíduos requerendo tratamento profilático com um composto de GLP-1, por exemplo, indivíduos em risco de desenvolver diabetes não dependente de insulina (veja WO 00/07617). Indivíduos com tolerância à glicose prejudicada ou glicose em jejum prejudicada, indivíduos cujo peso corporal é cerca de 25% acima de peso corporal normal para a altura e construção corporal do indivíduo, indivíduos com uma pancreatectomia parcial, indivíduos tendo um ou mais progenitores com diabetes não dependente de insulina, indivíduos que tiveram diabetes gestacional e indivíduos que tiveram pancreatite aguda ou crônica estão em risco de desenvolver diabetes não dependente de insulina.

Uma quantidade eficaz dos compostos de GLP-1 PEGuilados descritos neste lugar é a quantidade que resulta em um efeito terapêutico e/ou profilático desejado sem causar efeitos colaterais inaceitáveis quando administrada a um indivíduo com necessidade de estimulação de receptor de GLP-1. Um "efeito terapêutico desejado" inclui um ou mais dos seguintes: 1) uma melhora do(s) sintoma(s) associado(s) com a doença ou condição; 2) um atraso no início dos sintomas associados com a doença ou condição; 3)

longevidade aumentada comparada com a ausência do tratamento; e 4) maior qualidade de vida comparada com a ausência do tratamento. Por exemplo, uma "quantidade eficaz" de um composto de GLP-1 PEGuilado para o tratamento de diabetes é a quantidade que deve resultar em maior controle de concentração de glicose sanguínea do que na ausência de tratamento, com isso resultando em um atraso no início de complicações diabéticas tal como retinopatia, neuropatia ou doença renal. Uma "quantidade eficaz" de um composto de GLP-1 PEGuilado para a prevenção de diabetes é a quantidade que deve atrasar, comparada com a ausência de tratamento, o início de elevados níveis de glicose sanguínea que requerem tratamento com drogas anti-hiperglicêmicas tal como sulfonil uréias, tiazolidinadionas, metformina, insulina e/ou biguanidinas. Tipicamente, os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção serão administrados de forma que níveis plasmáticos estejam dentro da variação de cerca de 5 picomoles/litro e cerca de 200 picomoles/litro. Níveis plasmáticos ótimos para Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH foram determinados serem entre 30 picomoles/litro e cerca de 200 picomoles/litro.

A dose de um composto de GLP-1 PEGuilado eficaz para normalizar glicose sanguínea de um paciente irá depender de um número de fatores, entre os quais estão incluídos, sem limitação, o sexo, peso e idade do indivíduo, a severidade de incapacidade de regular glicose sanguínea, a via de administração e biodisponibilidade, o perfil farmacocinético do composto de GLP-1 PEGuilado, a potência, e a formulação. Uma variação de dose típica para os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção irá variar de cerca de 0,01 mg por dia a cerca de 1000 mg por dia para um adulto. Preferivelmente, a dosagem varia de cerca de 0,1 mg por dia a cerca de 100 mg por dia, mais preferivelmente de cerca de 1,0 mg/dia a cerca de 10 mg/dia.

É preferível que os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção sejam administrados ou uma vez a cada duas semanas ou uma vez por semana. Dependendo da doença sendo tratada, pode ser

necessário administrar os compostos de GLP-1 PEGuilados mais freqüentemente tal como duas ou três vezes por semana.

Um "indivíduo" é um mamífero, preferivelmente um humano, mas também pode ser um animal, por exemplo, animais de companhia (por exemplo, cachorros, gatos, e os semelhantes), animais de produção (por exemplo, vacas, ovelhas, porcos, cavalos, e os semelhantes) e animais de laboratório (por exemplo, ratos, camundongos, porquinhos-da-índia, e os semelhantes).

Os peptídeos usados para gerar os compostos de GLP-1 PEGuilados da presente invenção podem ser preparados usando métodos padrão de técnicas de síntese de peptídeo em fase de solução ou fase sólida.

A invenção é ilustrada pelos exemplos seguintes que não são pretendidos para serem limitantes de maneira alguma.

### EXEMPLOS

#### 15 Exemplo 1 - PEGuilação de análogos relacionados a GLP-1:

Reações de PEGuilação são realizadas em condições que permitem a formação de uma ligação tioéter. Especificamente, o pH da solução varia de cerca de 4 a 9 e as concentrações de peptídeo contendo tiol variam de 1 a 10 de excesso molar de concentração de metóxi PEG2-MAL.

20 As reações de PEGuilação normalmente são realizadas em temperatura ambiente. O peptídeo GLP-1 PEGuilado é então isolado usando cromatografia de troca iônica HPLC de fase reversa, ou cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). Análogos de GLP-1 PEGuilados são caracterizados usando RP-HPLC analítica, HPLC-SEC, SDS-PAGE, e/ou Espectrometria de Massa

25 MALDI.

Peptídeos GLP-1 contendo tiol são reagidos com polietilenoglicol-maleimida (PEG-maleimida) para produzir derivados com PEG covalentemente acoplado através de uma ligação tioéter. Por exemplo, um composto de GLP-1, de 46aa de comprimento; 7,5 mg, 1,8  $\mu$ mol é

dissolvido em 2 ml de 200 mM de tampão fosfato contendo 20 mM de EDTA, pH 7,4. A solução é então purificada com argônio. A esta solução são adicionados 40 mg de metoxi-PEG-MAL, um PEG maleimida linear ou bifurcado (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama) (0,55:1 mole/proporção molar de PEG para peptídeo). A reação é realizada por 2 horas. Então 25 mg do peptídeo PEGuilado é purificado por RP-HPLC, caracterizado por HPLC de exclusão de tamanho, e testado para atividade *in vitro*.

#### Exemplo 2 - Reação de 2X20kDa-PEG-maleimida com análogos de GLP

10 Análogos de GLP-1 são seletivamente PEGuilados nos resíduos de cisteína introduzidos usando mPEG de 20 kDa linear ativado por maleimida (NOF, Inc.). Para a reação de PEGuilação, o peptídeo a ser PEGuilado é dissolvido em 100 mM de tampão NH<sub>4</sub>Ac contendo 10mM de EDTA a pH 6,8 e um excesso molar de 1,25 vez de mPEG de massa de 20 kDa é adicionado. A reação é permitida para agitar em temperatura ambiente por 1-4 horas e cromatografia de troca catiônica SP-Sefarose é usada para separar composto PEGuilado de PEG livre e peptídeo livre. O conjugado é dessalinizado por RP-HPLC e liofilizado.

#### Exemplo 3 - Ensaio de atividade *in vitro*

20 Células HEK-293 expressando estavelmente o receptor de GLP-1 humano, usando um sistema CRE-Luciferase, are semeadas em 30.000 células/poço/80 µl de meio DMEM F12 com pouco soro em placas de 96 poços. No dia depois de semeadura, alíquotas de 20 µl de proteína de teste dissolvidas em 0,5% de BSA são misturadas e incubadas com as células por 5 horas. Geralmente 10 diluições contendo de 0,001nM a 10nM são preparadas para os compostos de GLP-1 de teste e 0,0003nM e 3nM são preparadas para o padrão Val<sub>8</sub>-GLP-1(7-37)OH antes de adição às células para gerar uma curva dose resposta a partir da qual os valores de EC<sub>50</sub> são determinados. Depois de incubação, 100 µl de reagente de Luciferase é adicionado



diretamente a cada placa e misturado suavemente por 2 minutos. Placas são colocadas em um luminômetro Tri-lux e emissão de luz resultando de expressão de luciferase é calculada. O valor médio de  $EC_{50}$  para composto de GLP-1 PEGuilado de Fórmula I, caracterizada pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys é 0,22-1:0,03 nM. O valor médio de  $EC_{50}$  para composto de GLP-1 PEGuilado de Fórmula I, caracterizada pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub> é 0,36±0,04 nM.

#### Exemplo 4 - Análise farmacocinética de peptídeo GLP-1 derivado

Um composto de GLP-1 PEGuilado de Fórmula I, caracterizada pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub> é administrado por vias intravenosa (IV) ou subcutânea (SC) em uma dose de 0,1 mg/kg para ratos SD machos. Os animais (3 ratos por grupo) são sangrados em vários momentos entre 0 e 192 horas depois de dosagem. Plasma é coletado de cada amostra e analisado por radioimunoensaio N terminal específico. Parâmetros farmacocinéticos são calculados usando métodos não compartimentais (WinNonlin Pro). Por administração IV, o análogo de GLP-1 PEGuilado tem uma meia vida de eliminação de aproximadamente 1,2 dias enquanto que por administração SC o análogo de GLP-1 PEGuilado tem uma meia vida de eliminação de aproximadamente 1,1 dias. Nenhuma observação clínica adversa é associada com administração IV ou SC de 0,1 mg/kg. Meia vida de eliminação prolongada, depuração lenta e biodisponibilidade subcutânea (aproximadamente 30%) são observadas para o composto. Dados representativos são mostrados abaixo em Tabela 1

Tabela 1 -

Valores médios (±SD) de parâmetro PK para um composto de GLP-1 PEGuilado de Fórmula I, caracterizada pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub> seguindo administração intravenosa ou subcutânea de 0,1 mg/kg para ratos SD machos.

Via	C <sub>max</sub> <sup>a</sup> (ng/mL)	T <sub>max</sub> <sup>b</sup> (h)	AUC <sub>0-last</sub> <sup>c</sup> (ng*h/mL)	t <sub>1/2</sub> <sup>d</sup> (h)	CL/F <sup>e</sup> (mL/h/kg)	V <sub>ss</sub> /F <sup>f</sup> (mL/kg)
IV	2020 (235)	0,08 (0,00)	52292 (4546)	25,8 (2,2)	1,9 (0,2)	54 (2,5)
SC (SD)	191 (31)	24,0 (0,0)	15423 (2821)	28,3 (0,8)	6,5 (1,2)	268 (56)

<sup>a</sup> Concentração plasmática máxima observada.

<sup>b</sup> Tempo de concentração plasmática máxima observada.

<sup>c</sup> Área sob a curva de concentração plasmática-tempo medida de 0 até último ponto de tempo.

<sup>d</sup> Meia vida de eliminação.

<sup>e</sup> Depuração corporal total como uma função de biodisponibilidade.

<sup>f</sup> Volume de estado constante de distribuição como uma função de biodisponibilidade,

Quando Valg-GLP(7-37)OH é similarmente administrado IV a ratos Fischer 344 em uma dose de 10 Kg/kg, valores profundamente diferentes de depuração e meia vida de eliminação são obtidos como listado abaixo.

Depuração: 1449 ml/h/kg

t<sub>1/2</sub> (h): 0,05

#### Exemplo 5 - Análise farmacocinética de peptídeo GLP-1 derivado

Um composto de GLP-1 PEGuilado de Fórmula I, caracterizada pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub> é administrado por via subcutânea (SC) em uma dose de 0,01 mg/kg para macacos Cynomolgus machos. Os animais são sangrados em vários momentos entre 0 e 168 horas depois de dosagem. Soro é coletado de cada amostra e analisado por radioimunoensaio N terminal específico. Parâmetros farmacocinéticos são calculados usando métodos não compartimentais (WinNonlin Pro). Dados representativos são mostrados abaixo em Tabela 2.

Tabela 2 -

Valores médios (±SD) de parâmetro PK para um composto de GLP-1 PEGuilado de Fórmula I, caracterizada pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub> seguindo administração subcutânea de 0,01 mg/kg para macacos Cynomolgus machos.

Animal #	C <sub>max</sub> <sup>a</sup> (ng/mL)	T <sub>max</sub> <sup>b</sup> (h)	AUC <sub>0-last</sub> <sup>c</sup> (ng*h/mL)	t <sub>1/2</sub> <sup>d</sup> (h)	CL/F <sup>e</sup> (mL/h/kg)	V <sub>ss</sub> /F <sup>f</sup> (mL/kg)
Média	69,49	48	7464,78	75,69	1,06	117,15
SD	17,07	0	1612,03	11,67	0,26	44,89

*Abreviações:* SD = desvio padrão

<sup>a</sup> Concentração no soro máxima observada.

<sup>b</sup> Tempo de concentração no soro máxima observada.

<sup>c</sup> Área sob a curva de concentração no soro-tempo medida de 0 até último ponto de tempo.

<sup>d</sup> Estimativa de meia vida de eliminação.

<sup>e</sup> Depuração corporal total como uma função de biodisponibilidade.

<sup>f</sup> Volume de estado constante de distribuição como uma função de biodisponibilidade.

### Exemplo 6 - Análise farmacodinâmica de peptídeo GLP-1 derivado

Um composto de GLP-1 PEGuilado de Fórmula I, caracterizada pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val; Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub> é administrado por via subcutânea (SC) em uma dose de 0,01 mg/kg para macacos *Cynomolgus* machos. Uma infusão intravenosa escalonada de glicose é conduzida imediatamente antes de administração SC de veículo controle (salina tamponada com fosfato) e 1, 5, e 7 dias depois de administração SC de 0,01 mg/kg de análogo de GLP-1 PEGuilado. Procedimentos de infusão intravenosa escalonada de glicose são conduzidos em macacos sedados depois de um jejum de 16 horas. Amostras de sangue são extraídas em 10 minutos antes de começo de infusão de glicose e imediatamente antes de começo de infusão de glicose para definir linha de base. Uma infusão escalonada de glicose (20% de dextrose) é então iniciada em uma taxa de 10 mg/kg/min por 20 minutos seguida por uma infusão de 25 mg/kg/min por uns 20 minutos adicionais. Amostras de sangue são extraídas em intervalos de 10 minutos durante o período de infusão. Níveis de insulina são determinados por imunoensaio. Atividade insulínica é demonstrada por pelo menos 7 dias (em relação a placebo; p<0,0001) seguindo uma única injeção SC de 0,01 mg/kg do análogo de GLP-1 PEGuilado. Dados representativos são mostrados abaixo em Tabela 3.

Tabela 3 -

Valores médios (±SD) de parâmetro PD para um composto de GLP-1 PEGuilado de Fórmula 1, caracterizada pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val;

Xaa<sub>22</sub> é Glu; Xaa<sub>33</sub> é Ile; e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub> seguindo administração subcutânea de 0,01 mg/kg para macacos Cynomolgus machos.

AUC de Insulina		AUClast (pM*min)
Grupo Veículo	Média	
	SD	5789
	SE	2363
Dia 1	Média	30862
	SD	10770
	SE	4397
Dia 5	Média	27203
	SD	6507
	SE	2657
Dia 7	Média	28542
	SD	7685
	SE	3137

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Eli Lilly and Company

<120> Compostos de GLP-1 Peguilados

<130> X-17063

<160> 1

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construto sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa em posição 2 é Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, ou Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Ala é D-isômero

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa em posição 16 é Gly, Glu, Asp, ou Lys

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa em posição 27 é Val ou Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> Xaa em posição 40 é Cys ou Cys-NH<sub>2</sub>

<400> 1

His	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Xaa
1		5		10				15							

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Xaa	Lys	Gly	Gly	Pro	Ser
	20		25				30								

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Cys	Xaa
	35					40	

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto de GLP-1 PEGuilado, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de aminoácidos da fórmula:

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-  
Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Cys<sub>45</sub>- Xaa<sub>46</sub> Fórmula I (SEQ ID NO: 1)

em que Xaa<sub>8</sub> é: D-Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, ou Thr;

5 Xaa<sub>22</sub> é: Gly, Glu, Asp, ou Lys;

Xaa<sub>33</sub> é: Val ou Ile

Xaa<sub>46</sub> é: Cys ou Cys-NH<sub>2</sub>

10 e em que uma molécula de PEG é acoplada covalentemente a Cys<sub>45</sub> e uma molécula de PEG é acoplada covalentemente a Cys<sub>46</sub> ou Cys<sub>46</sub>-NH<sub>2</sub>.

2. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Gly, ou Val, e Xaa<sub>22</sub> é Gly, ou Glu.

15 3. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com reivindicação 2 caracterizado pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val e Xaa<sub>22</sub> é Glu.

4. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com reivindicação 3 caracterizado pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val, Xaa<sub>22</sub> é Glu, Xaa<sub>33</sub> é Ile, e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub>.

20 5. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4 caracterizado pelo fato de que as moléculas de PEG são Metóxi PEG maleimida linear de 20 quilodaltons.

25 6. Método para tratar diabetes não dependente de insulina em um indivíduo com necessidade deste, caracterizado pelo fato de compreender administrar uma quantidade eficaz do composto de GLP-1 PEGuilado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-5.

7. Método para tratar obesidade em um indivíduo com

necessidade deste caracterizado por compreender administrar uma quantidade eficaz do composto de GLP-1 PEGuilado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-5.

5 8. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5 caracterizado pelo fato de ser para uso como um medicamento.

10 9. Uso de um composto de GLP-1 PEGuilado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-6 caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de diabetes não dependente de insulina ou obesidade.

RESUMO

## “COMPOSTO DE GLP-1 PEGUILADO, E, USO DO MESMO”

A invenção fornece compostos de GLP-1 acoplados a duas moléculas de polietilenoglicol ou derivado deste, resultando em um peptídeo biologicamente ativo com uma meia vida prolongada e uma depuração mais lenta quando comparado com aquelas de peptídeo não PEGuilado. Estes compostos e composições de GLP-1 PEGuilado são úteis para tratar condições ou desordens beneficiadas por diminuição de glicose sanguínea, diminuição de consumo alimentar, diminuição de esvaziamento gástrico ou intestinal, aumento de população de célula beta ( $\beta$ ), ou diminuição de motilidade gástrica ou intestinal.



A requerente apresenta novas vias das reivindicações para melhor esclarecer e definir o presente pedido.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto de GLP-1 PEGuilado, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de aminoácidos da fórmula:

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-  
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-  
Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Cys<sub>45</sub>- Xaa<sub>46</sub> Fórmula I (SEQ ID NO: 1)

em que Xaa<sub>8</sub> é: D-Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, ou Thr;

Xaa<sub>22</sub> é: Gly, Glu, Asp, ou Lys;

Xaa<sub>33</sub> é: Val ou Ile

Xaa<sub>46</sub> é: Cys ou Cys-NH<sub>2</sub>

e em que uma molécula de PEG é acoplada covalentemente a Cys<sub>45</sub> e uma molécula de PEG é acoplada covalentemente a Cys<sub>46</sub> ou Cys<sub>46</sub>-NH<sub>2</sub>.

2. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Gly, ou Val, e Xaa<sub>22</sub> é Glu.

3. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com reivindicação 2 caracterizado pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val e Xaa<sub>22</sub> é Glu.

4. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com reivindicação 3 caracterizado pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val, Xaa<sub>22</sub> é Glu, e Xaa<sub>33</sub> é Ile.

5. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com reivindicação 4 caracterizado pelo fato de que Xaa<sub>8</sub> é Val, Xaa<sub>22</sub> é Glu, e Xaa<sub>33</sub> é Ile, e Xaa<sub>46</sub> é Cys-NH<sub>2</sub>.

6. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que as moléculas de PEG possuem pesos moleculares entre 5.000 e 40.000 Daltons.

7. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que as moléculas de

PEG possuem pesos moleculares entre 20.000 e 60.000 Daltons.

8. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que as moléculas de PEG possuem pesos moleculares entre 20.000 e 40.000 Daltons.

5 9. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que as moléculas de PEG possuem pesos moleculares em torno de 20.000 Daltons.

10 10. Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato de que as moléculas de PEG são metóxi PEG maleimida linear.

11 Composto de GLP-1 PEGuilado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10 caracterizado pelo fato de ser para uso como um medicamento.

15 12. Uso de um composto de GLP-1 PEGuilado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-10 caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de diabetes não dependente de insulina ou obesidade.