



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 112016008115-3 B1

(22) Data do Depósito: 17/10/2014

(45) Data de Concessão: 12/03/2024

(54) Título: ANÁLOGOS DE GLUCAGON ACILADOS

(51) Int.Cl.: C07K 14/605; A61K 38/26.

(30) Prioridade Unionista: 17/10/2013 US 61/892,256.

(73) Titular(es): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH; ZEALAND PHARMA A/S.

(72) Inventor(es): DITTE RIBER; JAKOB LIND TOLBORG; DIETER WOLFGANG HAMPRECHT;
WOLFGANG RIST.

(86) Pedido PCT: PCT EP2014072293 de 17/10/2014

(87) Publicação PCT: WO 2015/055801 de 23/04/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/04/2016

(57) Resumo: ANÁLOGOS DE GLUCAGON ACILADOS. A invenção proporciona materiais e métodos para o tratamento de obesidade e excesso de peso, diabetes, e outros distúrbios metabólicos associados. Em particular, a invenção proporciona novos peptídeos análogos do glucagon acilados que são eficazes em tais métodos. Os peptídeos podem mediar o seu efeito através de uma seletividade aumentada para o receptor do GLP-1 em comparação com o glucagon humano.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: “**ANÁLOGOS DE GLUCAGON ACILADOS**”.

[001] CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a análogos de glucagon acilados e à sua utilização médica, por exemplo, no tratamento da obesidade e excesso de peso, diabetes e outros distúrbios metabólicos.

[003] ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] O pré-proglucagon é um polipeptídeo precursor de 158 aminoácidos, que é processado diferentemente nos tecidos para formar vários peptídeos estruturalmente relacionados derivados do proglucagon, nomeadamente o glucagon (Glu), o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), o peptídeo-2 semelhante ao glucagon (GLP-2) e a oxintomodulina (OXM). Estas moléculas estão envolvidas em uma grande variedade de funções fisiológicas, incluindo a homeostase da glicose, a secreção da insulina, o esvaziamento gástrico e o crescimento intestinal, bem como a regulação da ingestão de alimentos.

[005] O glucagon é um peptídeo de 29 aminoácidos que corresponde aos aminoácidos de 53 a 81 do pré-proglucagon. A oxintomodulina (OXM) é um peptídeo de 37 aminoácidos, que inclui a sequência completa de 29 aminoácidos do glucagon com uma extensão octapeptídica no terminal carboxilo (aminoácidos 82 a 89 do pré-proglucagon e denominada "peptídeo-1 interventiente" ou IP-1). O principal fragmento biologicamente ativo do GLP-1 é produzido como um peptídeo amidado de 30 aminoácidos no terminal C, que corresponde aos aminoácidos de 98 a 127 do pré-proglucagon.

[006] O glucagon ajuda a manter o nível de glicose no sangue ligando-se aos receptores do glucagon nos hepatócitos e fazendo com que o fígado liberte glicose - armazenada na forma de glicogénio - através da glicogenólise. À medida que estas reservas se esgotam, o glucagon estimula o fígado para sintetizar mais glicose por gliconeogénesis. Esta glicose é libertada para a corrente sanguínea, impedindo o desenvolvimento de hipoglicemias.

[007] O GLP-1 diminui níveis elevados de glicose no sangue melhorando a secreção de insulina estimulada pela glicose, e promove a perda de peso principalmente pela redução da ingestão de alimentos.

[008] A OXM é libertada no sangue em resposta à ingestão de alimentos e em proporção ao teor calórico da refeição. Foi demonstrado que a OXM suprime o apetite e inibe a ingestão de alimentos nos seres humanos (Cohen et al, Journal of Endocrinology and Metabolism, 88, 4696-4701, 2003; WO 2003/022304). Além destes efeitos anorexígenos que são semelhantes aos do GLP-1, a OXM deverá também afetar o peso corporal por outro mecanismo, já que ratos tratados com oxintomodulina apresentam um ganho de peso inferior ao de ratos de dieta pareada (Bloom, Endocrinology 2004, 145, 2687). O tratamento de roedores obesos com OXM também melhora a sua tolerância à glicose (Parlevliet et al, Am J Physiol Endocrinol Metab, 294, E142-7, 2008) e suprime o ganho de peso corporal (WO 2003/022304).

[009] A OXM ativa ambos os receptores, do glucagon e do GLP-1, exibindo uma potência para o receptor do glucagon duas vezes superior à exibida para o receptor do GLP-1, mas é menos potente do que o glucagon nativo e do que o GLP-1 para os seus respetivos receptores. O glucagon humano é também capaz de ativar ambos os receptores, embora com uma forte preferência para o receptor do glucagon do que para o receptor do GLP-1. O GLP-1, por outro lado, não é capaz de ativar os receptores do glucagon. O mecanismo de ação da oxintomodulina não é ainda bem compreendido. Em particular, não se sabe se alguns dos efeitos extra-hepáticos desta hormona são mediados através dos receptores do GLP-1 e do glucagon, ou se através de um ou mais outros receptores não identificados.

[010] Foi demonstrado que outros peptídeos se ligam e ativam tanto os receptores do glucagon como os do GLP-1 (Hjort et al, Journal of Biological Chemistry, 269, 30121-30124, 1994), para além de suprimirem o ganho de peso e reduzirem a ingestão de alimentos (ver, por exemplo, WO 2006/134340, WO 2007/100535, WO 2008/10101, WO 2008/152403, WO 2009/155257, WO

2009/155258, WO2010/070252, WO2010/070253, WO2010/070255, WO2010/070251, WO2011/006497, WO2011/160630, WO2011/160633, WO2013/092703, WO2014/041195.

[011] A obesidade é um problema de saúde cada vez maior a nível global, que está associado a várias doenças, especialmente doenças cardiovasculares (DCV), diabetes tipo 2, apneia obstrutiva do sono, certos tipos de cancro e osteoartrite. Em consequência, constata-se que a obesidade reduz a esperança de vida. De acordo com projeções de 2005 pela Organização Mundial de Saúde, há 400 milhões de adultos (idade > 15) classificados como obesos em todo o mundo. Crê-se que nos Estados Unidos a obesidade é a segunda causa principal de morte evitável a seguir ao tabagismo.

[012] O aumento na obesidade leva a um aumento na diabetes e aproximadamente 90% das pessoas com diabetes tipo 2 podem ser classificadas como obesas. Há 246 milhões de pessoas em todo o mundo com diabetes, e estima-se que este número aumentará para 380 milhões em 2025. Muitos apresentam fatores de risco cardiovasculares adicionais, incluindo níveis altos/anormais de LDL e de triglicerídeos, e níveis baixos de HDL.

[013] RESUMO DA INVENÇÃO

[014] Em um primeiro aspetto, a invenção proporciona um composto da fórmula:

[015] $R^1-P^1-P^2-R^2$

[016] na qual

[017] R^1 é H, alquilo C₁₋₄, acetilo, formilo, benzoílo ou trifluoroacetilo;

[018] R^2 é OH ou NH₂;

[019] P^1 é um peptídeo com a sequência:

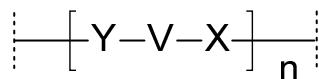
[020] H-X₂-X₃-GTFTSDYSKYLDSΨAAHDFVEWLLSA

[021] na qual

[022] X₂ é selecionado entre Aib, Ala, D-Ala, Ser, N-Me-Ser, Ac3c, Ac4c e Ac5c;

[023] X₃ é selecionado entre Gln e His;

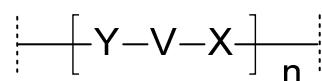
- [024] P^2 está ausente ou é uma sequência de 1-20 unidades de aminoácidos selecionados, independentemente do grupo constituído por Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr e Orn;
- [025] ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável
- [026] Ψ é um resíduo de Lys, Arg, Orn ou Cys, no qual a cadeia lateral está conjugada com um substituinte da fórmula $-Z^2-Z^1$;
- [027] $-Z^1$ é uma cadeia gorda com um grupo polar em uma extremidade da cadeia e uma conexão a Z^2 , $-X-$ na extremidade da cadeia distal do grupo polar,
- [028] em que o grupo polar compreende um grupo de ácido carboxílico ou de um bioisóstero do ácido carboxílico, de ácido fosfónico ou de ácido sulfónico;
- [029] e $-X-$ é uma ligação, $-CO-$, $-SO-$, ou $-SO_2-$;
- [030] $-Z^2-$ é um espaçador da fórmula:



- [031] na qual:
- [032] cada Y é independentemente $-NH$, $-NR$, $-S$ ou $-O$, em que R é um grupo alquilo, um grupo protetor ou forma uma ligação a outra parte do espaçador Z^2 ;
- [033] cada X é independentemente uma ligação, $CO-$, $SO-$, ou SO_2- ;
- [034] com a condição de que quando Y é $-S$, X é uma ligação;
- [035] cada V é independentemente uma unidade orgânica bivalente ligada a Y e X;
- [036] e n é de 1-10;
- [037] ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável
- [038] P^1 pode ter a sequência:
- [039] H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS Ψ AAHDFVEWLLSA
- [040] por exemplo
- [041] H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K([15-carboxi-pentadecanoílo]-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA.

- [042] O composto da invenção pode ser:
- [043] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDSΨAAHDFVEWLLSA-NH₂
- [044] por exemplo
- [045] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K([15-carboxi-pentadecanoílo]-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH₂.
- [046] Em um segundo aspetto, a invenção proporciona um composto da fórmula:
- [047] R¹-P¹-P²-R²
- [048] na qual
- [049] R¹ é H, alquilo C₁₋₄, acetilo, formilo, benzoílo ou trifluoroacetilo;
- [050] R² é OH ou NH₂;
- [051] P¹ é um peptídeo com a sequência:
- [052] His-X2-X3-GTFTSDYSKYL-X15-X16-X17-X18-A-X20-DFI-X24-WLE-X28-A
- [053] na qual:
- [054] X2 é selecionado entre Aib, Ac3c, Ac4c e Ac5c;
- [055] X3 é selecionado entre Gln e His;
- [056] X15 é selecionado entre Asp e Glu;
- [057] X16 é selecionado entre Glu e Ψ;
- [058] X17 é selecionado entre Arg e Ψ;
- [059] X18 é selecionado entre Ala e Arg;
- [060] X20 é selecionado entre Lys e His;
- [061] X24 é selecionado entre Glu e Ψ;
- [062] X28 é selecionado entre Ser e Ψ;
- [063] e P² está ausente ou é uma sequência de 1-20 unidades de aminoácidos selecionados independentemente do grupo constituído por Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr e Orn;
- [064] em que o composto contém um e apenas um Ψ
- [065] e em que Ψ é um resíduo de Lys, Arg, Orn ou Cys, no qual a cadeia lateral está conjugada com um substituinte da fórmula -Z²-Z¹;

- [066] $-Z^1$ é uma cadeia gorda com um grupo polar em uma extremidade da cadeia e uma conexão a Z^2 , $-X-$ na extremidade da cadeia distal do grupo polar;
- [067] em que o grupo polar compreende um grupo de ácido carboxílico ou de um bioisósteros do ácido carboxílico, de ácido fosfónico ou de ácido sulfónico;
- [068] e $-X-$ é uma ligação, $-CO-$, $-SO-$, ou $-SO_2-$;
- [069] $-Z^2-$ é um espaçador da fórmula:



- [070] na qual:
- [071] cada Y é independentemente $-NH$, $-NR$, $-S$ ou $-O$, em que R é um grupo alquilo, um grupo protetor ou forma uma ligação a outra parte do espaçador Z^2 ;
- [072] cada X é independentemente uma ligação, $CO-$, $SO-$, ou SO_2- ;
- [073] com a condição de que quando Y é $-S$, X é uma ligação;
- [074] cada V é independentemente uma unidade orgânica bivalente ligada a Y e X;
- [075] e n é de 1-10;
- [076] ou um seu sal ou solvato farmaceuticamente aceitável
- [077] Em algumas formas de realização do segundo aspetto:
- [078] X2 é selecionado entre Aib e Ac4c;
- [079] X3 é Gln;
- [080] X15 é selecionado entre Asp e Glu;
- [081] X16 é Ψ ;
- [082] X17 é Arg;
- [083] X18 é Ala;
- [084] X20 é selecionado entre Lys e His;
- [085] X24 é Glu;
- [086] X28 é Ser.

- [087] Entre as combinações úteis de resíduos, constam as seguintes:
- [088] X2 é Ac4c e X20 é Lys;
- [089] X2 é Aib e X20 é His.
- [090] Adicional ou alternativamente, poderá desejar-se que X2 seja Aib se X15 for E
- [091] ou que X15 seja D se X2 for Ac4c.
- [092] Substituintes Z²Z¹ particularmente interessantes incluem [17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3 e [17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG.
- [093] P¹ pode ter a sequência selecionada entre:
- [094] H-Aib-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA
- [095] H-Aib-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA
- [096] H-Aib-QGTFTSDYSKYLEΨRAAKDFIEWLESA
- [097] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA e
- [098] H-Aib-QGTFTSDYSKYLEΨRAAHDFIEWLESA
- [099] por exemplo, entre
- [100] H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA
- [101] H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA
- [102] H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA
- [103] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA e
- [104] H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA
- [105] O composto da invenção pode ser selecionado entre:
- [106] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA-NH₂
- [107] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA-NH₂
- [108] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLEΨRAAKDFIEWLESA-NH₂

- [109] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA-NH₂ e
- [110] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLEΨRAAHDFIEWLESA-NH₂
- [111] por exemplo, entre
- [112] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- [113] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- [114] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- [115] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂ e
- [116] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA-NH₂
- [117] Em formas de realização alternativas do segundo aspetto:
- [118] X2 é selecionado entre Aib e Ac4c;
- [119] X3 é selecionado entre Gln e His;
- [120] X15 é Asp;
- [121] X16 é Glu;
- [122] X17 é selecionado entre Arg e Ψ;
- [123] X18 é selecionado entre Ala e Arg;
- [124] X20 é Lys;
- [125] X24 é selecionado entre Glu e Ψ;
- [126] X28 é selecionado entre Ser e Ψ;
- [127] Em algumas formas de realização, quando X28 é Ψ, X2 é Ac4c.
- [128] Em algumas formas de realização, quando X3 é His, X2 é Ac4c e X17 é Ψ.
- [129] Em algumas formas de realização, quando X17 é Ψ, Z²Z¹ é [17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3 ou [17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu.

- [130] Em algumas formas de realização, quando X24 ou X28 é Ψ , Z^2Z^1 é [17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG.
- [131] P^1 pode ter uma sequência selecionada entre:
- [132] H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA
- [133] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA
- [134] H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA
- [135] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA
- [136] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA
- [137] H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERA Ψ AKDFI Ψ WLESA
- [138] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERA Ψ AKDFI Ψ WLESA
- [139] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI Ψ WLESA
- [140] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERA Ψ AKDFIEWLE Ψ A e
- [141] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE Ψ A
- [142] por exemplo, entre
- [143] H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA
- [144] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA
- [145] H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA
- [146] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA
- [147] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA
- [148] H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERA Ψ AKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA
- [149] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERA Ψ AKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA
- [150] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA

- [151] H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-A e
- [152] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂
- [153] O composto da invenção pode ser selecionado entre:
- [154] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA-NH₂
- [155] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂
- [156] H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂
- [157] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA-NH₂
- [158] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂
- [159] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIΨWLESA-NH₂
- [160] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIΨWLESA-NH₂
- [161] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIΨWLESA-NH₂
- [162] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLEΨA-NH₂ e
- [163] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEΨA-NH₂
- [164] por exemplo, entre
- [165] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
- [166] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- [167] H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- [168] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
- [169] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- [170] H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
- [171] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂

- [172] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
- [173] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂ e
- [174] H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂
- [175] Para que não surjam quaisquer dúvidas, em todos os aspetos da invenção, aquelas posições que não são expressamente referidas como permitindo variabilidade são fixas e, portanto, só podem incluir o resíduo indicado.
- [176] Em todos os aspetos, o composto da invenção comprehende um resíduo Ψ , ou seja, um resíduo selecionado entre Lys, Arg, Orn e Cys, no qual a cadeia lateral está conjugada com um substituinte $-Z^2-Z^1-$ como descrito a seguir em pormenor.
- [177] O substituinte está conjugado com o grupo funcional na extremidade distal da cadeia lateral do carbono alfa. A capacidade normal da cadeia lateral de Lys, Arg, Orn ou Cys para participar em interações mediadas por aquele grupo funcional (por exemplo, interacções intra- e inter-moleculares) pode, portanto, ser reduzida ou completamente eliminada pela presença do substituinte. Assim, as propriedades gerais do composto podem ser relativamente insensíveis a alterações no aminoácido efetivamente presente como resíduo Ψ . Por conseguinte, crê-se que qualquer um dos resíduos Lys, Arg, Orn e Cys pode estar presente em qualquer posição em que Ψ é permitido. No entanto, em determinadas formas de realização, poderá ser vantajoso que o componente de aminoácido de Ψ seja Lys.
- [178] Em algumas formas de realização, $-Z^1$ é um grupo acilo da fórmula:
- [179] A-B-Alk-(CO)-
- [180] ou um grupo sulfonilo da fórmula:
- [181] A-B-Alk-(SO₂)-;
- [182] A é -COOH ou um bioisóstero do ácido carboxílico;

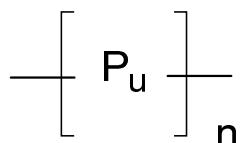
- [183] B é uma ligação, arileno C₆, ou arileno–O–C₆;

[184] Alk é uma cadeia gorda saturada ou insaturada, de 6 a 18 átomos de carbono em comprimento, opcionalmente substituída com um ou mais substituintes selecionados entre flúor, alquilo C₁–4, trifluorometilo, hidroximetilo, amino, hidroxilo, alcoxi C₁–4, oxo e carboxilo;

[185] –Z²– é –S_A–, –S_A–S_B–, ou –S_B–S_A–;

[186] –S_A– é um resíduo de aminácido único selecionado entre γ -Glu, α -Glu, α -Asp, β -Asp, Ala, β -Ala (ácido 3-aminopropanóico), e Gaba (ácido 4--aminobutanóico);

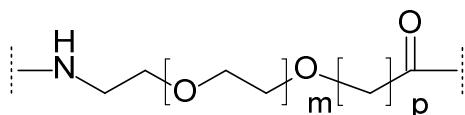
[187] –S_B– é um ligante da fórmula geral:



- [188] na qual n é 1–10 e cada P_u é selecionado independentemente entre P_{U^i} e $P_{U^{iii}}$,

[189] cada P_{U^i} é independentemente um resíduo de aminoácido natural ou não natural; e

[190] cada $P_{U^{iii}}$ é independentemente um resíduo da fórmula geral:



- [191] na qual m é 0-5 e p é 1, 3, 4, ou 5.

[192] Em todos os aspectos da invenção, R¹ pode ser selecionado entre H e alquilo C₁₋₄ (por exemplo, metilo).

[193] Os compostos da invenção são peptídeos análogos do glucagon. Quaisquer referências neste documento a um peptídeo análogo do glucagon devem ser interpretadas como referências a um composto da invenção ou a um peptídeo P¹ ou P^{1-P²} de acordo com o contexto. Quaisquer referências a um composto da invenção devem ser entendidas como incluindo um seu qualquer

sal (por exemplo, um sal acetato ou cloreto) ou solvato farmaceuticamente aceitável, exceto se indicado em contrário ou excluído pelo contexto.

[194] A invenção proporciona uma composição que compreende um composto da invenção conforme definido neste documento (incluindo seus sais ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis como já aqui descrito) em mistura com um transportador. Em formas de realização preferenciais, a composição é uma composição farmacêutica e o transportador é um transportador farmaceuticamente aceitável. O peptídeo análogo do glucagon pode estar sob a forma de um sal farmaceuticamente aceitável do análogo do glucagon.

[195] Os compostos descritos neste documento encontram utilização, entre o mais, na prevenção de ganho de peso ou promoção de perda de peso. "Prevenção" significa inibição ou redução em comparação com a ausência de tratamento e não implica necessariamente a cessação completa do ganho de peso. Os peptídeos podem causar menor ingestão de alimentos e/ou maior consumo de energia, resultando no efeito observado no peso corporal. Independentemente do seu efeito no peso corporal, os compostos da invenção podem ter um efeito benéfico no controlo glicémico e/ou nos níveis de colesterol circulante, sendo capaz de reduzir os níveis de LDL circulante e aumentar a relação HDL/LDL. Assim, os compostos da invenção podem ser usados para terapia direta ou indireta de quaisquer condições clínicas causadas ou caracterizadas por excesso de peso, tais como o tratamento e/ou prevenção da obesidade, obesidade mórbida, inflamação associada à obesidade, doença da vesícula biliar associada à obesidade e apneia do sono induzida pela obesidade. Os compostos da invenção podem também ser usados na prevenção de condições clínicas causadas ou caracterizadas pelo controlo glicémico inadequado ou dislipidemia (por exemplo, níveis de LDL elevados ou uma relação HDL/LDL reduzida), diabetes (especialmente a diabetes tipo 2), síndrome metabólica, hipertensão, dislipidemia aterogénica, aterosclerose, arteriosclerose, doença coronária, doença arterial periférica, acidente vascular cerebral ou doença microvascular. Os seus efeitos nestas condições clínicas

podem ser resultado de, ou estar associados ao seu efeito no peso corporal, ou podem ser independentes deste.

[196] A invenção proporciona também um composto da invenção para utilização em um método de tratamento médico, particularmente para utilização em um método de tratamento de uma condição clínica como atrás descrito.

[197] A invenção proporciona igualmente o uso de um composto da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença como atrás referido.

[198] O composto da invenção pode ser administrado como parte de uma terapia de combinação, com um agente para tratamento de diabetes, obesidade, dislipidemia ou hipertensão.

[199] Em tais casos, os dois agentes ativos podem ser administrados em conjunto ou separadamente, e tanto como parte da mesma formulação farmacêutica ou em formulações distintas.

[200] Assim, o composto da invenção pode ser usado em combinação com um agente antidiabético, incluindo, mas sem lhes estar limitado, uma biguanida (por exemplo, metformina), uma sulfonilureia, uma meglitinida ou glinida (por exemplo, nateglinida), um inibidor da DPP-IV, um inibidor do SGLT2, uma glitazona, uma insulina ou um análogo da insulina. Exemplos de análogos de insulina incluem, sem lhes estar limitados, LantusTM, NovorapidTM, HumalogTM, NovomixTM, Actraphane HMTM, LevemirTM e ApidraTM.

[201] O composto pode ainda ser usado em combinação com um agente antiobesidade, incluindo, mas sem lhes estar limitado, um agonista do receptor 1 do peptídeo semelhante ao glucagon, o peptídeo YY ou um seu análogo, um antagonista do receptor canabinoide 1, inibidor da lipase, agonista do receptor 4 da melanocortina, antagonista do receptor 1 da hormona concentradora da melanina, fentermina (sozinha ou em combinação com topiramato), uma combinação de um inibidor da recaptação de norepinefrina/dopamina e de um antagonista do receptor opioide (por exemplo, uma combinação de bupropiona e naltrexona), ou um agente serotoninérgico (por exemplo, lorcaserina).

[202] O composto pode ainda ser usado em combinação com um agente contra a hipertensão, incluindo, mas sem lhes estar limitado, um inibidor da enzima conversora da angiotensina, um bloqueador do receptor da angiotensina II, um diurético, um beta-bloqueador ou um bloqueador dos canais de cálcio.

[203] O composto pode ser usado em combinação com um agente contra a displidemia, incluindo, mas sem lhes estar limitado, uma estatina, um fibrato, uma niacina ou um inibidor da absorção do colesterol.

[204] Assim, a invenção proporciona ainda uma composição ou *kit* terapêutico constituído por um composto de invenção e, por exemplo, por um agente antidiabético, agente antiobesidade, um agente contra a hipertensão ou um agente antidisplidemia conforme descrito atrás. É também proporcionada tal composição ou *kit* terapêutico para utilização em um método de tratamento médico, especialmente para o tratamento de uma condição clínica como atrás descrita.

[205] O composto da invenção pode ser produzido por química sintética. Nesse sentido, a invenção proporciona um método de síntese de um composto da invenção.

[206] A invenção pode também ser realizada por uma combinação de métodos recombinantes e sintéticos. O método pode incluir expressar a sequência de um peptídeo precursor, purificar opcionalmente o composto assim produzido, e adicionar ou modificar um ou mais aminoácidos para produzir um composto da invenção ou um composto que compreende a sequência de aminoácidos P¹ ou P¹-P². A etapa de modificação pode incluir a introdução de um resíduo Orn (por exemplo, por modificação de um resíduo precursor) e/ou a introdução de um substituinte Z2Z1 no local de um resíduo Ψ.

[207] O peptídeo precursor pode ser expresso a partir de um ácido nucleico codificante do peptídeo precursor em um sistema de expressão com ou sem células composto por um tal ácido nucleico.

[208] DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[209] Em todo este fascículo, são usados os códigos convencionais de uma letra e de três letras para os aminoácidos de ocorrência natural, bem como as abreviaturas geralmente aceites para os outros aminoácidos, tais como Aib (ácido α -aminoisobutírico), Orn (ornitina), Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropanóico), Ac3c (ácido 1-amino-ciclopropanocarboxílico), Ac4c (ácido 1-amino-ciclobutanocarboxílico) e Ac5c (ácido 1-amino-ciclopentanocarboxílico).

[210] Ac3c, Ac4c e Ac5c têm estruturas semelhantes e são intercambiáveis em certa medida, embora Ac4c possa ser preferido.

[211] O glucagon é um peptídeo de 29 aminoácidos que corresponde aos aminoácidos de 53 a 81 do pré-proglucagon e tem a sequência His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr. A oxintomodulina (OXM) é um peptídeo de 37 aminoácidos, que inclui a sequência completa de 29 aminoácidos do glucagon com uma extensão octapeptídica no terminal carboxilo (aminoácidos 82 a 89 do pré-proglucagon, com a sequência Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala e denominada "peptídeo-1 interveniente" ou IP-1; a sequência completa da oxintomodulina humana é His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala). O principal fragmento biologicamente ativo do GLP-1 é produzido como um peptídeo amidado de 30 aminoácidos no terminal C, que corresponde aos aminoácidos de 98 a 127 do pré-proglucagon.

[212] O termo "glucagon nativo" refere-se assim a glucagon humano nativo com a sequência H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH.

[213] Os aminoácidos na seqüência P¹ dos compostos da invenção podem ser considerados como numerados consecutivamente de 1 a 29 no sentido convencional do terminal N para o terminal C. A referência a uma "posição" em P¹ deve ser interpretada de acordo com o mesmo, tal como devem as referências às posições no glucagon humano nativo e noutras moléculas.

[214] Um composto da invenção pode incluir uma sequência peptídica C-terminal P² de 1-20 aminoácidos, por exemplo para estabilizar a conformação e/ou a estrutura secundária do peptídeo análogo do glucagon, e/ou para tornar o peptídeo análogo do glucagon mais resistente à hidrólise enzimática como descrito, p. ex., em WO99/46283.

[215] Quando presente, P² representa uma sequência peptídica de 1-20 resíduos de aminoácidos, por exemplo, na faixa de 1-15, mais preferencialmente na faixa de 1-10, em particular na faixa de 1-7 resíduos de aminoácidos, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 resíduos de aminoácidos, tal como 6 resíduos de aminoácidos. Cada um dos resíduos de aminoácidos na sequência peptídica P² pode ser independentemente selecionado entre Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropanóico) e Orn (ornitinina). De preferência, os resíduos de aminoácidos são selecionados entre Ser, Thr, Tyr, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr e Orn, mais preferencialmente são selecionados exclusivamente entre Glu, Lys e Cys. Os aminoácidos atrás referidos podem ter quer a configuração D ou L, em determinadas formas de realização têm uma configuração L. As sequências P² particularmente preferidas são sequências de quatro, cinco, seis ou sete resíduos de lisina consecutivos (i.e. Lys₃, Lys₄, Lys₅, Lys₆ ou Lys₇), e particularmente cinco ou seis resíduos de lisina consecutivos. Outras sequências exemplificativas de P² são dadas em WO 01/04156. Em alternativa, o resíduo C-terminal da sequência P² pode ser um resíduo Cys. Isto pode ajudar na modificação (por exemplo, PEGuilação ou conjugação a albumina) do composto. Nestas formas de realização, a sequência P² pode ser, por exemplo, apenas um aminoácido em comprimento (ou seja, P² = Cys) ou pode ser dois, três, quatro, cinco, seis ou mais aminoácidos em comprimento. Os outros aminoácidos, portanto, servem como um espaçador entre o peptídeo P¹ e o resíduo Cys terminal.

[216] A sequência peptídica P² não tem mais de 25% de identidade de sequência com a sequência correspondente da porção IP-1 da OXM humana (que tem a sequência de Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala).

[217] "Percentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" de uma determinada sequência peptídica ou polipeptídica em relação a outra sequência polipeptídica (por exemplo, IP-1) é calculada como a percentagem de resíduos de aminoácidos na sequência peptídica dada que são iguais aos correspondentemente posicionados resíduos de aminoácidos na sequência correspondente do outro polipeptídeo quando as duas estão alinhadas uma com a outra, introduzindo lacunas para o alinhamento ideal, se necessário. Os valores de % de identidade podem ser determinados utilizando o WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). O WU-BLAST-2 usa vários parâmetros de busca, a maior parte dos quais são fixados em valores predefinidos. Os parâmetros ajustáveis são fixados nos seguintes valores: *overlap span* = 1, *overlap fraction* = 0,125, *word threshold* (T) = 11. O valor da % de identidade de sequência de aminoácidos é estabelecido pelo número de resíduos correspondentes iguais conforme determinado pelo WU-BLAST-2, dividido pelo número total de resíduos da sequência de referência (as lacunas introduzidas pelo WU-BLAST-2 na sequência de referência para maximizar o resultado do alinhamento são ignoradas), multiplicado por 100.

[218] Assim, quando P² está alinhada perfeitamente com os 8 aminoácidos da IP-1, não tem mais do que dois aminoácidos iguais aos aminoácidos correspondentes da IP-1.

[219] Em certas formas de realização, P² está ausente.

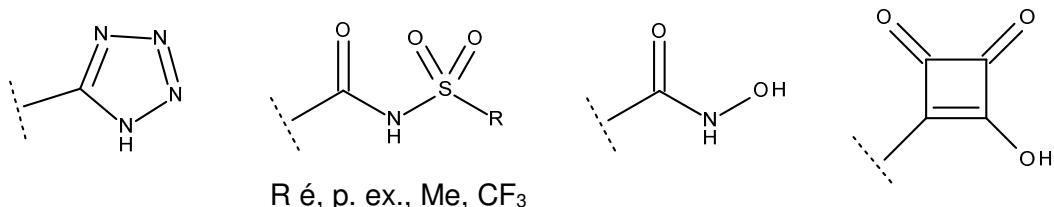
[220] Ψ é um resíduo de Lys, Arg, Orn ou Cys, no qual a cadeia lateral está conjugada com um substituinte da fórmula $-Z^2-Z^1$; sem estar vinculado por qualquer teoria particular, crê-se que o substituinte liga as proteínas plasmáticas (por exemplo, albumina) na corrente sanguínea, protegendo assim os compostos da invenção contra a degradação enzimática e aumentando a sua semivida. O substituinte pode também modular a potência do composto, por exemplo, no que diz respeito ao receptor do glucagon e/ou ao receptor do GLP-1.

[221] *O grupo Z¹*

[222] Z^1 é uma cadeia gorda com uma conexão a Z^2 , referida aqui como $-X-$, e com um grupo polar na extremidade da cadeia distal da conexão a Z^2 . $-X-$ pode ser, por exemplo, uma ligação, acilo ($-CO-$), sulfinilo ($-SO-$), ou sulfônico ($-SO_2-$), a conexão estando localizada na posição ω no que se refere ao grupo polar, ou seja, na extremidade da cadeia distal do grupo polar.

[223] De preferência, o grupo polar é um grupo ácido ou fracamente ácido, por exemplo, um ácido carboxílico ou um bioisósteros do ácido carboxílico, um fosfonato ou um sulfonato. O grupo polar pode ter um pK_a de entre – 2 e 12 na água, mais de preferência entre 1 e 7, mais de preferência entre 3 e 6. Certos grupos polares preferenciais têm um pK_a entre 4 e 5.

[224] O grupo polar é de preferência um ácido carboxílico ou um bioisósteros do ácido carboxílico. São conhecidos na arte bioisósteros do ácido carboxílico adequados. De preferência, o bioisóstero tem um protão com um pK_a semelhante ao do ácido carboxílico correspondente. Exemplos de bioisósteros adequados podem incluir, sem lhes estar limitados, tetrazol, acilsulfomidas, acilhidroxilamina e derivados do ácido esquárico, como se mostra adiante (--- indica o ponto de fixação):

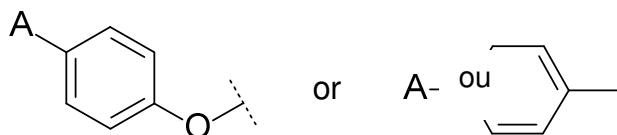


[225] O grupo polar pode ser um grupo da fórmula $A-B-$, na qual A é um grupo de ácido carboxílico ($-COOH$) ou de um bioisósteros do ácido carboxílico, de ácido fosfônico ($-P(O)(OH)_2$) ou de ácido sulfônico ($-SO_2OH$), e B é uma ligação ou um ligante entre A e a cadeia gorda. Em algumas formas de realização, o grupo polar é $-COOH$, isto é, A é $-COOH$ e B é uma ligação.

[226] Quando B é um ligante, pode ser um cicloalquíleno, heterocicloalquíleno, aríleno C_6 , ou heteroaríleno C_{5-6} , ou aríleno–O– C_6 ou heteroaríleno–O– C_{5-6} .

[227] Quando B é feníleno, pode ser selecionado, por exemplo, entre 1,2-feníleno, 1,3-feníleno, 1,4-feníleno, de preferência 1,4-feníleno (para que A–B– seja um substituinte de ácido 4-benzóico ou um bioisóster do ácido 4-benzóico). Quando B é feníleno–O–, pode ser selecionado, por exemplo, entre 1,2-feníleno–O–, 1,3-feníleno–O–, 1,4-feníleno–O–, de preferência 1,4-feníleno–O–. Cada feníleno de B pode ser substituído opcionalmente com um ou mais substituintes selecionados entre flúor, metilo, trifluorometilo, amino, hidroxilo e alcoxi C₁₋₄, de preferência metoxi. Será reconhecido que a identidade e a posição do substituinte podem ser escolhidas com vista a alterar sutilmente o pK_a do grupo polar. São conhecidos na arte grupos apropriados que indutivamente ou mesomericamente aceitam ou doam eletrões, bem como os seus efeitos posicionais. Em algumas formas de realização, B pode ser heteroarileno C₅₋₆, por exemplo, piridiníleno ou tiofuraníleno, e pode ser opcionalmente substituído conforme descrito.

[228] Por exemplo, em algumas formas de realização, A–B – pode ser selecionado entre:



[229] De preferência, A é – COOH. Em alguns grupos polares preferenciais, A é um ácido carboxílico e B é arileno–O– C₆.

[230] Cadeia gorda como aqui utilizado refere-se a uma unidade composta por uma cadeia de átomos de carbono, em que os átomos de carbono estão predominantemente substituídos com hidrogénio ou átomos do tipo hidrogénio, como, por exemplo, uma cadeia de hidrocarboneto. Estas cadeias gordas são muitas vezes referidas como lipófilas, embora se saiba que a substituição possa alterar as propriedades lipofílicas da molécula em geral.

[231] A cadeia gorda pode ser alifática. Pode ser totalmente saturada ou pode incluir uma ou mais ligações duplas ou triplas. Cada ligação dupla, se presente, pode ser de configuração E ou Z. A cadeia gorda pode ter uma ou mais

unidades cicloalquileno ou heterocicloalquileno no seu comprimento, e adicional ou alternativamente pode ter uma ou mais unidades arileno ou heteroarileno no seu comprimento. Por exemplo, a cadeia gorda pode incorporar uma unidade fenileno ou piperazinileno no seu comprimento como, por exemplo, se mostra a seguir (onde --- representa os pontos de fixação na cadeia).



[232] A cadeia gorda pode ser derivada de um ácido gordo, por exemplo, pode ser derivada de um ácido gordo de cadeia média (AGCM) com uma cauda alifática de 6 – 12 átomos de carbono, um ácido gordo de cadeia longa (LCFA) com uma cauda alifática de 13 a 21 átomos de carbono, ou um ácido gordo de cadeia longa (LCFA) com uma cauda alifática de 22 átomos de carbono ou mais. O ácido tridecílico (tridecanóico), o ácido mirístico (tetradecanóico), o ácido pentadecílico (pentadecanóico), o ácido palmítico (hexadecanóico) e o ácido margárico (heptadecanóico) são exemplos de ácidos gordos lineares saturados dos quais cadeias gordas apropriadas podem ser derivadas. O ácido miristoleico, o ácido palmitoleico, o ácido sapiénico e o ácido oleico são exemplos de ácidos gordos lineares insaturados dos quais cadeias gordas apropriadas podem ser derivadas.

[233] A cadeia gorda pode estar ligada a Z^2 por uma ligação amida, uma ligação sulfinamida, uma ligação sulfonamida, uma ligação éster ou por uma ligação éter, tioéter ou amina. Como tal, a cadeia gorda pode ter na ω posição, isto é, na posição distal ao grupo polar, uma ligação a Z^2 ou um grupo acilo ($-\text{CO}-$), sulfinilo ($-\text{SO}-$), ou sulfonilo ($-\text{SO}_2-$). De preferência, a cadeia gorda tem um grupo acilo ($-\text{CO}-$) na posição distal ao grupo polar e está ligada a Z^2 por uma ligação amida ou éster.

[234] Em algumas formas de realização, Z^1 é um grupo da fórmula:

[235] $\text{A}-\text{B}-\text{Alk}-\text{X}-$

[236] na qual $\text{A}-\text{B}-$ é o grupo polar atrás definido, X é uma ligação, um grupo acilo ($-\text{CO}-$), sulfinilo ($-\text{SO}-$), ou sulfonilo ($-\text{SO}_2-$), e Alk é uma cadeia

gorda que pode ser opcionalmente substituída com um ou mais substituintes. A cadeia gorda tem preferencialmente 6 a 18 átomos de carbono em comprimento (p. ex., alquíleno C₆₋₁₈), mais preferencialmente 8 a 18 átomos de carbono em comprimento (p. ex., alquíleno C₈₋₁₈), mais preferencialmente 12 a 16 átomos de carbono em comprimento (p. ex., alquíleno C₁₂₋₁₆), e pode ser saturada ou insaturada. De preferência, Alk é saturada, ou seja, de preferência Alk é alquíleno.

- [237] Em algumas formas de realização, Z¹ é um grupo acilo da fórmula:
- [238] A–B–Alk–(CO)–
- [239] ou um grupo sulfônico da fórmula:
- [240] A–B–Alk–(SO₂)–;
- [241] Substituintes opcionais na cadeia gorda podem ser selecionados independentemente entre flúor, alquilo C₁₋₄, de preferência metilo; trifluorometilo, hidroximetilo, amino, hidroxilo, alcoxi C₁₋₄, de preferência metoxi; oxo e carboxilo, e podem estar independentemente localizados em qualquer ponto ao longo da cadeia. Em algumas formas de realização, cada substituinte opcional é selecionado entre flúor, metilo e hidroxilo. Quando estão presentes mais do que um substituinte, os substituintes podem ser iguais ou diferentes. De preferência, o número de substituintes é de 0 a 3; mais de preferência a cadeia gorda não está substituída.
- [242] Em algumas formas de realização, Z¹ é um grupo acilo da fórmula:
- [243] A–B–Alk–(CO)–
- [244] em que A e B são como atrás definidos.
- [245] Em algumas formas de realização, Z¹ é :
- [246] 4-carboxifenoxinonanoílo HOOC–C₆H₄–O–(CH₂)₈–(CO)–.
- [247] Certos Z¹ preferenciais são derivados de α,ω ácidos dicarboxílicos de longa cadeia saturados da fórmula HOOC–(CH₂)₁₂₋₁₈–COOH, de preferência α,ω ácidos dicarboxílicos de longa cadeia saturados com um número par de átomos de carbono na cadeia alifática. Como exemplo, sem lhes estar limitado, Z¹ pode ser:
- [248] 13-carboxitridecanoílo HOOC–(CH₂)₁₂–(CO)–

- [249] 15--carboxipentadecanoílo HOOC–(CH₂)₁₄–(CO)–; ou
- [250] 17--carboxi-heptadecanoílo HOOC–(CH₂)₁₆–(CO)–.
- [251] O grupo ácido carboxílico pode ser substituído por um bioisóstero conforme aqui especificado.
- [252] *O grupo Z²*
- [253] Z² é um espaçador que liga Z¹ à cadeia lateral do aminoácido componente de Ψ. Na sua forma mais geral, Z² é um espaçador ligado a um terminal por Y, o qual pode ser um átomo de azoto, oxigénio ou enxofre, e no outro terminal por X, o qual pode ser uma ligação, ou um grupo acilo (-CO-), sulfinilo (-SO-) ou sulfônico (-SO₂-). Por conseguinte, Z² pode ser um espaçador da fórmula (--- indica os pontos de fixação):



- [254] na qual:
- [255] Y pode ser -NH, -NR, -S ou -O, em que R- pode ser um grupo alquila, um grupo protetor ou pode formar uma ligação à outra parte do espaçador, com a valência restante formando uma ligação a Z¹;
- [256] X pode ser uma ligação, um grupo CO-, SO-, ou SO₂-, com a valência restante formando uma ligação à cadeia lateral do componente de aminoácido de Ψ;
- [257] V é uma unidade orgânica bivalente ligada a Y e X;
- [258] e n pode ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, quando n é 2 ou mais, cada Y, V, e X é independente de todos os outros Y, V, e X.
- [259] Como tal, Z² pode estar ligado em cada lado por ligações amida, sulfinamida, sulfonamida ou éster, ou por ligações amino, éster ou tioéster dependendo da natureza de Y e X e dos correspondentes grupos de ligação em Z¹ e na cadeia lateral de lado. De preferência, quando Y é - S, X é uma ligação. Quando n é 2 ou maior, cada V pode também estar ligado a cada V adjacente por ligações conforme descrito. De preferência, as ligações são amidas, ésteres

ou sulfonamidas, mais de preferência amidas. Assim, em algumas formas de realização, cada Y é $-\text{NH}$ ou $-\text{NR}$ e cada X é $\text{CO}-$ ou SO_2- .

[260] Em algumas formas de realização, Z^2 é um espaçador de fórmula $-\text{S}_A-$, $-\text{S}_B-$, $-\text{S}_A-\text{S}_B-$ ou $-\text{S}_B-\text{S}_A-$, em que S_A e S_B são como definidos a seguir.

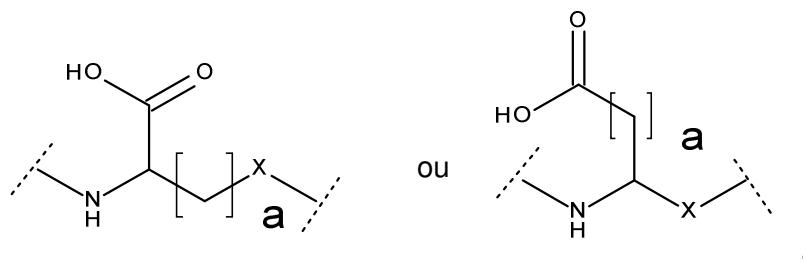
[261] Em algumas formas de realização, Z^2 é selecionado de $-\text{S}_A-$ ou $-\text{S}_B-$ S_A- , isto é, [cadeia lateral] $-\text{Z}^2\text{Z}^1$ é [cadeia lateral] $-\text{S}_A-\text{Z}^1$ ou [cadeia lateral] $-\text{S}_B-\text{S}_A-\text{Z}^1$.

[262] *O grupo S_A*

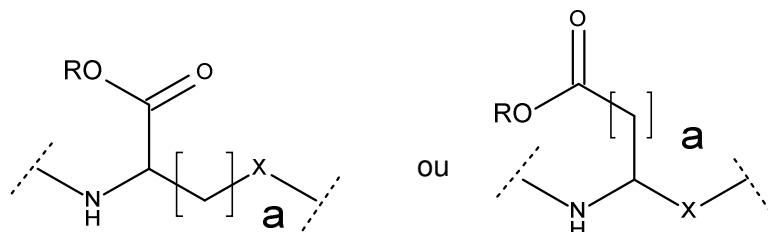
[263] S_A pode ser um resíduo de aminoácido único ou um resíduo de um derivado de aminoácido, especialmente um resíduo de derivado de aminoácido tendo um sulfinilo ou sulfonilo no lugar da unidade carboxi no terminal C. Adicional ou alternativamente, o resíduo de aminoácido único pode ter um átomo de oxigénio ou de enxofre no lugar do átomo de azoto N-terminal. De preferência, S_A é um resíduo de aminoácido único.

[264] Em algumas formas de realização, o aminoácido pode ser selecionado entre γ -Glu, α -Glu, α -Asp, β -Asp, Ala, β -Ala (ácido 3-aminopropanóico), e Gaba (ácido 4-aminobutanóico). Será reconhecido que os aminoácidos podem ser D ou L, ou uma mistura racémica ou enantioenriquecida. Em algumas formas de realização, o aminoácido é um L-aminoácido. Em algumas formas de realização, o aminoácido é um D-aminoácido.

[265] Em algumas formas de realização preferidas, S_A tem um substituinte de ácido carboxílico, com γ -Glu, α -Glu, α -Asp, β -Asp e seus derivados de sulfinilo e sulfonilo sendo preferidos. Como tal, em algumas formas de realização, o resíduo de aminoácido é:



[266] quando $-X-$ é $-CO-$, $-SO-$, $-SO_2-$, de preferência $-CO-$, e a é 1 ou 2, de preferência 2. Em algumas formas de realização, o ácido carboxílico é um éster e o resíduo de aminoácido é:

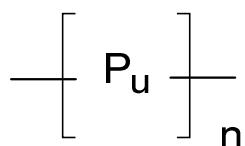


[267] quando $-X-$ é $-CO-$, $-SO-$, $-SO_2-$, de preferência $-CO-$, e a é 1 ou 2, de preferência 2, e R é alquilo C_{1-4} ou arilo C_6 . De preferência, R é alquilo C_{1-4} , de preferência metilo ou etilo, mais de preferência etilo.

[268] De preferência, S_A é γ -Glu.

[269] O grupo S_B

[270] S_B pode ser um ligante da fórmula geral:



[271] em que P_u é uma unidade polimérica e n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Uma terminação do ligante S_B é um grupo $-NH$, $-NR$, $-S$ ou $-O$, em que R pode ser um grupo alquilo, um grupo protetor ou pode formar uma ligação a outra parte da unidade polimérica; enquanto a outra terminação é uma ligação ou $CO-$, $SO-$ ou SO_2- . Por conseguinte, cada unidade polimérica P_u pode estar ligada em cada lado por ligações amida, sulfonamida, sulfonamida ou éster ou por ligações amino, éter, ou tioéter, dependendo da natureza de Y e X e dos correspondentes grupos ligados a Z^1 , S_A e Lys.

[272] Em algumas formas de realização, cada P_u pode ser independentemente uma unidade da fórmula:



[273] na qual:

[274] Y pode ser $-\text{NH}$, $-\text{NR}$, $-\text{S}$ ou $-\text{O}$, em que R pode ser um grupo alquilo, um grupo protetor ou pode formar uma ligação a outra parte do espaçador, com a valência restante formando uma ligação a Z^1 ;

[275] X pode ser uma ligação, um grupo $\text{CO}-$, $\text{SO}-$, ou SO_2- , com a valência restante formando uma ligação a Lys;

[276] e V é uma unidade orgânica bivalente ligada a Y e X;

[277] Em algumas formas de realização, V é o carbono α de um aminoácido natural ou não natural, isto é, V é $-\text{CHR}^{\text{AA}}-$, em que R^{AA} é uma cadeia lateral do aminoácido; ou V é um alquíleno C_{1-6} opcionalmente substituído, ou V é uma cadeia que compreende uma ou mais unidades de etilenoglicol em série, também conhecida como cadeia PEG, por exemplo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-$, em que m é 0, 1, 2, 3, 4, ou 5, e p é 1, 2, 3, 4, ou 5; quando X é $\text{CO}-$, p é de preferência 1, 3, 4, ou 5. Substituintes de alquíleno opcionais incluem flúor, metilo, hidroxi, hidroximetilo e amino.

[278] As unidades P_u preferidas incluem:

[279] (i). Resíduos de aminoácidos únicos: P_u^i ;

[280] (ii). Resíduos dipeptídicos: P_u^{ii} ; e

[281] (iii). Resíduos de ácido amino-(PEG) $_m$ -carboxílico: P_u^{iii} ,

[282] e podem estar presentes em qualquer combinação ou ordem. Por exemplo, S_B pode compreender um ou mais de cada um de P_u^i , P_u^{ii} , e P_u^{iii} em qualquer ordem, ou pode compreender uma ou mais unidades de P_u^i , P_u^{ii} , e P_u^{iii} apenas, ou uma ou mais unidades selecionadas entre P_u^i e P_u^{ii} , P_u^i e P_u^{iii} ou P_u^{ii} e P_u^{iii} .

[283] (i). P_u^i resíduos de aminoácidos únicos

[284] Cada P_u^i pode ser selecionado independentemente entre quaisquer resíduos de aminoácidos naturais ou não naturais e, por exemplo, pode ser selecionado entre Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Gln, Asn, α -Glu, γ -Glu, Asp, Ser, Thr, Gaba, Aib, β -Ala, 5-aminopentanoílo, 6-aminohexanoílo, 7-aminoheptanoílo, 8-aminoctanoílo, 9-aminononanoílo, e 10-

aminodecanoílo. De preferência, os resíduos de aminoácido P_U^i são selecionados entre Gly, Ser, Ala, Thr, e Cys, mais de preferência entre Gly e Ser.

[285] Em algumas formas de realização, S_B é $-(P_U^i)_n-$, em que n é de 1 a 8, mais de preferência de 5 a 7, e de maior preferência é 6. Em algumas formas de realização preferidas, S_B é $-(P_U^i)_n-$, n é 6 e cada P_U^i é selecionado independentemente entre Gly ou Ser, com uma sequência preferida sendo -Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly-.

[286] (ii). P_U^{ii} resíduos dipeptídicos

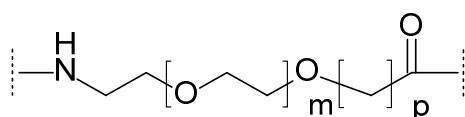
[287] Cada P_U^{ii} pode ser selecionado independentemente entre qualquer resíduo dipeptídico constituído por dois resíduos de aminoácido naturais ou não naturais ligados por uma ligação amida. Os resíduos dipeptídicos P_U^{ii} preferidos incluem Gly-Gly, Gly-Ser, Ser-Gly, Gly-Ala, Ala-Gly, e Ala-Ala, mais de preferência Gly-Ser e Gly-Gly.

[288] Em algumas formas de realização, S_B é $-(P_U^{ii})_n-$, em que n é de 2 a 4, mais de preferência 3, e cada P_U^{ii} é selecionado independentemente entre Gly-Ser e Gly-Gly. Em algumas formas de realização preferidas, S_B é $-(P_U^{ii})_n-$, n é 3 e cada P_U^{ii} é selecionado independentemente entre Gly-Ser e Gly-Gly, com uma sequência preferida sendo -(Gly-Ser)-(Gly-Ser)-(Gly-Gly).

[289] Aminoácidos com centros estereogênicos em P_U^i e P_U^{ii} podem ser rácemicos, enantioenriquecidos, ou enantiopuros. Em algumas formas de realização, o, ou cada, aminoácido é independentemente um L-aminoácido. Em algumas formas de realização, o, ou cada, aminoácido é independentemente um D-aminoácido.

[290] (iii). P_U^{iii} resíduos de ácido amino-(PEG) $_m$ -carboxílico

[291] Cada P_U^{iii} pode ser independentemente um resíduo da fórmula geral:



[292] em que m é 0, 1, 2, 3, 4, ou 5, de preferência 1 ou 2, e p é 1, 3, 4, ou 5, de preferência é 1.

[293] Em algumas formas de realização, m é 1 e p é 1, isto é, P_U^{iii} é um resíduo do ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanóico (também conhecido como ácido {2-[2-aminoetoxi]etoxi}acético e $H_2N\text{-PEG}_3\text{-COOH}$). Este resíduo é aqui referido como $-\text{PEG}_3-$.

[294] Em algumas formas de realização, m é 2 e p é 1, isto é, P_U^{iii} é um resíduo do ácido 11-amino-3,6,9-trioxaundecanóico (também conhecido como $H_2N\text{-PEG}_4\text{-COOH}$). Este resíduo é aqui referido como $-\text{PEG}_4-$.

[295] Em algumas formas de realização, S_B é $-(P_U^{iii})_n-$, em que n é de 1 e 3, e de preferência é 2.

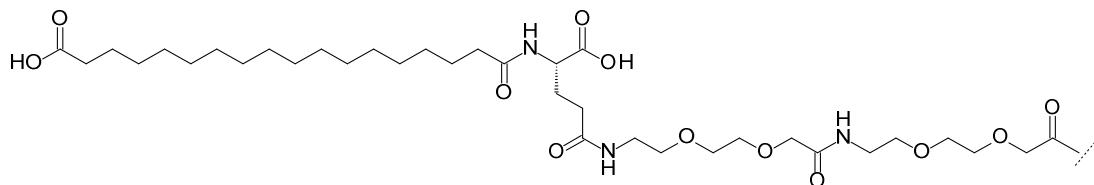
[296] Em algumas formas de realização preferidas, S_B é selecionado entre $-\text{PEG}_3\text{-PEG}_3-$ e $-\text{PEG}_4\text{-PEG}_4-$.

[297] Preferido $-Z^2-Z^1$

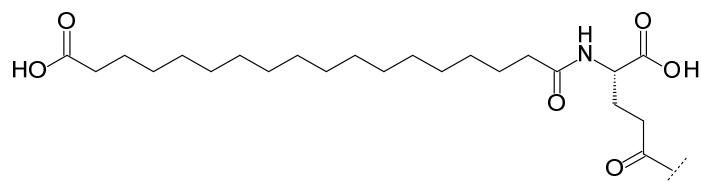
[298] Será reconhecido que as preferências anteriores podem ser combinadas de forma independente para se obter combinações $-Z^2-Z^1$ preferenciais.

[299] Apresentam-se a seguir algumas combinações $-Z^2-Z^1$ preferenciais (em todos os casos --- indica o ponto de fixação à cadeia lateral do componente de aminoácido de Ψ):

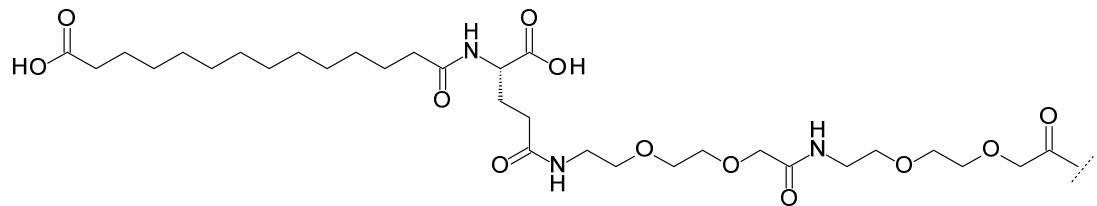
(i) [17-Carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3



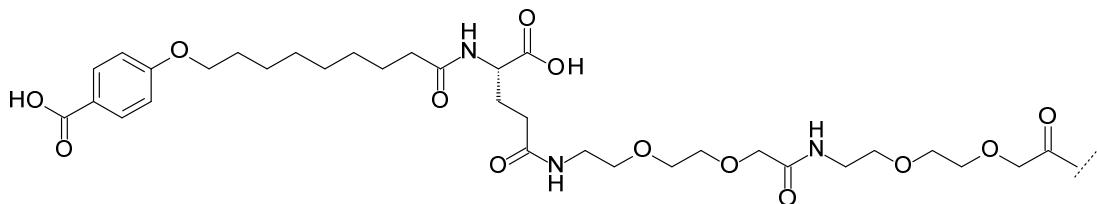
(ii) [17-Carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu



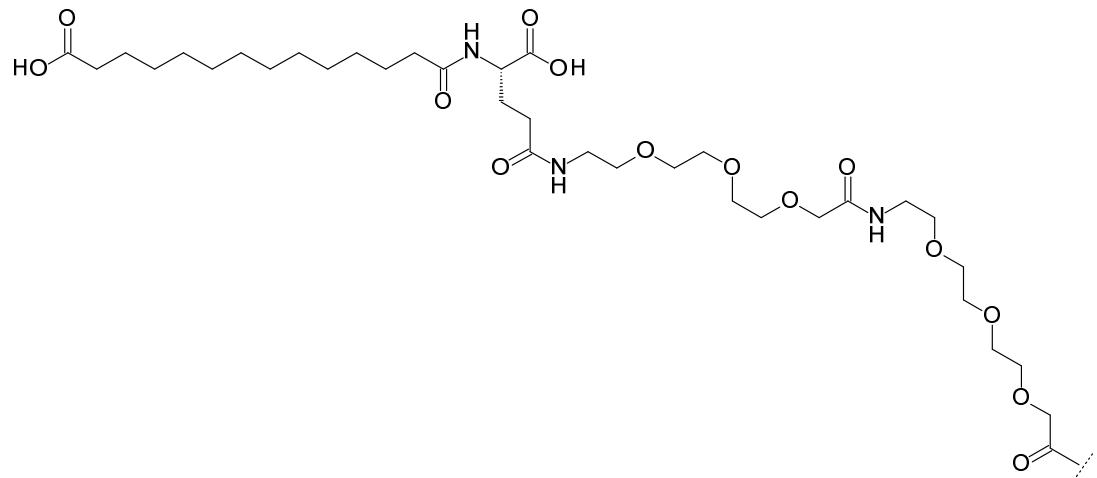
(iii) [13-Carboxi-tridecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3



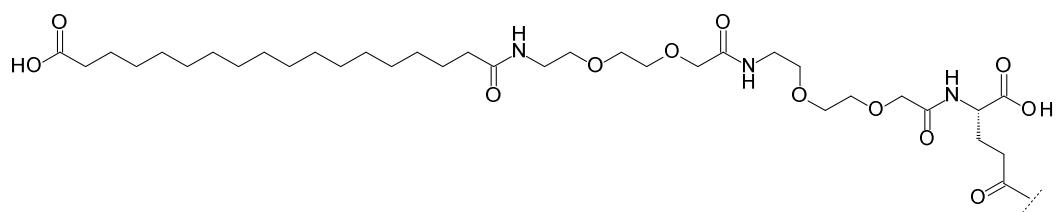
(iv) [Carboxi-fenoxinonanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3



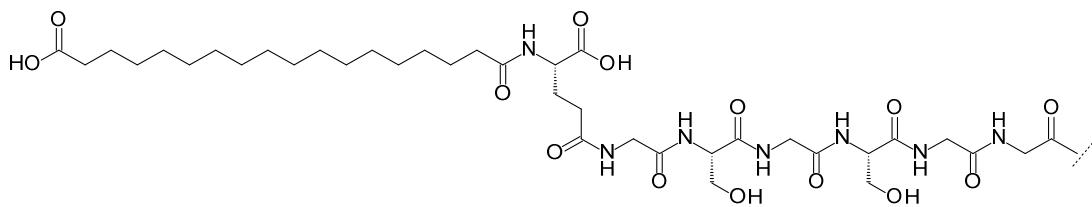
(v) [13-Carboxi-tridecanoílo]-isoGlu-Peg4-Peg4



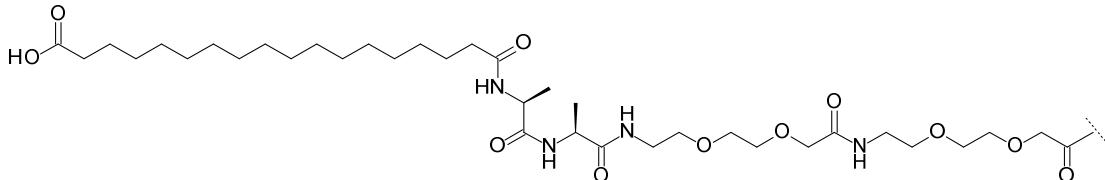
(vi) [17-Carboxi-heptadecanoílo]-Peg3-Peg3-isoGlu



(vii) [17-Carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG



(viii) [17-Carboxi-heptadecanoílo]-AA-Peg3-Peg3



[300] Crê-se que a presença do grupo polar na extremidade de Z^1 melhora as propriedades farmacocinéticas do composto, por exemplo, aumentando a sua semivida e/ou tempo médio de residência e reduzindo a depuração. O ligante pode também contribuir para estas propriedades farmacocinéticas. Os ligantes que compreendem mais de uma unidade de aminoácido (ou unidades de tamanho semelhante) podem melhorar as propriedades farmacocinéticas em comparação com os aminoácidos constituídos por apenas uma unidade de aminoácido ou parecido. Estas propriedades contribuem para que o composto possa ser administrado com menos frequência do que um composto equivalente com o mesmo esqueleto peptídico, mas sem nenhuma modificação ou com uma modificação diferente (por exemplo, um substituinte com uma cadeia gorda alifática à qual falta um grupo polar e/ou que possui uma unidade ligante mais curta).

[301] Sem querer ficar vinculado por uma teoria particular, os inventores constataram que, especialmente quando são incluídos ligantes mais longos, o grupo polar ou carregado na extremidade de Z^1 pode participar em uma não desejada interação intramolecular com o terminal N livre da molécula, o que pode comprometer os efeitos benéficos do grupo polar na farmacocinética. Crê-se que os esqueletos peptídicos dos compostos aqui descritos adotam uma estrutura secundária helicoidal relativamente bem definida e por isso a capacidade do grupo polar para participar em tais interações dependerá da sua localização na molécula. Quando situado no sentido C-terminal, a interação com o terminal N

pode ser relativamente improvável. No entanto, os inventores constataram inesperadamente que o substituinte pode estar situado nos resíduos 16 e 17 da molécula sem necessariamente comprometer os benefícios farmacocinéticos obtidos.

[302] O termo "conjugado" é aqui usado para descrever a ligação física de uma unidade química identificável a outra, bem como a relação estrutural entre estas unidades. Não deverá ser entendido como implicando um método específico de síntese.

[303] O leitor qualificado terá conhecimento de técnicas adequadas que poderão ser utilizadas para levar a cabo reações de acoplamento através de metodologias de síntese gerais descritas em, por exemplo, "Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations", 2nd edition, Larock, R. C.; Wiley-VCH: Nova Iorque, 1999. Estas transformações podem ocorrer em qualquer fase adequada do processo de síntese.

[304] Síntese peptídica

[305] Os compostos da presente invenção podem ser produzidos por métodos sintéticos convencionais, sistemas de expressão recombinante ou qualquer outro método do estado da técnica. Os análogos de glucagon podem, portanto, ser sintetizados de várias maneiras, incluindo, por exemplo, um método que compreende:

- (a) sintetizar o peptídeo por metodologia de fase sólida ou de fase líquida, quer em etapas ou por montagem de fragmentos, e isolamento e purificação do produto de peptídeo final; ou
- (b) expressar a sequência de um peptídeo precursor a partir de uma construção de ácido nucleico codificante do peptídeo precursor, recuperar o produto de expressão e modificar o peptídeo precursor para se obter um composto da invenção.

[306] A expressão é normalmente alcançada a partir de um ácido nucleico codificante do peptídeo precursor, podendo isto ser levado a cabo em um

sistema de expressão com ou sem células que compreenda um tal ácido nucleico.

[307] Os análogos da invenção são preferencialmente preparados por síntese peptídica em fase líquida ou fase sólida. Neste contexto, é feita referência a WO 98/11125 e, entre muitos outros, a Fields, GB et al., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". *In: Synthetic Peptides* (2.ª Edição), e aos Exemplos incluídos.

[308] Para a expressão recombinante, os fragmentos de ácidos nucleicos codificantes do peptídeo precursor serão normalmente inseridos em vetores apropriados para dar formar vetores de clonagem ou vetores de expressão. Os vetores podem, dependendo da finalidade e do tipo de aplicação, estar sob a forma de plasmídeos, fagos, cosmídeos, minicromossomas ou vírus, mas o DNA nu que se expressa apenas transitoriamente em determinadas células é também um vetor importante. Os vetores de clonagem e de expressão preferenciais (vetores plasmídicos) são capazes de replicação autónoma, permitindo deste modo um elevado número de cópias para efeitos de expressão de alto nível ou replicação de alto nível para posterior clonagem.

[309] Em linhas gerais, um vetor de expressão compreende os seguintes elementos no sentido 5'→3' e em ligação operável: um promotor para induzir a expressão do fragmento de ácido nucleico, opcionalmente uma sequência de ácido nucleico codificante de um péptido líder que permite a secreção (para a fase extracelular ou, conforme o caso, para o periplasma), o fragmento de ácido nucleico codificante do peptídeo precursor e, opcionalmente, uma sequência de ácido nucleico codificante de um terminador. Pode incluir elementos adicionais, tais como marcadores de seleção e origens de replicação. Na operação de vetores de expressão com estirpes produtoras ou linhas celulares, poderá preferir-se que o vetor seja capaz de se integrar no genoma celular do hospedeiro. Uma pessoa qualificada estará muito familiarizada com os vetores apropriados e será capaz de construir um de acordo com suas necessidades específicas.

[310] Os vetores da invenção são usados para transformar células hospedeiras com vista a produzirem o peptídeo precursor. Estas células transformadas podem ser células de cultura ou linhas celulares utilizadas na propagação dos fragmentos de ácidos nucleicos e vetores, e/ou utilizadas para a produção recombinante dos peptídeos precursores.

[311] As células transformadas preferidas são microrganismos tais como bactérias [tais como as espécies *Escherichia* (por exemplo, *Escherichia coli*), *Bacillus* (por exemplo, *Bacillus subtilis*), *Salmonella* ou *Mycobacterium* (de preferência não patogénicas, por exemplo, *M. bovis* da BCG), leveduras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*) e protozoários. Alternativamente, as células transformadas podem ser derivadas de um organismo multicelular, ou seja, pode ser uma célula fúngica, uma célula de inseto, uma célula de alga, uma célula vegetal ou uma célula animal, tal como uma célula de mamífero. Para efeitos da clonagem e/ou optimização da expressão, a célula transformada é preferencialmente capaz de replicar o fragmento de ácido nucleico da invenção. As células que expressam o fragmento nucleico podem ser usadas na preparação dos peptídeos da invenção a uma escala reduzida ou à escala industrial.

[312] Ao produzir o peptídeo precursor através de células transformadas, é conveniente, embora não essencial, que o produto de expressão seja secretado para o meio de cultura.

[313] Eficácia

[314] A ligação dos compostos relevantes aos receptores do GLP-1 ou do glucagon (Glu) pode ser utilizada como indicação da atividade agonista, mas em geral prefere-se usar um ensaio biológico que determine a sinalização intracelular associada à ligação do composto ao receptor relevante. Por exemplo, ativação do receptor do glucagon por um agonista do glucagon irá estimular a formação do AMP cíclico (cAMP) celular. De igual modo, a ativação do receptor do GLP-1 por um agonista do GLP-1 irá estimular a formação de cAMP celular. Por conseguinte, a produção de cAMP em células adequadas que

expressam um destes dois receptores pode ser usada para monitorizar a atividade do receptor relevante. A utilização de dois géneros de células adequadas, cada um expressando um receptor, mas não o outro, poderá então servir para determinar a atividade agonista relativamente a ambos os tipos de receptores.

[315] A pessoa qualificada saberá de formatos de ensaio adequados e exemplos destes são dados a seguir. O receptor do GLP-1 e/ou o receptor do glucagon podem ter a sequência dos receptores como descrito nos exemplos. Por exemplo, os ensaios podem utilizar o receptor do glucagon humano (Glucagon-R) com o número de acesso provisório GI:4503947 e/ou o receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon humano (GLP-1R) com o número de acesso provisório GI:166795283 (quando sequências de proteínas precursoras são referidas, deve naturalmente entender-se que os ensaios podem utilizar proteína madura à qual falta a sequência de sinal).

[316] Como medida numérica da potência do agonista para um determinado receptor, podem ser utilizados valores de CE_{50} . Um valor de CE_{50} é uma medida da concentração requerida de um determinado composto para alcançar metade da atividade máxima desse composto em um específico ensaio. Assim, por exemplo, um composto com uma $CE_{50}[\text{GLP-1}]$ inferior à $CE_{50}[\text{GLP-1}]$ do glucagon em um ensaio específico pode ser considerado como tendo maior potência como agonista do receptor do GLP-1 do que o glucagon.

[317] Os compostos descritos neste fascículo são normalmente agonistas duplos GluGLP-1 conforme constatado pela observação de que são capazes de estimular a formação de cAMP tanto no receptor do glucagon como no receptor do GLP-1. A estimulação de cada receptor pode ser medida em ensaios independentes e comparada depois entre si.

[318] Comparando o valor de CE_{50} para o receptor do GLP-1 ($CE_{50}[\text{GLP-1-R}]$) com o valor de CE_{50} para o receptor do glucagon, ($CE_{50}[\text{GlucagonR}]$) de um dado composto, a seletividade relativa para o GLP-1R pode ser calculada como segue:

[319] Seletividade relativa para o GLP-1R [composto] = (CE₅₀ [GLP-1R]) / (CE₅₀ [Glucagon-R])

[320] O termo "CE₅₀" significa a concentração eficaz que induz metade do efeito máximo, normalmente ao nível de um receptor específico ou de um marcador específico para a função do receptor, e pode referir-se a uma atividade inibidora ou antagonista consoante o contexto específico de bioquímica.

[321] Sem querer ficar vinculado a qualquer teoria particular, a seletividade relativa de um composto pode permitir comparar diretamente o seu efeito sobre o receptor de GLP-1 ou de glucagon com o seu efeito sobre outros receptores. Por exemplo, quanto maior a seletividade relativa de um composto para o GLP-1, mais eficaz esse composto pode ser para o receptor do GLP-1 do que para o receptor do glucagon. Normalmente, comparam-se resultados para receptores de glucagon e de GLP-1 da mesma espécie, por exemplo, os receptores humanos de glucagon e de GLP-1, ou os receptores murinos de glucagon e de GLP-1.

[322] Os compostos da invenção podem ter uma seletividade relativa para o GLP-1R maior do que o glucagon humano na medida em que para um determinado nível de atividade agonista do glucagon-R, o composto pode apresentar um nível mais elevado de atividade agonista do GLP-1R (ou seja, maior potência no receptor do GLP-1) do que o glucagon. Será reconhecido que a potência absoluta de um determinado composto nos receptores de glucagon e de GLP-1 pode ser maior, menor ou aproximadamente igual à do glucagon humano nativo, desde que a apropriada seletividade relativa para o GLP-1R seja alcançada.

[323] No entanto, os compostos da presente invenção podem apresentar uma CE₅₀ [GLP-1R] mais baixa do que o glucagon humano. Os compostos podem apresentar uma CE₅₀ [GLP-1-R] mais baixa do que o glucagon e simultaneamente uma CE₅₀ [Glucagon-R] que é menos de 10 vezes superior à do glucagon humano, menos de 5 vezes superior à do glucagon humano, ou menos de 2 vezes superior à do glucagon humano.

[324] Os compostos da invenção podem ter uma CE_{50} [Glucagon-R] que é menos de duas vezes a do glucagon humano. Os compostos podem ter uma CE_{50} [Glucagon-R] que é menos de duas vezes a do glucagon humano, e uma CE_{50} [GLP-1R] que é menos de metade da do glucagon humano, menos de um quinto da do glucagon humano, ou menos de um décimo da do glucagon humano.

[325] A seletividade relativa dos compostos para o GLP-1R pode variar entre 0,05 e 20. Por exemplo, os compostos podem ter uma seletividade relativa de 0,05-0,20, 0,1-0,30, 0,2-0,5, 0,3-0,7, ou 0,5-1,0; 1,0-2,0, 1,5-3,0, 2,0-4,0 ou 2,5-5,0; ou 0,05-20, 0,075-15, 0,1-10, 0,15-5, 0,75-2,5 ou 0,9-1,1.

[326] Em determinadas formas de realização, poderá ser desejável que a CE_{50} de um qualquer composto para ambos, o Glucagon-R e o GLP-1R, por exemplo, para os receptores de glucagon e GLP-1 humanos, seja inferior a 1 nM.

[327] Usos terapêuticos

[328] Os compostos da invenção podem oferecer opções atrativas de tratamento e/ou prevenção para, entre outras, obesidade e doenças metabólicas, incluindo a diabetes, como analisado adiante.

[329] A diabetes comprehende um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação de insulina ou em ambas. Sinais agudos de diabetes incluem produção excessiva de urina, sede compensatória resultante e maior ingestão de líquidos, visão turva, perda de peso inexplicada, letargia e alterações no metabolismo energético. A hiperglicemia crónica da diabetes está associada com danos a longo prazo, disfunção e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. A diabetes é classificada em diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 e diabetes gestacional, com base nas características patogénicas.

[330] A diabetes tipo 1 é responsável por 5-10% de todos os casos de diabetes e é causada pela destruição autoimune das células pancreáticas de secreção da β -insulina.

[331] A diabetes tipo 2 é responsável por 90-95% dos casos de diabetes e é resultado de um conjunto complexo de distúrbios metabólicos. A diabetes tipo 2 é consequência de a produção endógena de insulina se tornar insuficiente para manter os níveis de glicose do plasma abaixo dos limiares de diagnóstico.

[332] A diabetes gestacional refere-se a qualquer grau de intolerância à glicose identificado durante a gravidez.

[333] A pré-diabetes inclui uma glicemia em jejum alterada e uma intolerância à glicose e refere-se aos estados que ocorrem quando os níveis de glicose no sangue são elevados, mas abaixo dos níveis estabelecidos para o diagnóstico clínico da diabetes.

[334] Uma grande proporção de pessoas com diabetes tipo 2 e pré-diabetes apresenta um risco maior de morbidade e mortalidade devido à elevada prevalência de fatores de risco metabólicos adicionais, incluindo obesidade abdominal (tecido adiposo excessivo em torno de órgãos abdominais internos), dislipidemia aterogénica (distúrbios gordura do sangue incluindo triglicerídeos elevados, colesterol HDL baixo e/ou colesterol LDL alto, que promovem a acumulação de placa nas paredes das artérias), tensão arterial elevada (hipertensão), um estado pró-trombótico (por exemplo, fibrinogénio elevado ou inibidor do ativador do plasminogénio 1 no sangue) e estado pró-inflamatório (por exemplo, elevada proteína C reativa no sangue).

[335] Por outro lado, a obesidade aumenta o risco de desenvolver pré-diabetes, diabetes tipo 2, bem como, por exemplo, certos tipos de cancro, apneia obstrutiva do sono e doença da vesícula biliar.

[336] A dislipidemia está associada com um risco aumentado de doença cardiovascular. A lipoproteína de alta densidade (HDL) é de importância clínica, uma vez que existe de uma correlação inversa entre as concentrações de HDL no plasma e o risco de doença aterosclerótica. A maior parte do colesterol

armazenado no ateroma origina do LDL e, portanto, elevadas concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) estão intimamente associadas à aterosclerose. A relação HDL/LDL é um indicador de risco clínico para a aterosclerose e para a aterosclerose coronária em particular.

[337] A síndrome metabólica é caracterizada por um grupo de fatores de risco metabólicos em uma pessoa. Estes incluem obesidade abdominal (tecido adiposo excessivo em torno dos órgãos abdominais internos), dislipidemia aterogénica (distúrbios de gordura do sangue incluindo triglicerídeos elevados, colesterol HDL baixo e/ou colesterol LDL alto, que promovem a acumulação de placa nas paredes das artérias), tensão arterial elevada (hipertensão), resistência à insulina e intolerância à glicose, estado pró-trombótico (p. ex., fibrinogénio elevado ou inibidor do ativador do plasminogénio 1 no sangue) e estado pró-inflamatório (p. ex., elevada proteína C reativa no sangue).

[338] Indivíduos com síndrome metabólica têm maior risco de doença coronária e outras doenças relacionadas com outras manifestações da arteriosclerose (por exemplo, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica). O fator de risco dominante subjacente a esta síndrome parece ser a obesidade abdominal.

[339] Sem querer ficar vinculado por nenhuma teoria específica, crê-se que os compostos da invenção atuam como agonistas duplos, isto é, sobre o receptor humano do glucagon e sobre o receptor humano do GP1, e são aqui abreviados como agonistas duplos GluGLP-1. O agonista duplo pode combinar o efeito do glucagon, por exemplo, sobre o metabolismo da gordura, com o efeito do GLP-1, por exemplo, sobre os níveis de glicose no sangue e na ingestão de alimentos. Pode, portanto, agir no sentido de acelerar a eliminação do excesso de tecido adiposo, induzir a perda de peso sustentável e melhorar o controlo glicémico. Os agonistas duplos GluGLP-1 podem também atuar no sentido de reduzir os fatores de risco cardiovasculares, tais como colesterol elevado, colesterol LDL elevado ou baixos índices de colesterol HDL/LDL.

[340] Os compostos da presente invenção podem, portanto, ser usados em um indivíduo com sua necessidade, como agentes farmacêuticos para prevenir o ganho de peso, promover a perda de peso, reduzir o excesso de peso ou tratar obesidade (por exemplo, controlo do apetite, da alimentação, da ingestão de alimentos, da ingestão de calorias e/ou do consumo de energia), incluindo obesidade mórbida, bem como doenças e estados de saúde associados com, incluindo mas sem lhes estar limitados, inflamação associada à obesidade, doença da vesícula biliar associada à obesidade e apneia do sono induzida por obesidade. Os compostos da invenção podem também ser utilizados no tratamento de condições clínicas causadas por, ou associadas com controle glicémico alterado, incluindo síndrome metabólica, resistência à insulina, intolerância à glicose, pré-diabetes, glicemia em jejum aumentada, diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose, arteriosclerose, doença coronária, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral, em um indivíduo com sua necessidade. Algumas destas condições clínicas podem estar associadas com a obesidade. No entanto, os efeitos dos compostos da invenção nestas condições clínicas podem ser mediados, no todo ou em parte, por um efeito sobre o peso corporal, ou podem ser independentes deste.

[341] O efeito sinérgico dos agonistas duplos GluGLP-1 pode também resultar na redução dos fatores de risco cardiovasculares, tais como níveis elevados de colesterol e LDL, o que pode ser totalmente independente do seu efeito sobre o peso corporal.

[342] Assim, a invenção proporciona a utilização de um composto da invenção no tratamento de uma condição clínica como descrita atrás, em um indivíduo com sua necessidade.

[343] A invenção proporciona também um composto da invenção para utilização em um método de tratamento médico, particularmente para utilização em um método de tratamento de uma condição clínica como descrita atrás.

[344] Em um aspeto preferencial, os compostos descritos podem ser utilizados no tratamento da diabetes, especialmente diabetes tipo 2.

[345] Em uma forma de realização específica, a presente invenção compreende a utilização de um composto no tratamento da diabetes, especialmente diabetes tipo 2, em um indivíduo com sua necessidade.

[346] Em um aspeto não menos preferido, os compostos descritos podem ser utilizados para evitar o ganho de peso ou promover a perda de peso.

[347] Em uma forma de realização específica, a presente invenção compreende a utilização de um composto para evitar o ganho de peso ou promover a perda de peso em um indivíduo com sua necessidade.

[348] Em uma forma de realização específica, a presente invenção compreende a utilização de um composto em um método de tratamento de uma condição clínica causada ou caracterizada por excesso de peso, p. ex., tratamento e/ou prevenção da obesidade, obesidade mórbida, obesidade mórbida antes de cirurgia, inflamação associada à obesidade, doença da vesícula biliar ligada a obesidade, apneia do sono induzida por obesidade, pré-diabetes, diabetes, especialmente diabetes tipo 2, hipertensão, dislipidimia aterogénica, aterosclerose, arteriosclerose, doença coronária, doença arterial periférica, acidente vascular cerebral ou doença microvascular em um indivíduo com sua necessidade.

[349] Noutro aspeto, os compostos descritos podem ser usados em um método para reduzir os níveis de LDL circulante e/ou para aumentar a relação HDL/LDL.

[350] Em uma forma de realização específica, a presente invenção compreende a utilização de um composto em um método de redução dos níveis de LDL circulante, e/ou de aumento na relação HDL/LDL em um indivíduo com sua necessidade.

[351] Noutro aspeto, os compostos descritos podem ser usados em um método de redução dos níveis de triglicerídeos circulantes.

[352] Composições farmacêuticas

[353] Os compostos da presente invenção podem ser formulados como composições farmacêuticas preparadas para armazenamento ou administração.

Uma tal composição compreende normalmente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da invenção, na forma apropriada, em um transportador farmaceuticamente aceitável.

[354] A quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da presente invenção dependerá da via de administração, do tipo de mamífero tratado e das características físicas do específico mamífero em questão. Estes fatores e a sua relação determinam a quantidade eficaz e são bem conhecidos pelos profissionais qualificados na especialidade médica. Esta quantidade e o método de administração podem ser adaptados para alcançar ótima eficácia e podem depender de fatores como o peso, dieta, medicação simultânea e outros fatores bem conhecidos pelas pessoas qualificadas nas artes médicas. A posologia e os tamanhos das doses mais adequados para uso humano podem basear-se nos resultados obtidos pela presente invenção e podem ser confirmados em ensaios clínicos concebidos corretamente. Os compostos da presente invenção podem ser particularmente úteis para o tratamento de seres humanos.

[355] Uma dose e protocolo de tratamento eficazes podem ser determinados por meios convencionais, começando com uma dose baixa em animais de laboratório e aumentando a dose ao mesmo tempo que os efeitos são monitorizados, e variando também sistematicamente a posologia. Inúmeros fatores podem ser tidos em conta pelo médico na determinação da dose ideal para um determinado indivíduo. Estas considerações são conhecidas pelo técnico qualificado.

[356] O termo "transportador farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer um dos transportadores farmacêuticos comuns. Transportadores farmaceuticamente aceitáveis para uso terapêutico são bem conhecidos na arte farmacêutica e estão descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (ed. A. R. Gennaro 1985). Poderá utilizar-se, por exemplo, solução salina estéril e solução salina tamponada com fosfato a um pH ligeiramente ácido ou fisiológico. Os agentes tampão de pH podem ser fosfato, citrato, acetato, tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), ácido N-

Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanossulfónico (TAPS), bicarbonato de amónio, dietanolamina, histidina, que é um tampão preferido, arginina, lisina, ou acetato ou suas misturas. O termo abrange também quaisquer agentes listados na Farmacopeia dos Estados Unidos para uso em animais, incluindo seres humanos.

[357] O termo "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal de qualquer um dos compostos da invenção. Sais incluem sais farmaceuticamente aceitáveis, tais como sais de adição de ácidos e sais básicos. Exemplos de sais de adição de ácido incluem sais cloridrato, sais citrato e sais acetato. Exemplos de sais básicos incluem sais nos quais o catião é selecionado de metais alcalinos, tais como sódio e potássio, de metais alcalino-terrosos, tais como cálcio e os iões de amónio $^+N(R^3)_3(R^4)$, em que R^3 e R^4 designam independentemente alquilo C_{1-6} opcionalmente substituído, alcenilo C_{2-6} opcionalmente substituído, arilo opcionalmente substituído ou heteroarilo opcionalmente substituído. Outros exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis estão descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17.^a edição. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 e edições mais recentes, e na Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology.

[358] "Tratamento" é uma abordagem para a obtenção de resultados clínicos benéficos ou desejados. Para os fins da presente invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, sem lhes estar limitados, alívio dos sintomas, diminuição da extensão da doença, estado de doença estabilizado (ou seja, sem agravamento), atraso ou abrandamento da progressão da doença, melhoria ou palação do estado de doença e remissão (quer parcial ou total), detectável ou indetectável. "Tratamento" pode significar também prolongar a sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada na ausência de tratamento. "Tratamento" é uma intervenção realizada com o intuito de prevenir o desenvolvimento ou alterar a patologia de um distúrbio. Nesse sentido, "tratamento" refere-se a ambos, tratamento terapêutico e profilático, ou a

medidas preventivas em determinadas formas de realização. As pessoas com necessidade de tratamento incluem aquelas que já apresentam o distúrbio bem como aquelas em que se deseja prevenir o distúrbio. Por tratamento entende-se inibição ou redução de um agravamento na patologia ou sintomas (por exemplo, ganho de peso, hiperglicemia) quando comparado com a ausência de tratamento e não implica necessariamente a cessação completa da condição clínica em causa.

[359] As composições farmacêuticas podem estar na forma de dosagem de unidades. Nesta forma, a composição é dividida em doses unitárias contendo quantidades adequadas do componente ativo. A forma de dosagem de unidades pode ser uma preparação embalada, a embalagem contendo quantidades discretas das preparações, por exemplo, comprimidos, cápsulas e pós embalados em frascos ou ampolas. A forma de dosagem de unidades também pode ser uma cápsula, hóstia ou comprimido, ou pode ser o número apropriado de qualquer uma destas formas embaladas. Pode ser fornecida na forma injetável de dose única, por exemplo na forma de uma caneta. Em determinadas formas de realização, as formas embaladas incluem um rótulo ou inserto com instruções de utilização. As composições podem ser formuladas por qualquer via e meios de administração adequados. Os transportadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles usados em formulações adequadas para administração oral, retal, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), vaginal ou parentérica (incluindo subcutânea, intramuscular, endovenosa, intradérmica e transdérmica). As formulações podem ser convenientemente apresentadas na forma de dosagem de unidades e podem ser preparadas por qualquer um dos métodos conhecidos na arte da farmácia.

[360] As vias de administração subcutânea ou transdérmica podem ser particularmente adequadas para os compostos aqui descritos.

[361] Através de, por exemplo, interações covalentes, hidrofóbicas e eletrostáticas, as composições da invenção podem ainda mais manipuladas farmaceuticamente em, ou fixadas a, um transportador de fármacos, sistema de

entrega de fármacos e sistema avançado de entrega de fármacos a fim de melhorar ainda mais a estabilidade do composto, aumentar a biodisponibilidade, aumentar a solubilidade, diminuir os efeitos adversos, alcançar cronoterapia bem conhecida por aqueles qualificados na arte, aumentar a adesão do doente, ou qualquer combinação destes. Exemplos de transportadores, sistemas de entrega de fármacos e sistemas avançados de entrega de fármacos incluem, sem lhes estar limitados, polímeros, por exemplo, celulose e derivados, polissacarídeos, por exemplo, dextrano e derivados, amido e derivados, polímeros de poli(álcool vinílico), acrilato e metacrilato, ácido polilático e poliglicólico e seus copolímeros de bloco, polietilenoglicóis, proteínas transportadoras, por exemplo, albumina, géis, por exemplo, sistemas de termogelificação, por exemplo sistemas copoliméricos de bloco conhecidos pelos especialistas, micelas, lipossomas, microesferas, nanoparticulados, cristais líquidos e suas dispersões, fase L2 e as suas dispersões bem conhecidas por aqueles qualificados na arte do comportamento de fases em sistemas lípido-água, micelas poliméricas, emulsões múltiplas, autoemulsionantes e automicroemulsionantes, ciclodextrinas e seus derivados e dendrímeros.

[362] Terapia de combinação

[363] Um composto ou composição da invenção pode ser administrado como parte de uma terapia de combinação com um agente para tratamento da obesidade, hipertensão, dislipidemia ou diabetes.

[364] Em tais casos, os dois agentes ativos podem ser administrados em conjunto ou separadamente, e como parte da mesma formulação farmacêutica ou em formulações distintas.

[365] Assim, o composto ou composição da invenção pode ainda ser usado em combinação com um agente antiobesidade, incluindo, mas sem lhes estar limitado, um agonista do receptor 1 do peptídeo semelhante ao glucagon, o peptídeo YY ou um seu análogo, um antagonista do receptor canabinoide 1, inibidor da lipase, agonista do receptor 4 da melanocortina, antagonista do receptor 1 da hormona concentradora da melanina, fentermina (sozinha ou em

combinação com topiramato), uma combinação de um inibidor da recaptação de norepinefrina/dopamina e de um antagonista do receptor opioide (por exemplo, uma combinação de bupropiona e naltrexona), ou um agente serotoninérgico (por exemplo, lorcaserina).

[366] O composto ou composição da invenção pode ainda ser usado em combinação com um agente contra a hipertensão, incluindo, mas sem lhes estar limitado, um inibidor da enzima conversora da angiotensina, um bloqueador do receptor da angiotensina II, um diurético, um beta-bloqueador ou um bloqueador dos canais de cálcio.

[367] Um composto ou composição da invenção pode ser usado em combinação com um agente contra a displidemia, incluindo, mas sem lhes estar limitado, uma estatina, um fibrato, uma niacina ou um inibidor da absorção do colesterol.

[368] Além disso, um composto ou composição da invenção pode ser usado em combinação com um agente antidiabético, incluindo, mas sem lhes estar limitado, uma biguanida (por exemplo, metformina), uma sulfonilureia, uma meglitinida ou glinida (por exemplo, nateglinida), um inibidor da DPP-IV, um inibidor do SGLT2, uma glitazona, um agonista do GLP-1 diferente, uma insulina, um análogo da insulina. Em uma forma de realização preferencial, o composto ou seu sal é usado em combinação com insulina ou um análogo de insulina, inibidor da DPP-IV, sulfonilureia ou metformina, particularmente sulfonilureia ou metformina, para alcançar o controlo glicémico adequado. Exemplos de análogos de insulina incluem, sem lhes estar limitados, Lantus, Novorapid, Humalog, Novomix e Actraphane HM, Levemir e Apidra.

[369] EXEMPLOS

[370] Exemplo 1: Síntese geral de análogos de glucagon

[371] A síntese peptídica em fase sólida (SPPS) foi realizada em um sintetizador assistido por microondas, utilizando a estratégia padrão de Fmoc em NMP em uma resina de poliestireno (TentaGel S Ram). HATU foi usado como reagente de acoplamento juntamente com DIPEA como base. Piperidina (20%

em NMP) foi usada para a desproteção. Pseudoprolinas: Fmoc-Phe-Thr(psiMe,Mepro)-OH e Fmoc-Asp-Ser(psiMe,Mepro)-OH (adquirido da NovaBiochem) foram utilizados conforme o caso.

[372] Foram utilizadas as seguintes abreviações:

- [373] Boc: tert-butiloxicarbonilo
- [374] ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
- [375] Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
- [376] DCM: diclorometano
- [377] DMF: *N,N*-dimetilformamida
- [378] DIPEA: diisopropiletilamina
- [379] EDT: 1,2-etanoditiol
- [380] EtOH: etanol
- [381] Et₂O: éter dietílico
- [382] HATU: *N*-óxido de hexafluorofosfato de *N*-(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridina-1-ilmetileno]-*N*-metilmelanamínio
- [383] MeCN: acetonitrilo
- [384] NMP: *N*-metilpirrolidona
- [385] TFA: ácido trifluoroacético
- [386] TIS: triisopropilsilano
- [387] *Clivagem:*

[388] O peptídeo bruto foi clivado da resina por tratamento com TFA/TIS/água 95/2,5/2,5% (v/v) à temperatura ambiente por 2 horas. A maior parte do TFA foi removido sob pressão reduzida e o peptídeo bruto foi precipitado e lavado com éter dietílico e deixado secar até peso constante, à temperatura ambiente.

[389] Os seguintes compostos foram sintetizados:

- 1 H-H-Aib-QGTFTSDiSKY LDS-K([15-carboxi-pentadecanoílo]-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH₂.
- 2 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂

- 3 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 - 4 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
 - 5 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
 - 6 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
 - 7 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
 - 8 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA-NH₂
 - 9 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
 - 1 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
 - 1 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
 - 1 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂
 - 1 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 - 1 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
 - 1 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂
 - 1 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂
- [390]** O semaglutide de análogo do GLP-1 acilado também foi sintetizado e tem a estrutura:

[391] H-H-[2-metil-Ala]-EGTFTSDVSSYLEGQAA-K([17-carboxi-heptadecanoílo]-isoGlu-Peg3-Peg3)-EFIAWLVRGRG-OH.

[392] Exemplo 2: Ensaios de eficácia do receptor do glucagon e do receptor do GLP-1

[393] O cDNA codificante quer do receptor do glucagon humano (Glucagon-R) (número de acesso provisório P47871) quer do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon humano (GLP-1R) (número de acesso provisório P43220) foram sintetizados e clonados em um vetor de expressão mamífero contendo Zeocin como marcador de resistência.

[394] Os vetores de expressão mamíferos codificantes do Glucagon-R ou do GLP-1R foram transfetados para células de ovário de hamster chinês (CHO) pelo método de Attractene. Obtiveram-se clones de expressão estável pela seleção com Zeocin (250 µg/mL) após diluição limitada das células resistentes à pressão de seleção. Os clones de células que expressavam o glucagon-R e o GLP-1R foram escolhidos, propagados e testados através de ensaios de eficácia de Glucagon-R e GLP-1R conforme descrito a seguir. Um clone que expressava o Glucagon-R e um clone que expressava o GLP-1R foram escolhidos para determinação do perfil de compostos.

[395] Células CHO que expressavam o Glucagon-R humano ou o GLP-1R humano foram cultivadas 24 horas antes do ensaio em placas de microtitulação de 96 poços, a 30 000 células por poço e em 100 µl de meio de crescimento. No dia da análise, o meio de crescimento foi removido e as células foram lavadas uma vez com 200 µl de tampão de ensaio (Krebs-Ringer- tampão – KRBH). O tampão foi removido e as células foram incubadas durante 15 min à temperatura ambiente em 10 µl de KRBH (KRBH + HEPES 10 mM, NaHCO₃ 5 mM, BSA a 0,1% (v/v)) com IBMX 0,1 mM em água desionizada contendo concentrações crescentes dos peptídeos de teste. A reação foi interrompida pela adição de tampão de lise (BSA a 0,1% p/v, HEPES 5 mM, Tween-20 a 0,3% v/v). Após lise celular durante 10 min à temperatura ambiente, os lisados foram transferidos para placas de 384 poços e adicionou-se 10 µl da mistura de esferas

aceitadoras/doadoras incluída no *kit* de ensaio AlphaScreen™ cAMP Functional. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente no escuro, o teor de cAMP foi determinado utilizando o *kit* de ensaio AlphaScreen™ cAMP Functional da Perkin-Elmer de acordo com as instruções do fabricante. A CE₅₀ e as eficácia relativas em comparação com os compostos de referência (o glucagon e o GLP-1) foram calculadas por ajustamento de curvas assistido por computador. O rácio GLP-1/glucagon foi calculado conforme descrito anteriormente. Consulte a tabela 1.

Tabela 1

Composto	CE50 hGCGR CHO-K1 [nM]	CE50 hGLP-1R CHO-K1 [nM]	Rácio GLP-1/ Glucagon
1	0,21	0,38	1,81
2	0,13	1,76	13,54
3	1,48	0,70	0,47
4	0,45	0,70	1,56
5	0,18	0,83	4,61
6	0,44	1,43	3,25
7	0,11	0,97	8,82
8	0,31	0,80	2,58
9	0,07	0,97	13,86
10	1,08	0,41	0,38
11	0,28	0,56	2,00
12	0,07	0,48	6,86
13	0,52	0,33	0,63
14	0,18	0,60	3,33
15	0,92	0,61	0,65
16	0,16	0,53	3,31

[396] **Exemplo 3: Atividade agonística no receptor de GLP-1 endógeno**

[397] Determinou-se a atividade agonística dos compostos de teste no receptor de GLP-1 endógeno utilizando uma linha celular murina de insulinoma. Utilizou-se cAMP intracelular como indicador da ativação do receptor.

[398] As células foram cultivadas durante 24 h, a uma densidade de 10 000 células/poço em uma placa de 384 poços. Removeu-se o meio e adicionou-se 10 µl de tampão KRBH (NaCl 130 mM, KCl 3,6 mM, NaH₂PO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 1,5 mM) contendo quer os compostos de teste, quer GLP-1 (a concentrações crescentes de 0,1 pM a 100 nM) ou solvente de controlo (DMSO a 0,1% v/v) aos poços durante 15 minutos e a uma temperatura de 26 °C.

[399] O teor de cAMP celular foi medido usando o *kit* de ensaio AlphaScreen cAMP Functional (Perkin Elmer). A medição foi realizada com a Envision (PerkinElmer) de acordo com as recomendações do fabricante.

[400] Os resultados foram convertidos em concentrações de cAMP através de uma curva padrão de cAMP preparada em tampão KRBH contendo 0,1% v/v de DMSO. As curvas de cAMP resultantes foram traçadas como concentrações absolutas de cAMP (nM) em função do log da concentração do composto de teste e foram analisadas com o programa de ajustamento de curvas XLfit.

[401] Os parâmetros calculados para descrever tanto a potência como a atividade agonística de cada composto de teste no receptor de GLP-1 endógeno foram:

[402] pCE50 (valor logarítmico negativo de CE50, uma concentração resultante de uma elevação a metade do máximo nos níveis de cAMP, o que reflete a potência do composto de teste);

[403] Percentagem de controlo (% CTL) (% elevação de cAMP para cada concentração do composto de teste normalizada para a resposta máxima de cAMP induzida por GLP-1 (100% CTL)). Consulte a tabela 2. Consulte a tabela 2.

Tabela 2

Composto	CE50 [nM]
1	0,60

2	0,69
3	0,15
4	0,40
5	0,65
6	0,54
7	0,47
8	0,36
9	0,84
10	0,60
11	0,72
12	0,81
13	0,37
14	0,38
15	0,25
16	0,34

[404] Exemplo 4: Atividade agonística no receptor do glucagon endógeno

[405] A atividade agonística dos compostos teste no receptor de glucagon endógeno foi determinada medindo o seu efeito sobre a taxa de síntese de glicogénio em hepatócitos primários de rato. Esperava-se uma inibição na taxa de síntese do glicogénio, após a ativação do receptor de glucagon. A taxa de síntese de glicogénio foi determinada pela contagem da quantidade de glicose marcada radioativamente incorporada nas reservas de glicogénio celular durante um determinado período de tempo.

[406] Hepatócitos primários de rato foram cultivados a uma densidade de 40 000 células/poço em uma placa de 24 poços, durante 24 horas a 37° C e a 5% de CO₂.

[407] O meio foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Adicionou-se então aos poços 180 µl de tampão à base de KRBH contendo 0,1% de BSA e glicose a uma concentração de 22,5 mM, seguido do composto de

teste e glicose D-[U¹⁴C] a 40 µCi/ml (20 µL cada). A incubação continuou durante 3 horas.

[408] No fim do período de incubação, o tampão de incubação foi aspirado e as células foram lavadas uma vez com PBS gelado antes da lise por incubação durante 30 min à temperatura ambiente com 100 µl de NaOH a 1 mol/l.

[409] Os lisados celulares foram transferidos para placas-filtro de 96 poços e o glicogénio foi precipitado por incubação das placas-filtro durante 120 min a 4 °C, seguido de lavagem das placas-filtro 4 vezes com etanol gelado (70%). Os precipitados resultantes foram filtrados até à secura e a quantidade de ¹⁴C-glicose incorporada foi determinada com um contador de cintilação Topcount de acordo com as recomendações do fabricante.

[410] Como referência para a síntese de glicogénio não inibida (100% CTL) incluíram-se poços com veículo de controlo (0,1% v/v de DMSO em tampão KRBH). Foram também incluídos poços sem glicose D-[U¹⁴C] adicionada como controlo para o sinal de fundo não específico (subtraído de todos os valores). Peptídeo de glucagon endógeno foi usado como controlo positivo.

[411] Todos os tratamentos foram realizados pelo menos em duplicado.

[412] Os parâmetros calculados para descrever tanto a potência como a atividade agonística de cada composto de teste no receptor de glucagon endógeno foram a pCE50 e a % CTL.

[413] A % CTL é determinada calculando a percentagem de CPM/poço na presença do composto do teste em comparação com o CPM/poço do veículo de controlo depois de subtrair o CPM/poço de fundo:

[414]
$$[(\text{CPM/poço (basal)} - \text{CPM/poço (amostra)}) * 100] / [\text{CPM/poço (basal)} - \text{CPM/poço (controlo)}]$$

[415] Um ativador do receptor do glucagon resultará na inibição da taxa de síntese do glicogénio e dará valores de % CTL entre 0% CTL (inibição completa) e 100% CTL (sem inibição observável).

[416] As resultantes curvas de atividade foram traçadas como contagens absolutas (unidade: cpm/amostra) em função do log da concentração do

composto de teste, e foram analisadas através do programa de ajustamento de curvas XLfit.

[417] A pCE50 (valor logarítmico negativo da CE50) reflete a potência do composto do teste.

Tabela 3

Composto	CE50 [nM]
1	0,85
2	0,11
3	0,94
4	1,79
5	0,21
6	0,80
7	0,34
8	0,29
9	0,11
10	1,53
11	0,95
12	0,45
13	0,43
14	0,19
15	3,63
16	0,19

[418] Os termos CE₅₀ e pCE₅₀ referidos em relação à ativação do GPL-1R podem igualmente ser considerados Cl₅₀ e pCl₅₀ em relação à síntese do glicogénio.

[419] **Exemplo 5: Estimativa de parâmetros farmacocinéticos**

[420] Os parâmetros farmacocinéticos dos compostos teste foram determinados após administração intravenosa a ratos Han/Wistar. O semaglutide de análogo do GLP-1 acilado foi também testado para fins de comparação:

[421] Obtiveram-se ratos Wistar machos de Charles River (Alemanha), que apresentavam um peso de cerca de 180 a 210 g no momento da chegada à instalação de teste. Os ratos foram enjaulados em gaiolas para ratos de padrão europeu tipo IV com um ciclo de 12 horas de escuro e 12 horas de luz. Durante o estudo, os ratos foram alojados em gaiolas para ratos padrão tipo III. Comida Altromin 1324 (Altromin, Alemanha) e água foram administradas *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais estiveram alojados na instalação de ensaio durante pelo menos 4 dias para garantir uma aclimatação adequada.

[422] Os compostos foram primeiro dissolvidos em amônia aquosa a 0,1%, a uma concentração nominal de 2 mg/ml, e em seguida foram diluídos para a desejada concentração de dosagem (10 μ M) com PBS estéril contendo tampão de fosfato a 25 mM, pH 7,4. Deram-se injeções intravenosas, correspondentes a 20 nmole/kg, em uma veia lateral da cauda.

[423] Amostras de sangue (200 μ l) foram colhidas do plexo periorbital às 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32 e 48 horas pós-dosagem em tubos K₃EDTA tubos e foram centrifugadas durante 5 minutos a 4 °C nos 20 minutos seguintes à amostragem. Amostras de plasma (> 100 μ l) foram transferidas para placas PCR de 96 poços, congeladas imediatamente e mantidas a -20 °C até serem analisadas para a concentração plasmática do respectivo composto de GLP-1-glucagon por LC-MS/MS. Os perfis individuais de concentração plasmática-tempo foram analisados por uma abordagem não compartmental através do programa ToxKinTM versão 3.2 (Unilog IT Services) e os parâmetros farmacocinéticos resultantes foram determinados. Consulte a tabela 4.

Tabela 4

Composto	Eliminação (ml/min/kg)	Semivida terminal (h)	Tempo médio de residência (h)
2	0,11	9,1	13,6

3	0,056	23,4	28,7
4	0,11	13,7	17,6
Semaglutide	0,10	9,0	11,4

REIVINDICAÇÕES

1. Composto caracterizado pela fórmula:

$R^1-P^1-P^2-R^2$

na qual R^1 é H, alquilo C₁₋₄, acetilo, formilo, benzoílo ou trifluoroacetilo;

R^2 é OH ou NH₂;

P^1 é um peptídeo com a sequência:

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-

AAKDFIEWLESA;

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-
RAKDFIEWLESA;

H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-
RAKDFIEWLESA;

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-
AAKDFIEWLESA;

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-
RAKDFIEWLESA;

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-
GSGSGG)-WLESA;

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-
GSGSGG)-WLESA;

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-
GSGSGG)-WLESA;

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-
isoGlu-GSGSGG)-A; ou

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-
isoGlu-GSGSGG)-A;

e P^2 é ausente

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é selecionado de:

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-

AAKDFIEWLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-
Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-
Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂;

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂; e

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂.

3. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende um composto, conforme definido na reivindicação 1, em uma mistura com um transportador.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que a composição é uma composição farmacêutica, e o transportador é um transportador farmaceuticamente aceitável.

5. Kit terapêutico **caracterizado** pelo fato de compreender um composto, conforme definido na reivindicação 1, opcionalmente em mistura com um transportador.

6. Método para produzir um composto, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende expressar uma sequência de peptídeo precursor a partir de uma construção de ácido nucleico que codifica o peptídeo precursor, recuperar o produto de expressão e modificar o peptídeo precursor para produzir um composto, conforme definido na reivindicação 4.

7. Composto **caraterizado** pelo fato de ser selecionado a partir de:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂;

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂;

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂; e

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂;

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

8. Composto, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o composto é:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

9. Composto, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o composto é:

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

10. Composto, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o composto é:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

11. Composto, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o composto é:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

12. Composto, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o composto é:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAKDFIEWLE-K([17-carboxi-heptadecanoil]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂

ou um sal farmaceuticamente aceitável deste.

13. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 7 a 12, caracterizado por ser para prevenção de ganho de peso ou promoção de perda de peso em um indivíduo com sua necessidade.

14. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 7 a 12, caracterizado por ser para redução dos níveis de LDL circulante e/ou aumento da relação HDL/LDL em um indivíduo com sua necessidade.

15. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 7 a 12, caracterizado por ser para tratamento de uma condição clínica causada ou caracterizada por excesso de peso.

16. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 7 a 12, caracterizado por ser para prevenção ou tratamento de obesidade, obesidade

mórbida, obesidade mórbida antes de cirurgia, inflamação associada à obesidade, doença da vesícula biliar ligada a obesidade, apneia do sono induzida por obesidade, diabetes, síndrome metabólica, hipertensão, dislipidemia aterogénica, atherosclerose, arteriosclerose, doença coronária, doença arterial periférica, acidente vascular cerebral ou doença microvascular.

17. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 7 a 12, caracterizado por ser para prevenir o ganho de peso ou promover a perda de peso em um indivíduo que dele necessite; redução dos níveis circulantes de LDL e/ou aumento da razão HDL/LDL em um indivíduo que necessite; tratamento de uma condição causada ou caracterizada por excesso de peso corporal; ou prevenir ou tratar a obesidade, obesidade mórbida, obesidade mórbida antes da cirurgia, inflamação associada à obesidade, doença da vesícula biliar associada à obesidade, apneia do sono induzida pela obesidade, diabetes, síndrome metabólica, hipertensão, dislipidemia aterogênica, atherosclerose, arteriosclerose, doença cardíaca coronária, doença arterial periférica, acidente vascular cerebral ou doença microvascular, em que o composto faz parte de uma terapia de combinação juntamente com um agente para tratamento de diabetes, obesidade, dislipidemia ou hipertensão.

18. Composto, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o agente para tratamento de diabetes ser selecionado do grupo que consiste em uma biguanida, uma sulfonilureia, uma meglitinida ou glinida, um inibidor de DPP-IV, um inibidor de SGLT2, uma glitazona, um agonista de GLP-1 diferente, uma insulina e um análogo de insulina.

19. Composto, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o agente para tratamento da obesidade ser selecionado do grupo que consiste em um agonista do receptor 1 do peptídeo semelhante ao glucagon, um agonista do receptor peptídeo YY ou análogo do mesmo, um antagonista do receptor 1 canabinóide, um inibidor da lipase, um agonista do receptor 4 da melanocortina, um concentrador de melanina antagonista do receptor hormonal 1, fentermina, uma combinação de inibidor da recaptação de norepinefrina/dopamina e antagonista do receptor opióide, uma combinação de bupropiona e naltrexona e um agente serotoninérgico.

20. Composto, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o agente para tratamento da hipertensão ser selecionado do grupo que consiste em um inibidor da enzima conversora da angiotensina, um bloqueador do receptor da angiotensina II, um diurético, um beta-bloqueador ou um bloqueador dos canais de cálcio.

21. Composto, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o agente para o tratamento da displidemia ser selecionado do grupo que consiste em uma estatina, um fibrato, uma niacina e um inibidor da absorção do colesterol.