

(11) Número de Publicação: **PT 1863839 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/605 (2007.10) **A61K 38/26** (2007.10)
A61K 47/48 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.03.20	(73) Titular(es): NOVO NORDISK A/S CORPORATE PATENTS NOVO ALLÉ P.O. BOX 3000 DK-2880 BAGSVAERD DK
(30) Prioridade(s): 2005.03.18 EP 05102171	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.12.12	
(45) Data e BPI da concessão: 2010.08.04 217/2010	(72) Inventor(es): KJELD MADSEN DK THOMAS KRUSE HANSEN DK JESPER LAU DK FLORENCIO ZARAGOZA DÖRWALD DK HENRIK STEPHENSEN DK
	(74) Mandatário: MARIA MANUEL RAMOS LUCAS LARGO DE S. DOMINGOS N.º 1 2910-092 SETÚBAL PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS DE GLP-1 ACILADOS**

(57) Resumo:
COMPOSTOS GLP-1 DE ACÇÃO PROLONGADA E USOS TERAPÊUTICOS DOS MESMOS.

RESUMO

Compostos GLP-1 de acção prolongada e usos terapêuticos dos mesmos.

Descrição

Compostos de GLP-1 Acilados

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção relaciona-se com o campo de péptidos terapêuticos, isto é, para novos compostos de GLP-1 de acção prolongada.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma margem de abordagens diferentes tem sido usada para modificar a estrutura dos compostos de péptido do tipo glucagão 1 (GLP-1) para facultar uma duração de acção mais longa *in vivo*.

O documento WO 96/29342 descreve derivados de hormona peptídica caracterizado por a hormona de péptido de origem ter sido modificada ao introduzir um substituinte lipofílico no resíduo aminoácido C-terminal ou no resíduo aminoácido N-terminal.

O documento WO 98/08871 descreve derivados de GLP-1 caracterizados por pelo menos um resíduo aminoácido do péptido de origem ter um substituinte lipofílico anexado.

O documento WO 99/43708 descreve derivados de GLP-1 (7-35) e GLP-1 (7-36) que têm um substituinte lipofílico anexado ao resíduo aminoácido C-terminal.

O documento WO 00/34331 descreve análogos de GLP-1 acilados.

O documento WO 00/69911 descreve péptidos insulinoatrópicos activados para serem injectados em pacientes em que deverão supostamente reagir a componentes de sangue para formar conjugados e que desse modo fornecem alegadamente uma duração de acção mais longa *in vivo*.

O documento WO 02/46227 descreve análogos de GLP-1 e exendina-4 fundidos à albumina de soro humano para estender *in vivo* meia-vida.

Muitos pacientes de diabetes, particularmente do segmento da diabetes tipo 2, são sujeitos à denominada "fobia às agulhas", isto é, um medo substancial de se injectarem eles mesmos. No segmento da diabetes do tipo 2, a maioria dos pacientes são tratados com agentes hipoglicémicos orais, e visto que os compostos de GLP-1 são esperados para serem o primeiro produto injectável, estes pacientes serão administrados, o medo de injeções pode tornar-se num obstáculo sério para o uso difundido dos compostos de GLP-1 clinicamente muito prometedores. Assim, há uma necessidade para desenvolver novos compostos de GLP-1 que podem ser administrados menos do que uma vez por dia, por exemplo, uma vez cada segundo ou terceiro dia, de preferência uma vez por semana, enquanto tendo um perfil clínico aceitável.

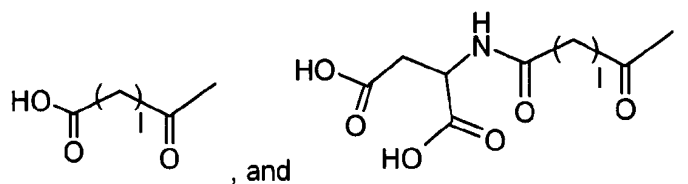
SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção provê um análogo de GLP-1 com uma modificação de pelo menos um resíduo aminoácido não-protogénico nas posições 7 e/ou 8 relativamente à sequência GLP-1 (7-37) (SEQ ID N° 1), que é acilado com uma parte B-U' como definido abaixo para o resíduo de lisina na posição 26, e em que a dita parte compreende pelo menos dois grupos acídicos, caracterizados por um grupo acídico ser terminalmente anexado.

A presente invenção também prevê composições farmacêuticas que compreendem um composto, de acordo com a presente invenção, e um excipiente farmacêuticamente aceitável, e o uso de compostos, de acordo com a presente invenção, para preparação de medicamentos para tratar doenças.

A invenção prevê um método para aumentar o tempo de acção num doente de um análogo de GLP-1 para mais de aproximadamente 40 horas, caracterizado por modificar pelo menos um dos resíduos de aminoácido nas posições 7 e 8 de um péptido ou um análogo de GLP-1 (7-37) do mesmo, e acilando o dito análogo de GLP-1 com uma parte B-U' como descrito abaixo no resíduo de lisina na posição 26 do dito análogo de GLP-1.

A parte B-U' compreende pelo menos dois grupos acídicos, um dos quais é anexo terminalmente; U' é seleccionado de



em que l é 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Na presente especificação, os seguintes termos têm o significado indicado:

O termo "polipéptido" e "péptido" como aqui utilizado representam um composto composto por pelo menos cinco aminoácidos constituintes ligados por ligações peptídicas. Os aminoácidos constituintes podem ser do grupo dos aminoácidos codificados pelo código genético e eles podem ser aminoácidos naturais que não são codificados pelo código genético, assim como aminoácidos sintéticos. Os aminoácidos naturais que não são codificados pelo código genético são por exemplo, γ -carboxiglutamato, L-ornitina, fosfoserina, D-alanina e D-glutamina. Os aminoácidos sintéticos compreendem aminoácidos desenvolvidos por síntese química, isto é, D-isómeros dos aminoácidos codificados pelo código genético, tais como D-alanina e D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico ácido), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (tert-butilglicina), β -alanina, ácido benzóico de 3-aminometil, ácido antranílico.

Os 22 aminoácidos proteogénicos são: Alanina, Arginina, Asparagina, Ácido Aspártico, Cisteína, Cistina, Glutamina, Ácido Glutâmico, Glicina, Histidina, Hidroxiprolina, Isoleucina,

Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Treonina, Triptofano, Tirosina, Valina.

Assim, um aminoácido não-protogénico é uma parte que pode ser incorporada num péptido mediante aglutinantes peptídicos mas não é um aminoácido protogénico. Os exemplos são γ -carboxiglutamato, L-ornitina, fosfoserina, os D-aminoácidos tais como D-alanina e D-glutamina, aminoácidos sintéticos não-protogénicos que compreendem aminoácidos desenvolvidos por síntese química, isto é, D-isómeros dos aminoácidos codificados pelo código genético, tais como D-alanina e D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (tert-butilglicina), ácido benzóico de 3-aminometil, ácido antranílico, des-amino-Histidina, os análogos beta dos aminoácidos, tais como β -alanina etc. D-histidina, desamino-histidina, histidina de 2-amino, β -hidróxi-histidina, homohistidina, N^α-acetilo-histidina, α -fluorometil-histidina, α -metilo-histidina, 3- piridilalanina, 2- piridilalanina ou 4-piridilalanina, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil);

O termo "análogo" como aqui utilizado que se refere a um polipéptido representa um péptido modificado caracterizado por um ou mais resíduos de aminoácidos do péptido terem sido substituídos por outros resíduos de aminoácidos e/ou caracterizados por um ou mais resíduos de aminoácidos terem sido eliminados do péptido e/ou caracterizados por um ou mais resíduos de aminoácidos terem sido eliminados do péptido e ou caracterizado por um ou mais resíduos de aminoácidos terem sido adicionados ao péptido. A dita adição ou supressão de resíduos de aminoácidos pode ocorrer no N-terminal do péptido e/ou no C-terminal do péptido. Um sistema simples é frequentemente usado

para descrever análogos: Por exemplo, [Arg³⁴] GLP-1 (7-37) Lis designa um análogo de GLP-1 (7-37) em que a lisina que ocorre naturalmente na posição 34 foi substituída com arginina e em que uma lisina foi adicionada ao resíduo de aminoácido terminal, isto é, ao Gly³⁷. Todos os aminoácidos para os quais o isómero óptico não é referido devem ser compreendidos para significar L-isómero. Em formas de realização da invenção, um máximo de 17 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 15 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 10 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 8 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 7 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 6 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 5 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 4 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 3 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, um máximo de 2 aminoácidos foram modificados. Em formas de realização da invenção, 1 aminoácido foi modificado.

O termo "derivado" como aqui usado em relação a um péptido, significa um péptido quimicamente modificado ou um análogo derivado do mesmo, em que pelo menos um substituinte não está presente no péptido não modificado ou um análogo derivado do mesmo, isto é, um péptido que foi modificado de forma covalente. As modificações típicas são amidas, hidratos de carbono, grupos alquilo, grupos de acilo, ésteres e similares. Um exemplo de um derivado de GLP-1 (7-37) é N^{ε26}-((4S)-4-(hexadecanoilamino)-carboxi-butanoil) [Arg³⁴, Lys²⁶]GLP-1-(7-37).

O termo "péptido de GLP-1" como aqui usado significa GLP-1 (7-37) (SEQ ID N° 1), um análogo de GLP-1 (7-37), um derivado de GLP-1 (7-37) ou um derivado de um análogo de GLP-1 (7-37). Numa forma de realização, o péptido de GLP-1 é um agente insulínotropico.

O termo "agente insulínotropico" como aqui usado significa um composto que é um agonista do receptor de GLP-1 humano, isto é, um composto que estimula a formação de cAMP num meio adequado contendo o receptor de GLP-1 humano (um dito meio descrito abaixo). A potência dum agente insulínotropico é determinada ao calcular o valor EC_{50} a partir da curva de dose-resposta como se descreve abaixo.

As células (BHK) de um rim de um hamster bebé que expressam o receptor de GLP-1 humano clonado (BHK-467-12A) cresceram num meio DMEM com a adição de 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 5% de soro fetal de bezerro e 0.5 mg/mL de Geneticin G-418 (Life Technologies). As células foram lavadas duas vezes em soro salino tamponado com fosfato e recolhidas com Versene. As membranas plasmáticas foram obtidas a partir das células por homogeneização com um Ultraturrax em solução tampão 1 (20 mM HEPES-Na, 10 mM EDTA, pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado a 48,000 X g durante 15 minutos a 4 °C. O granulado foi suspenso por homogeneização em solução tampão 2 (20 mM HEPES-Na, 0,1 mM EDTA, pH 7,4), depois centrifugado a 48,000 X g durante 15 minutos a 4 °C. O procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez. O granulado final foi suspenso em solução tampão 2 e usado imediatamente para ensaios ou armazenado a -80 °C.

O ensaio do receptor funcional foi efectuado ao medir AMP cíclico (cAMP) como uma resposta à estimulação pelo agente

insulinotrópico. O cAMP formado foi quantificado pelo Kit cAMP AlphaScreen™ (Perkin Elmer Life Sciences). As incubações foram realizadas placas de titulação semi-área 96, num volume total de 50 µL tampão 3 (50 mM Tris-HCl, 5 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, pH 7.4) e com as seguintes adições: 1 mM ATP, 1 µM GTP, 0.5 mM 3-isobutilo-1-metilxantina (IBMX), 0.01% Tween-20, 0.1% BSA, 6 µg de preparação de membrana, 15 µg/mL granulado aceitante, 20µg/mL granulados de dador pré-incubados com 6 nM biotinilo-cAMP. Os compostos a serem testados para actividade de agonista foram dissolvidos e diluídos em tampão 3. O GTP foi de novo preparado para cada experiência. A placa foi incubada no escuro com agitação lenta durante três horas à temperatura ambiente seguida da contagem no instrumento Fusions™ (Perkin Elmer Life Sciences). As curvas de resposta de concentração foram desenhadas para os compostos individuais e os valores EC₅₀ estimados usando um parâmetro de modelo logístico de quatro-parâmetros Prism v. 4.0 (GraphPad, Carlsbad, CA).

O termo "DPP-IV protegido" como aqui usado, referindo a um polipéptido significa um polipéptido que foi quimicamente modificado para tornar o dito composto resistente à aminopeptidase-4 dipeptidil peptidase plasma (DPP-IV). A enzima DPP-IV em plasma é conhecida por estar envolvida na degradação de diferentes hormonas peptídicas, por exemplo, GLP-1, GLP-2, Exendina-4 etc. Assim, um esforço considerável está a ser feito para desenvolver análogos e derivados dos polipéptidos susceptíveis à hidrólise mediada DPP-IV para reduzir o nível de degradação por parte de DPP-IV. Numa forma de realização, um péptido DPP-IV protegido é mais resistente a DPP-IV do que GLP-1(7-37) ou Exendina-4(1-39).

A resistência de um péptido à degradação por parte de dipeptidil aminopeptidase IV é determinada pelo seguinte ensaio de degradação:

Partes alíquotas do péptido (5 nmol) são incubadas em 37 °C com 1 µL de dipeptidil aminopeptidase IV purificada IV que corresponde a uma actividade enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos em 100 µL de 0.1 M de solução tampão trietilamina-HCl, pH 7.4. As reacções enzimáticas são terminadas pela adição de 5 µL de 10% de ácido trifluoracético, e os produtos de degradação peptídica são separados e quantificados usando a análise HPLC. Um método para executar esta análise é:

As misturas são aplicadas sobre uma coluna Vydac C18 poro largo (30 nm poros, 5 µm partículas) 250 X 4.6 mm e eluído a uma taxa de fluxo de 1 ml/min com gradientes lineares graduais de acetonitrilo em 0.1% de ácido trifluoracético (0% de acetonitrilo durante 3 minutos, 0-24% de acetonitrilo durante 17 minutos, 24-48% de acetonitrilo durante 1 minuto) de acordo com Siegel et al., Regul. Pept. 1999;79:93-102 e Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 1999;214:829-35. Os péptidos e os seus produtos de degradação podem ser controlados pela sua absorvência a 220 nm (aglutinantes peptídicos) ou 280 nm (aminoácidos aromáticos), e são quantificados por integração das suas áreas pico relacionadas com aqueles das normas. A taxa de hidrólise de um péptido por dipeptidil aminopeptidase IV é estimada na incubação, que resulta em menos que 10% do péptido a ser hidrolisado.

O termo "alquilo C₁₋₆" como aqui usado significa um grupo saturado, ramificado, direito ou de hidrocarbonetos cíclicos com 1 a 6 átomos de carbono. Os exemplos representativos incluem, mas não estão limitados a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, tert-pentilo, n-hexilo, isohexilo, ciclohexano e similares.

O termo "farmaceuticamente aceitável" como aqui usado significa que é adequado para aplicações farmacêuticas normais, isto é, dando azo a que não existam eventos adversos em pacientes etc.

O termo "excipiente" como aqui usado significa os compostos químicos que são normalmente adicionados às composições farmacêuticas, por exemplo, soluções tampão, agentes de tonicidade, conservantes e similares.

O termo "quantidade efectiva" como aqui usado significa uma dose que é suficiente para ser actuante para o tratamento do doente, comparado com nenhum tratamento.

O termo "composição farmacêutica" como aqui usado significa um produto que compreende um composto activo ou um sal derivado, em conjunto com excipientes farmacêuticos, tais como solução tampão, conservante, e opcionalmente um modificador de tonicidade e/ou um estabilizador. Assim, uma composição farmacêutica é também conhecida na técnica como uma fórmula farmacêutica.

O termo "tratamento de uma doença" como aqui usado significa a gestão e cuidado de um doente que desenvolveu a doença, condição ou distúrbio. O propósito de tratamento é combater a doença, condição ou distúrbio. O tratamento inclui a administração dos compostos activos para eliminar ou controlar a doença, condição ou distúrbio assim como para aliviar os sintomas ou complicações associadas à doença, condição ou distúrbio.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a um análogo de GLP-1 acilado que pode unir-se simultaneamente a albumina e o receptor de GLP-1.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a um análogo de GLP-1 acilado que se une ao receptor de GLP-1 com uma afinidade abaixo dos 100 nM, de preferência abaixo dos 30 nM na presença de 2% de albumina.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a um análogo de GLP-1 acilado cuja afinidade ao receptor de GLP-1 é apenas parcialmente diminuída quando comparando a afinidade na presença de concentração muito baixa (por exemplo, 0.005% para 0.2%) de albumina humana à afinidade na presença de 2% de albumina humana. O deslocamento na afinidade do ligante sob estas condições é inferior a 50 vezes, de preferência abaixo de 30 vezes e preferivelmente abaixo de 10 vezes.

O termo "parte aglutinante albumina" como aqui usado significa um resíduo que se une de forma não covalente à albumina de soro humano. O resíduo aglutinante de albumina anexo ao polipéptido terapêutico, normalmente tem uma afinidade abaixo de 10 μ M para albumina de soro humano e preferencialmente abaixo 1 de μ M. Vários resíduos aglutinantes de albumina são conhecidos entre partes lipofílicas lineares e ramificadas contendo 4-40 átomos de carbono com um grupo ácido distal.

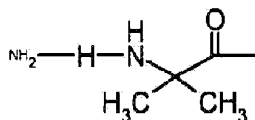
O termo "ligante hidrofílico" como aqui usado significa um separador que separa um péptido e um resíduo aglutinante de albumina com uma parte química que compreende pelo menos 5 átomos de não-hidrogénio, em que 30-50% destes são N ou O.

O termo "grupos acídicos" como aqui usado significa grupos químicos orgânicos que são completamente ou parcialmente carregados negativamente em pH fisiológico. O valor pKa de tais grupos está abaixo de 7, de preferência abaixo de 5. Este inclui, mas não é limitado a ácidos carboxílicos, ácidos sulfônicos, ácidos fosfóricos ou sistemas de anel heterocíclico que são completamente ou parcialmente carregados negativamente em pH fisiológico.

Na fórmula estrutural abaixo II, a parte U é um di-radical que pode ser anexo aos grupos terminal B e o grupo amino do aminoácido de lisina no péptido em duas formas diferentes. Em formas de realização da invenção, o U na fórmula II é anexa a um grupo B anexo na extremidade da cadeia de alquilo e o péptido na outra extremidade.

Nas fórmulas abaixo dos aglutinantes terminal dos grupos anexados devem ser considerados como aglutinantes de fixação e não de finalização nos grupos de metileno, excepto se referido.

Nas fórmulas abaixo



significa o H₂N-His-Aib- N-terminal do análogo de GLP-1 .

Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 acilado com uma parte aglutinante de albumina lipofílica contendo pelo menos dois grupos químicos acídicos

livres anexos mediante um ligante aminoácido não natural ao resíduo de lisina na posição 26.

Numa forma de realização, o termo grupos químicos acídicos livres deverá ser compreendido como tendo o mesmo significado que "grupos acídicos", como aqui usado.

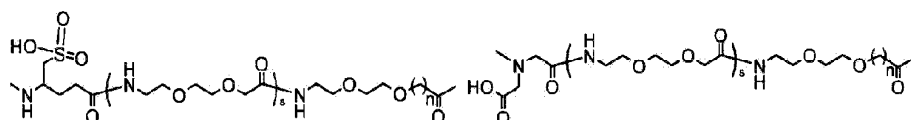
Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 acilado em que o dito análogo de GLP-1 é estabilizado contra DPP-IV por modificação de pelo menos um resíduo aminoácido nas posições 7 e 8 relativamente à sequência GLP-1 (7-37) (SEQ ID N° 1), e em que a dita acilação é um diácido anexo ao resíduo de lisina na posição 26, opcionalmente mediante um ligante hidrofílico aminoácido não natural.

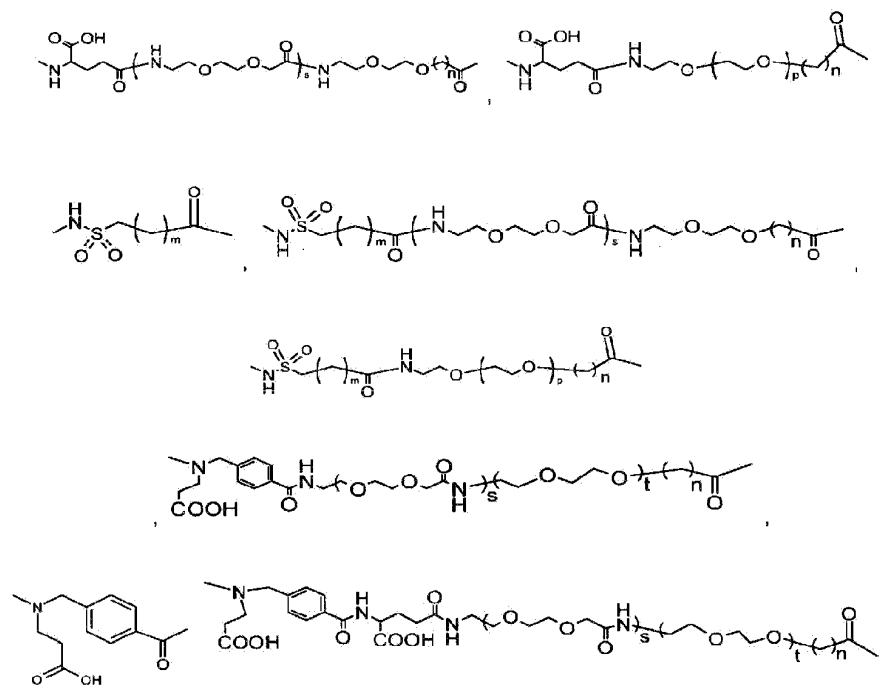
Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 com uma modificação de pelo menos um resíduo aminoácido não-protogénico nas posições 7 e/ou 8 relativamente à sequência GLP-1 (7-37) (SEQ ID N° 1), o qual é acilado com uma parte ao resíduo de lisina na posição 26, e em que a dita parte compreende pelo menos dois grupos acídicos, em que um grupo acídico é anexo terminalmente.

Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 de acordo com a forma de realização acima, em que a parte anexada na posição 26 compreende um ligante hidrófilo.

Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1, de acordo com as formas de realização acima, em que o ligante hidrofílico compreende pelo menos 5 átomos de não-hidrogénio onde 30-50% destes são N ou O.

Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 de acordo com a forma de realização acima, caracterizado por a parte aglutinante de albumina ser uma parte lipofílica linear ou ramificada contendo 4-40 átomos de carbono com um grupo ácido distal.

CC(=O)N
*NC(=O)CCC(=O)O



m é 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6,

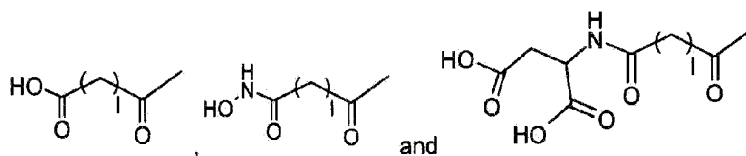
n é 1, 2 ou 3

s é 0, 1, 2, ou 3,

t é 0, 1, 2, 3, ou 4

p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ou 23;

e em que B é um grupo ácido seleccionado de



em que l é 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20.

Numa forma de realização, a presente invenção descreve um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, o qual é um composto da fórmula I (SEQ ID N°2):



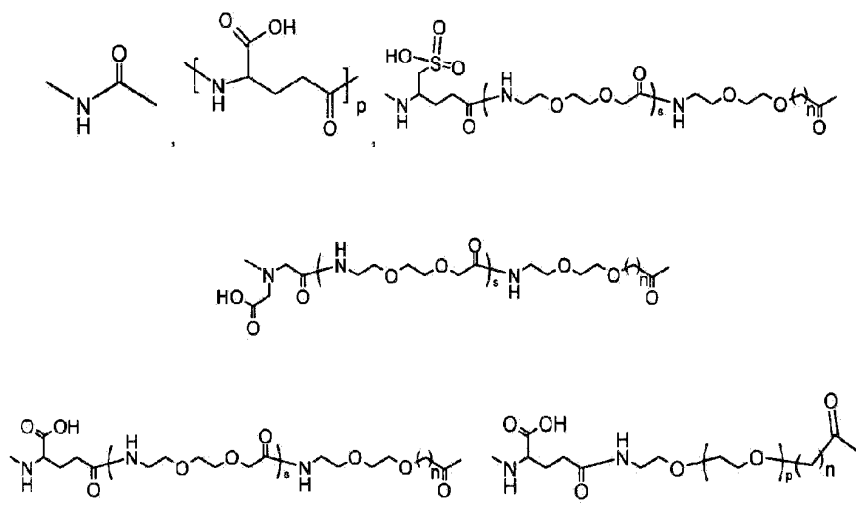
Xaa₃₄ é Lys, Glu, Asn ou Arg;

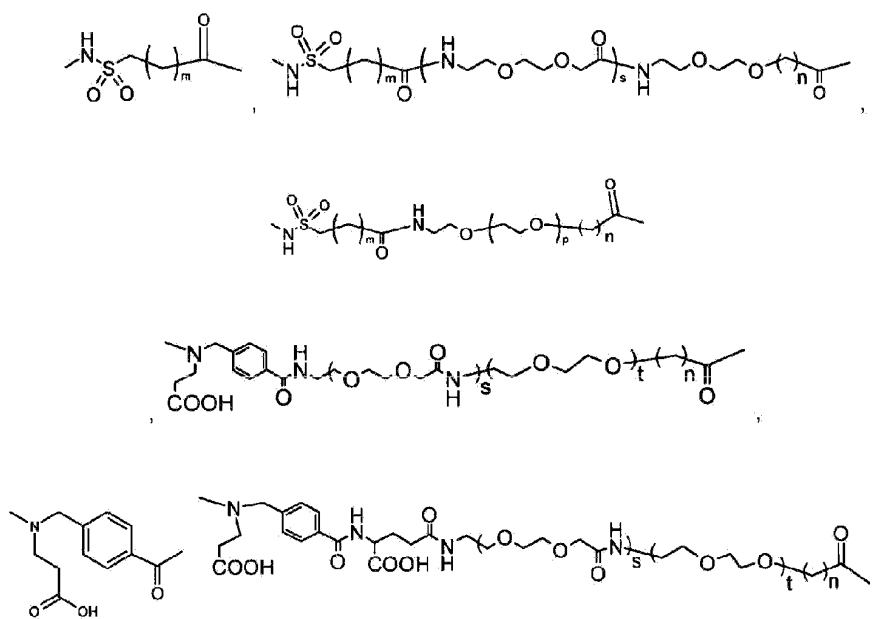
Xaa₃₅ é Gly ou Aib;

Xaa₃₆ é Arg, Gly ou Lys, ou é ausente;

Xaa₃₇ é Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, ou é ausente;

e B e U' juntos são a parte acilada, em que U' é seleccionado de





m é 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6,

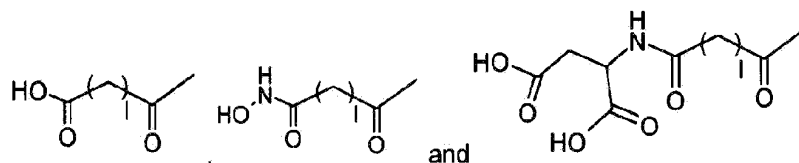
n é 1, 2 ou 3

s é 0, 1, 2, ou 3,

t é 0, 1, 2, 3, ou 4

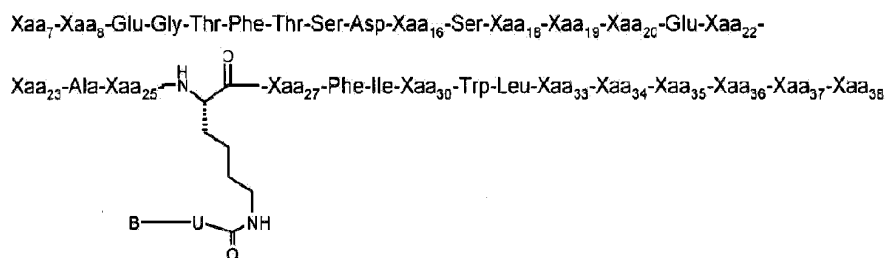
p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ou 23;

e em que B é um grupo ácido seleccionado de



em que l é 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20;

Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um composto que é um composto da fórmula II (SEQ ID N°. 3):



Formula II

A fórmula II é idêntica à fórmula I como referido numa forma de realização acima, em que a parte B-U é substituída por B-U'. A diferença sendo apenas a incorporação do grupo de carboxi no U' relativamente ao U, que é sem o grupo carboxi.

Na fórmula II, cada um dos Xaa tem o seguinte significado:

Xaa₇ é L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidróxi-histidina, homohistidina, N^α-acetilohistidina, α-fluorometilo-histidina, α-metilo-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina ou 4-piridilalanina;

Xaa₈ é Ala, Gli, Val, Leu, Ile, Lis, Aib, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil);

Xaa₁₆ é Val ou Leu;

Xaa₁₈ é Ser, Lys ou Arg;

Xaa₁₉ é Tyr ou Gln;

Xaa₂₀ é Leu ou Met;

Xaa₂₂ é Gly, Glu ou Aib;

Xaa₂₃ é Gln, Glu, Lys ou Arg;

Xaa₂₅ é Ala ou Val;

Xaa₂₇ é Glu ou Leu;

Xaa₃₀ é Ala, Glu ou Arg;

Xaa₃₃ é Val ou Lys;

Xaa₃₄ é Lys, Glu, Asn ou Arg;

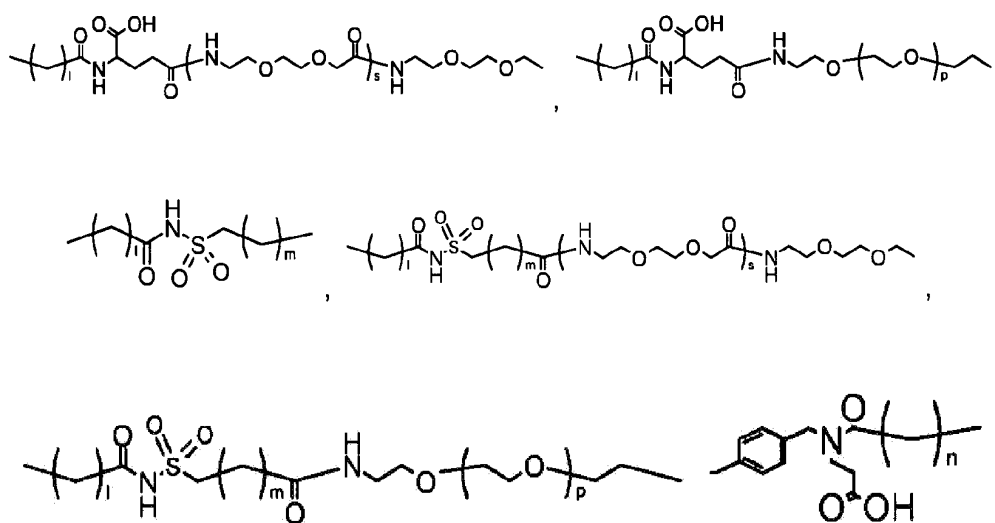
Xaa₃₅ é Gly ou Aib;

Xaa₃₆ é Arg, Gly ou Lys, ou é ausente;

Xaa₃₇ é Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, ou é ausente;

Xaa₃₈ é Lys, Ser, amida ou é ausente;

e em que U é um separador seleccionado de



em que n é 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18

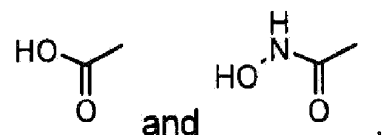
l é 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18,

m é 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6,

s é 0, 1, 2, ou 3,

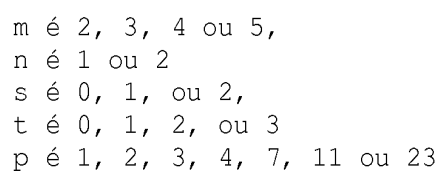
p é 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ou 23;

e em que B é um grupo acídico seleccionado de

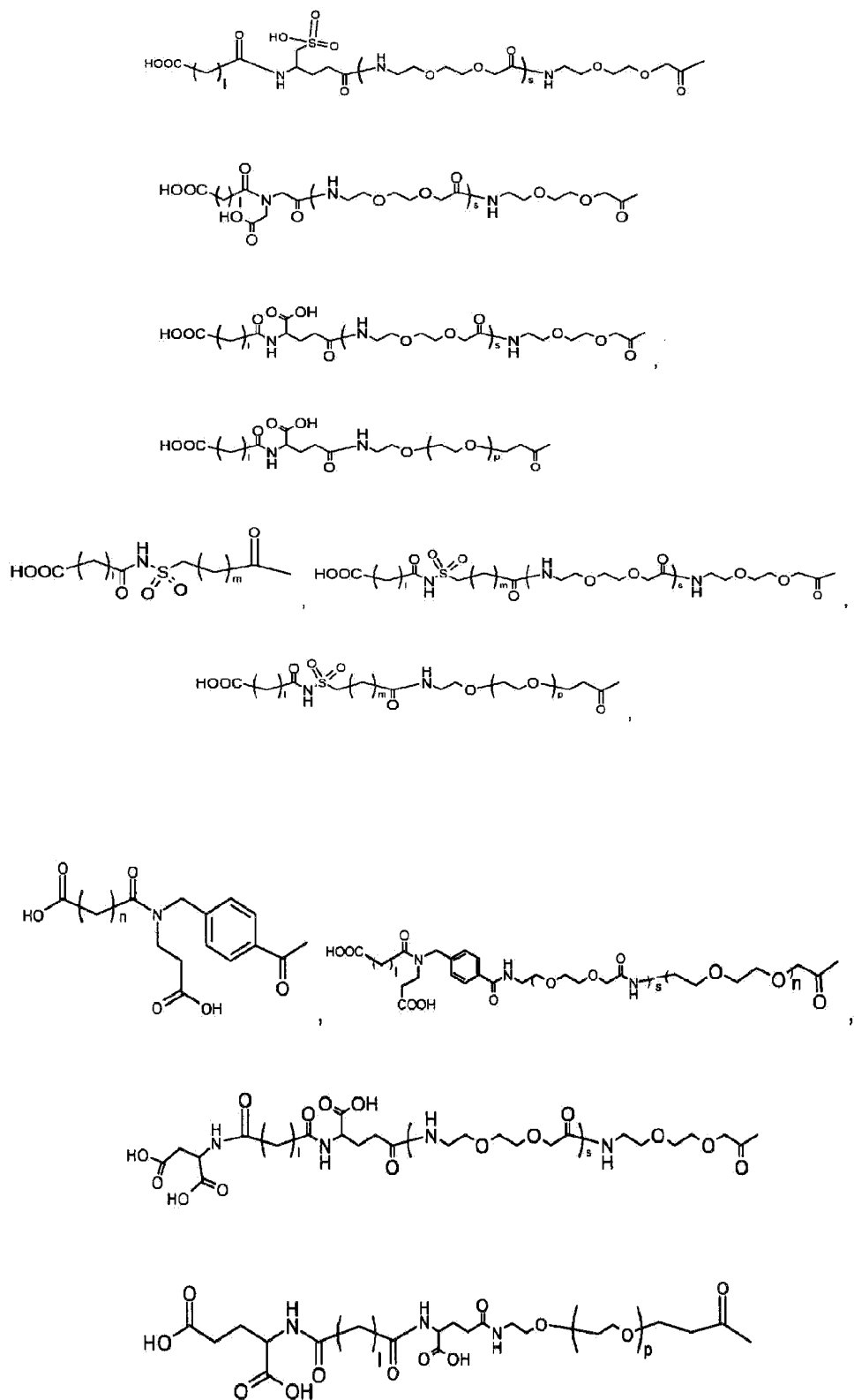


Nas formas de realização abaixo, quando se refere a U' na fórmula I, deverá ser compreendido como também se referindo à fórmula II e U, com a única diferença de ser o grupo carboxi.

Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 de acordo com as formas de realização acima, em que U' é seleccionado de



Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 de acordo com as formas de realização acima, em que B-U' - é

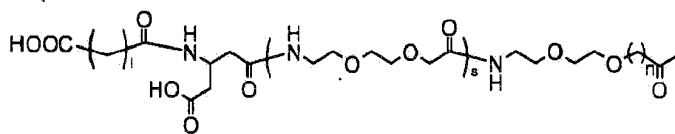
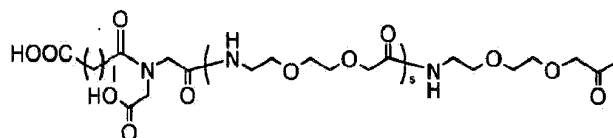
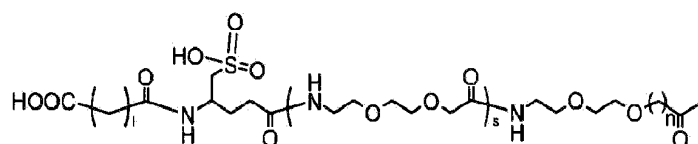


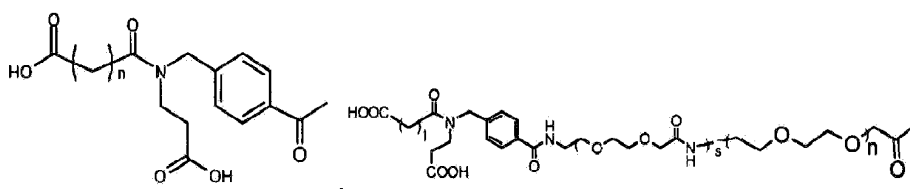
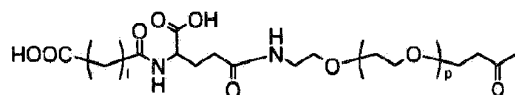
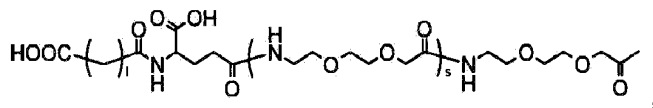
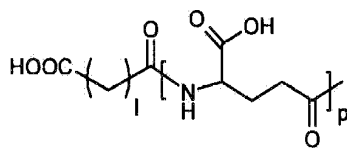
em que l é 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20;
 p é 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12.
 s é 0, 1 ou 2
 t é 0 ou 1;

Uma forma de realização, de acordo com o acima mencionado, é descrita em que

l é 14, 15, 16, 17 ou 18
 p é 1, 2, 3, 4 ou 11;
 s é 0, 1 ou 2;
 t é 0 ou 1;

Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 de acordo com a forma de realização acima, em que B-U' é





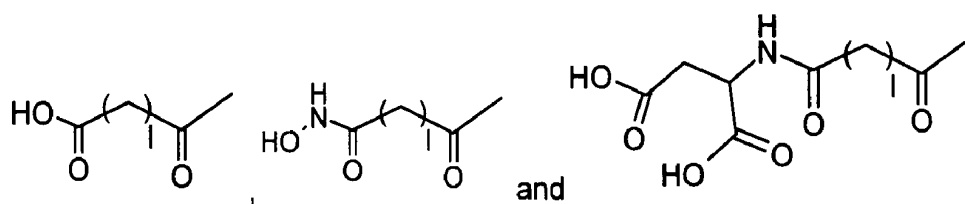
em que l é 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20;

p é 1, 2, 3, ou 4.

s é 0, 1 ou 2

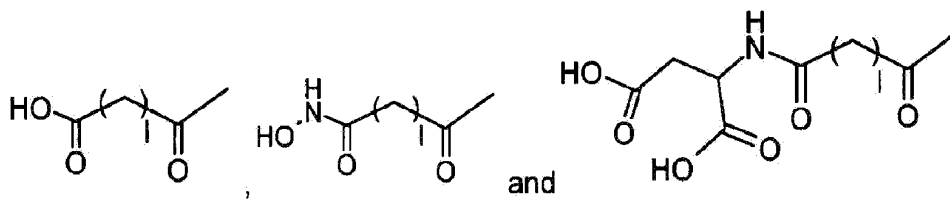
n é 0, 1 ou 2

Uma forma de realização, de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, é também aqui descrita em que B é



e l é 14, 16, 18 ou 20.

Numa forma de realização, a presente aplicação descreve um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que B é



em que l é 14, 15, ou 16.

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que s é 1.

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que n é 1.

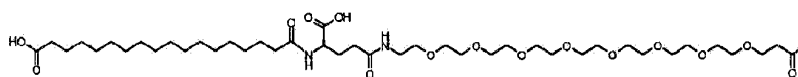
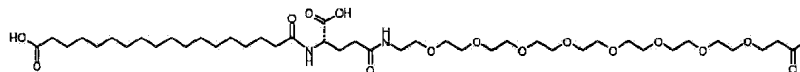
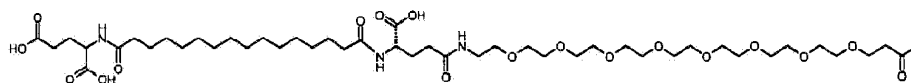
Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que l é 14, 15 ou 16;

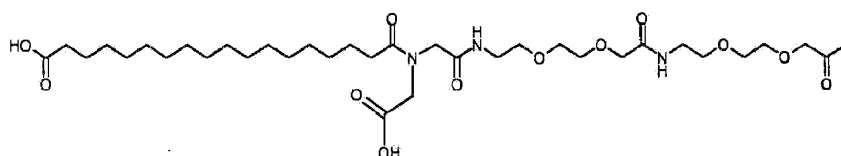
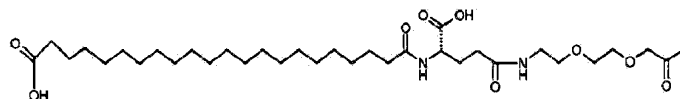
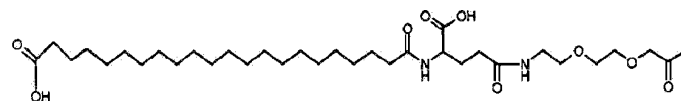
Nas formas de realização l é 17, 18, 19 ou 20. Nas formas de realização l é 15, 16 ou 17. Nas formas de realização l é 18, 19 ou 20. Nas formas de realização l é 14. Nas formas de realização l é 16. Nas formas de realização l é 18. Nas formas de realização l é 20.

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que p é 1.

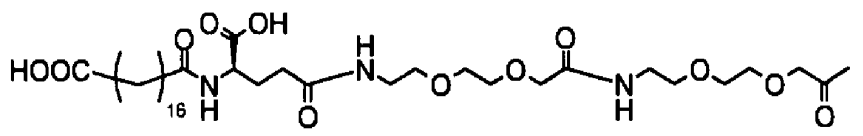
Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que p é 2.

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que p é 4.

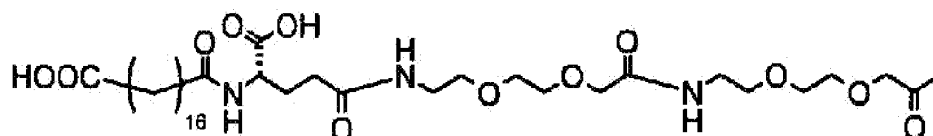
[illegible]



Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que B-U' é



Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que B-U' é



Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com a fórmula I acima, em que

Xaa₇ é His ou desamino-histidina;

Xaa₈ é Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys ou Aib;

Xaa₁₆ é Val;

Xaa₁₈ é Ser;
Xaa₁₉ é Tyr;
Xaa₂₀ é Leu;
Xaa₂₂ é Gly, Glu ou Aib;
Xaa₂₃ é Gln ou Glu;
Xaa₂₅ é Ala;
Xaa₂₇ é Glu;
Xaa₃₀ é Ala ou Glu;
Xaa₃₃ é Val;
Xaa₃₄ é Lys ou Arg;
Xaa₃₅ é Gly ou Aib;
Xaa₃₆ é Arg ou Lys
Xaa₃₇ é Gly, amida ou é ausente;

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com a fórmula I acima, em que:

Xaa₇ é His
Xaa₈ é Gly, ou Aib;
Xaa₁₆ é Val;
Xaa₁₈ é Ser;
Xaa₁₉ é Tyr;
Xaa₂₀ é Leu;
Xaa₂₂ é Glu ou Aib;
Xaa₂₃ é Gln;

Xaa₂₅ é Ala;

Xaa₂₇ é Glu;

Xaa₃₀ é Ala;

Xaa₃₃ é Val;

Xaa₃₄ é Lys ou Arg;

Xaa₃₅ é Gly ou Aib;

Xaa₃₆ é Arg

Xaa₃₇ é Gly

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, onde o dito análogo de GLP-1 compreende uma modificação do N-terminal L-histidina na posição 7 da sequência GLP-1 (7-37).

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com a forma de realização acima, onde o dito análogo de GLP-1 compreende imidazopropionil⁷, α -hidroxi-histidina⁷ ou N-metil-histidina⁷, D-histidina⁷, desamino-histidina⁷, 2-amino-histidina⁷, β -hidroxi-histidina⁷, homohistidina⁷, N ^{α} -acetil-histidina⁷, α -fluorometil-histidina⁷, α -metil-histidina⁷, 3-piridilalanina⁷, 2-piridilalanina⁷ ou 4-piridilalanina.

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, onde o dito análogo de GLP-1 compreende uma substituição do L-alanina na posição 8 da sequência GLP-1 (7-37) para outro resíduo aminoácido.

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com a forma de realização acima, onde o dito análogo de GLP-1 compreende Aib⁸, Gly⁸, Val⁸, Ile⁸, Leu⁸, Ser⁸, Thr⁸, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil).

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, onde o dito análogo de GLP-1 compreende Aib⁸.

Numa forma de realização da invenção, o dito análogo de GLP-1 é Aib⁸, Arg³⁴-GLP-1(7-37) ou Aib^{8,22} Arg³⁴-GLP-1(7-37).

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer das formas de realização sobre, onde dito análogo de GLP-1 compreende nada mais que resíduos de aminoácidos de quinze que foram alterados, adicionados ou cancelados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1),

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com a forma de realização acima, caracterizada em que não mais que dez resíduos de aminoácidos tenham sido alterados, adicionados ou cancelados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com a forma de realização acima, em que o dito análogo de GLP-1 compreende não mais que seis resíduos de aminoácidos que tenham sido alterados, adicionados ou cancelados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que o dito análogo de GLP-1 compreende não mais que 3 resíduos de aminoácidos que tenham sido codificados pelo código genético.

Uma forma de realização prevê um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, em que o dito análogo de GLP-1 compreende apenas um resíduo de lisina.

Uma forma de realização é descrita de um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, que é Aib⁸, Arg³⁴-GLP-1 (7-37), Aib^{8,22}Arg³⁴-GLP-1 (7-37), Arg³⁴-GLP-1 (7-37).

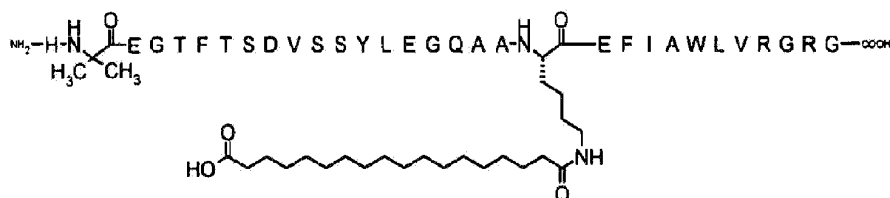
[3-(4-Imidazolil)Propionil¹⁷, Arg³⁴]GLP-1-(7-37) péptido

Gli⁸,Arg³⁴-GLP-1 (7-37)

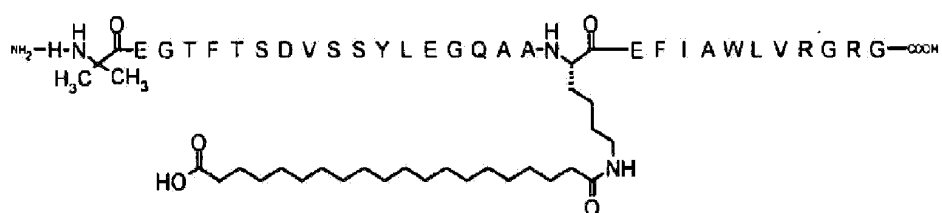
Aib⁸, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1 (7-37)

Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1 (7-37) amida, todos são substituídos por B-U' na posição 26.

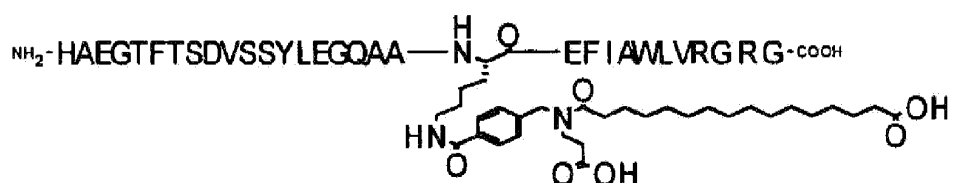
Uma forma de realização é descrita de um análogo de GLP-1 de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, que é seleccionado de



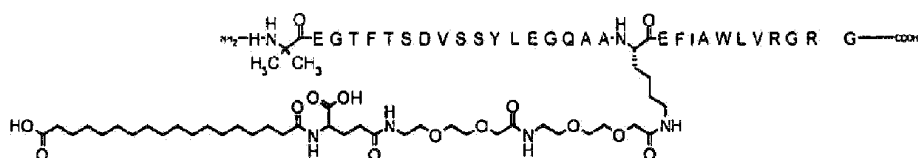
N-ε²⁶-(17-carboxiheptadecanoil)-[Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido,



N-ε²⁶-(19-carboxinonadecanoil)-[AibB, Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido,



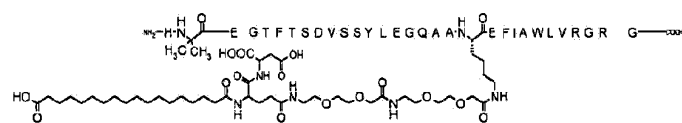
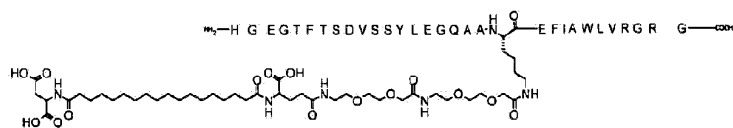
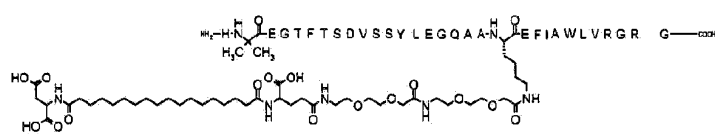
N-ε²⁶-(4-{[N-(2-carboxietil)-N-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil}benzoil)[Arg34]GLP-1-(7-37),



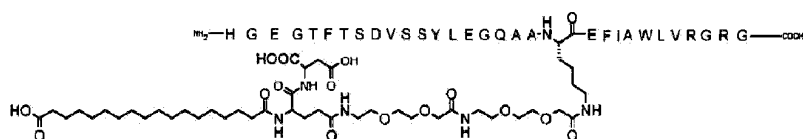
N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi]acetil)[Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)péptido,







e



Uma forma de realização é descrita na presente aplicação de um método para aumentar o tempo de acção num doente de um análogo de GLP-1, caracterizado por acilar o dito análogo de GLP-1 com uma parte B-U como descrita em qualquer uma das formas de realização precedentes, no resíduo de lisina na posição 26 do dito análogo de GLP-1.

Uma forma de realização prevê um método para aumentar o tempo de acção num doente de um análogo de GLP-1 para mais de 40 horas, caracterizada por modificar pelo menos um dos resíduos de aminoácidos na posição 7 e 8 de um péptido GLP-1 (7-37) ou um análogo do mesmo, e acilar o dito análogo de GLP-1 com uma parte B-U' - como descrita em qualquer uma das formas de realização

precedentes no resíduo de lisina na posição 26 do dito análogo de GLP-1.

Uma forma de realização prevê uma composição farmacêutica que compreende um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Uma forma de realização prevê uma composição farmacêutica de acordo com a forma de realização acima, que é adequada para administração parenteral.

Uma forma de realização prevê o uso de um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização acima para a preparação de um medicamento.

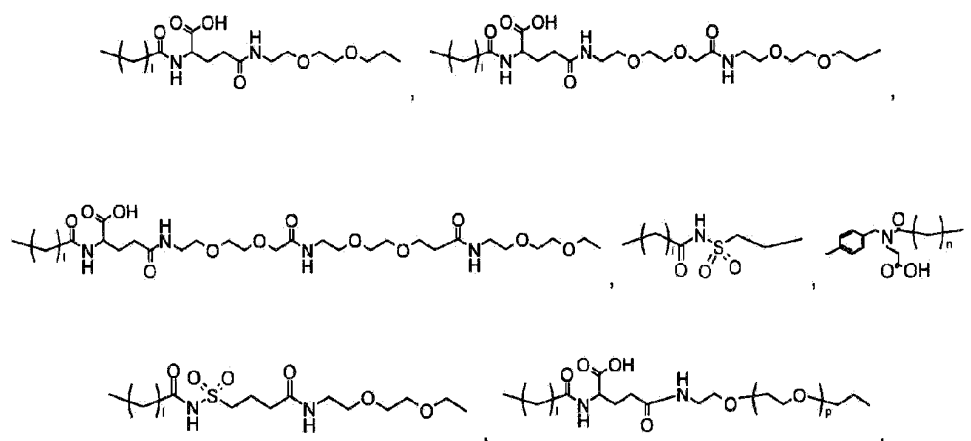
Uma forma de realização provê o uso de um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização acima para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância diminuída à glicose, diabetes tipo 1, obesidade, hipertensão, síndrome X, dislipidemia, distúrbios cognitivos, aterosclerose, enfarte do miocárdio, cardiopatía coronária e outros distúrbios cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome do intestino irritável, dispepsia e úlceras gástricas.

Uma forma de realização prevê o uso de um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização acima para a preparação de um medicamento para atrasar ou evitar o progresso da doença na diabetes tipo 2.

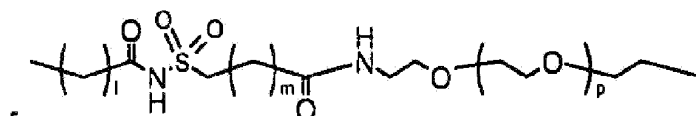
Uma forma de realização provê o uso de um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização acima para a preparação de um medicamento para diminuir a ingestão de alimentos, diminuir apoptose β -célula, aumentar a função e massa da β -célula, e/ou para restaurar a sensibilidade da glucose às β -células.

Numa forma de realização, a invenção provê um composto de acordo com as formas de realização acima, onde o dito análogo de GLP-1 é Aib⁸, Arg³⁴-GLP-1(7-37) ou Aib^{8,22}, Arg³⁴-GLP-1(7-37) fixado a um ligante B-U';

Numa forma de realização da Fórmula II que é descrita na aplicação presente, B-U representa



Ou



em que l é 14, 15 ou 16;
n é 15, 16, 17 ou 18;
p é 3, 7, 11 ou 24.

Nas formas de realização, a invenção provê um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, onde o dito diácido compreende um ácido dicarboxílico.

Nas formas de realização, a invenção prevê um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização acima, caracterizado por o grupo de acilação compreender um ácido α,ω -dicarboxílico alcano de cadeia linear ou ramificada.

Nas formas de realização, a invenção provê um composto de acordo com a forma de realização acima, caracterizado por o grupo de acilação compreender a estrutura $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, em que n é 12 a 20.

Nas formas de realização, a invenção provê um composto de acordo com a forma de realização acima, caracterizado por o grupo de acilação compreender uma estrutura seleccionada de $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{17}\text{CO}-$, e $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$.

Nas formas de realização, a invenção prevê um composto de acordo com a forma de realização acima, caracterizado por o grupo de acilação compreender a estrutura $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$.

Outro objecto da presente invenção é prover uma fórmula farmacêutica que compreenda um composto, de acordo com a presente invenção, que está presente numa concentração de 0.1 mg/ml a 25 mg/ml, e onde a dita formulação tem um pH de 3.0 a 9.0. A formulação pode adicionalmente compreender um sistema de solução tampão, conservante(s), agente(s) de tonicidade, agente(s) quelante(s), estabilizadores e agentes tensioactivos.

Numa forma de realização da invenção, a fórmula farmacêutica é uma formulação aquosa, isto é, formulação que compreende água. A dita formulação é habitualmente uma solução ou uma suspensão. Numa forma de realização adicional da invenção, a fórmula farmacêutica é uma solução aquosa. O termo "formulação aquosa" é definido como uma formulação que compreende pelo menos 50 % em peso água. De igual modo, o termo "solução aquosa" é definido como uma solução que compreende pelo menos 50 % em peso água, e o termo "suspensão aquosa" é definido como uma suspensão que compreende pelo menos 50 % em peso água.

Noutra forma de realização, a fórmula farmacêutica é uma formulação liofilizada, a que o médico ou o doente adiciona dissolventes e/ou diluentes antes de usar.

Noutra forma de realização, a fórmula farmacêutica é uma formulação seca (por exemplo, liofilizada ou de pulverização seca) pronta para utilização sem qualquer dissolução prévia.

Num aspecto adicional, a invenção refere-se a uma fórmula farmacêutica que compreende uma solução aquosa de um composto, de acordo com a presente invenção, e uma solução tampão, em que o dito composto está presente numa concentração de 0.1 mg/ml ou acima, e em que a dita formulação tem um pH de aproximadamente 3.0 a 9.0.

Noutra forma de realização da invenção, o pH da formulação é de aproximadamente 7.0 a 9.5. Noutra forma de realização da invenção, o pH da formulação é de aproximadamente 3.0 a 7.0. Noutra forma de realização da invenção, o pH da formulação é de aproximadamente 5.0 a 7.5. Noutra forma de realização da invenção, o pH da formulação é de aproximadamente 7.5 a 9.0.

Noutra forma de realização da invenção, o pH da formulação é de aproximadamente 7.5 a 8.5. Noutra forma de realização da invenção, o pH da formulação é de aproximadamente 6.0 a 7.5. Noutra forma de realização da invenção, o pH da formulação é de aproximadamente 6.0 a 7.0. Noutra forma de realização, a fórmula farmacêutica é de 8.0 a 8.5.

Numa forma de realização adicional da invenção, a solução tampão é seleccionada do grupo que se compõe de acetato sódico, carbonato sódico, citrato, glicil-glicina, histidina, glicina, lisina, arginina, sódio dihidrogénio fosfato, fosfato de hidrogénio dissódio, fosfato sódico, e tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maléico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico ou misturas derivadas. Cada uma destas soluções tampão específicas constitui uma forma de realização alternativa da invenção.

Numa forma de realização adicional da invenção a formulação adicional compreende um conservante farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização adicional da invenção o conservante é seleccionado do grupo que consiste em fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metilo p-hidroxibenzoato, propilo p-hidroxibenzoato, 2 de 2, butilo p-hidroxibenzoato, 2 de 2, álcool benzílico, clorobutanol, e timerosal, bronopol, ácido benzóico, imidurea, clorohexidina, sódio dehidroacetato, clorocresol, etilo p-hidroxibenzoato, cloreto de benzetónio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) ou misturas derivadas. Numa forma de realização o conservante é fenol ou m-cresol. Numa forma de realização adicional da invenção o conservante está presente numa concentração de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml. Numa forma de realização adicional da invenção o conservante está presente numa concentração de 0.1 mg/ml a 5 mg/ml. Numa forma de realização adicional da invenção o conservante está presente numa concentração de 5 mg/ml a 10 mg/ml. Numa forma de

realização adicional da invenção o conservante está presente numa concentração de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada um destes conservantes específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção. O uso de um conservante em composições farmacêuticas é bem conhecido do técnico especializado. Para comodidade se faz referência a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edição, 1995.

Numa forma de realização adicional da invenção a formulação adicional compreende um agente isotónico. Numa forma de realização adicional da invenção o agente isotónico é seleccionado do grupo composto por um sal (por exemplo, cloreto de sódio), um açúcar ou álcool de açúcar, um aminoácido (por exemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptofano, treonina), um alditol (por exemplo, (glicerina) de glicerina, propandiol de 2-propanediol (propileneglicol), propandiol de 3-propanediol, butanodiol de 3-butanediol) polietilenoglicol (por exemplo, PEG400), ou misturas derivadas. Numa forma de realização, o agente de isotonicidade é propileneglicol. Qualquer açúcar, tais como mono-, di-, ou polissacáridos, ou glucanos hidrossolúveis, incluindo por exemplo frutose, glucose, manose, sorbose, xilose, maltose, lactose, sacarose, trealose, dextrana, pululano, dextrina, ciclodextrina, amido solúvel, amido de hidroxietilo e carboximetilcelulose-Na podem ser usados. Numa forma de realização, o aditivo de açúcar é sacarose. O álcool de açúcar é definido como um hidrocarboneto C4-C8 com pelo menos um grupo -OH e inclui, por exemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, e arabitól. Numa forma de realização, o aditivo poliálcool é manitol. Os açúcares ou poliálcoois anteriormente mencionados podem ser usados individual ou em combinação. Não há nenhum limite fixo à quantidade usada, visto que açúcar ou poliálcool é solúvel na preparação líquida e não afecta adversamente os efeitos estabilizantes conseguidos usando os métodos da invenção. Numa

forma de realização, a concentração de açúcar ou poliálcool está entre aproximadamente 1 mg/ml e 150 mg/ml. Numa forma de realização adicional da invenção, o agente isotónico está presente numa concentração de 1 mg/ml a 50 mg/ml. Numa forma de realização adicional da invenção, o agente isotónico está presente numa concentração de 1 mg/ml a 7 mg/ml. Numa forma de realização da invenção, o agente isotónico está presente numa concentração de 5 mg/ml a 7 mg/ml. Numa forma de realização adicional da invenção, o agente isotónico está presente numa concentração de 8 mg/ml a 24 mg/ml. Numa forma de realização adicional da invenção, o agente isotónico está presente numa concentração de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada um destes agentes específicos isotónicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção. O uso de um agente isotónico em composições farmacêuticas é bem conhecido do técnico especializado. Para comodidade, faz-se referência a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19^a edição, 1995.

Numa forma de realização adicional da invenção, a formulação adicional compreende um agente quelante. Numa forma de realização adicional da invenção o agente quelante é seleccionado de sais de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido cítrico, e ácido aspártico, e suas misturas derivadas. Numa forma de realização adicional da invenção, o agente quelante está presente numa concentração de 0.1 mg/ml a 5 mg/ml. Numa forma de realização adicional da invenção, o agente quelante está presente numa concentração de 0.1 mg/ml a 2 mg/ml. Numa forma de realização adicional da invenção, o agente quelante está presente numa concentração de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada um de estes agentes quelantes específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção. O uso de um agente quelante em composições farmacêuticas é bem conhecido do técnico especializado. Para comodidade, faz-se referência a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19^a edição, 1995.

Numa forma de realização adicional da invenção, a formulação adicional compreende um estabilizador. O uso de um estabilizador em composições farmacêuticas é bem conhecido do técnico especializado. Para comodidade, faz-se referência a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19^a edição, 1995.

Mais detalhadamente, as composições da invenção são composições farmacêuticas de líquido estabilizado cujos componentes terapeuticamente activos incluem um polipéptido que possivelmente exhibe formação de agregado durante o armazenamento em formulações farmacêuticas líquidas. Por "formação de agregado" está destinada uma interacção física entre as moléculas de polipéptido que resulta na formação de oligómeros, que podem ficar solúveis, ou agregados grandes visíveis que precipitado da solução. Por "durante armazenamento" entende-se uma composição farmacêutica líquida ou formulação uma vez preparada, não é imediatamente administrado a um sujeito. Em vez disso, a preparação seguinte, é empacotada para armazenamento, em forma de um líquido, em num estado gelado, ou numa forma seca para uma reconstituição posterior ou outra forma adequada para administração a um sujeito. Por "forma seca" entende-se a composição farmacêutica líquida ou formulação, sendo seca por qualquer por secagem por congelação (quer dizer, liofilização; ver, por exemplo, Williams and Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), atomização (ver Masters (1991) em *Spray-Drying Handbook* (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), págs. 491-676; Broadhead et al. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; e Mumenthaler et al. (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20), ou secagem a ar (Carpenter and Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; and Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). Formação de agregado por um polipéptido durante armazenamento de uma composição farmacêutica líquida pode adversamente afectar a actividade biológica daquele polipéptido, resultando na perda de eficácia terapêutica da composição farmacêutica. Além disso, a formação de agregado pode causar outros problemas tais como

bloqueio de tubulação, membranas, ou bombas quando a composição farmacêutica que contém o polipéptido é administrada usando um sistema de infusão.

As composições farmacêuticas da invenção podem adicionalmente compreender uma quantidade de uma base de aminoácido suficiente para diminuir a formação do agregado pelo polipéptido durante o armazenamento da composição. Por "base aminoácida" entende-se um aminoácido ou uma combinação de aminoácidos, em que qualquer aminoácido dado está presente na sua base livre ou na sua forma de sal. Onde é usada uma combinação de aminoácidos, todos os aminoácidos podem estar presentes nas suas formas de base livres, todos podem estar presentes nas suas formas de sal, ou alguns podem estar presentes nas suas formas de base livre enquanto outros estão presentes nas suas formas de sal. Numa forma de realização, os aminoácidos para usar na preparação das composições da invenção são aqueles que transportam uma cadeia lateral carregada, tais como arginina, lisina, ácido aspártico, e ácido glutâmico. Qualquer estereoisômero (quer dizer, L, D, ou uma mistura do mesmo) de um aminoácido específico (por exemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptofano, treonina e suas misturas derivadas) ou combinações destes estereoisômeros, podem estar presentes nas composições farmacêuticas da invenção desde que o aminoácido específico esteja presente na sua forma de base livre ou na sua forma de sal. Numa forma de realização, o L-estereoisômero é usado. As composições da invenção podem também ser formuladas com análogos destes aminoácidos. Por "análogo aminoácido" entende-se um derivado do aminoácido de origem natural que traz aproximadamente o efeito desejado de diminuir a formação de agregado pelo polipéptido durante o armazenamento das composições farmacêuticas líquidas da invenção. Os análogos de arginina adequados incluem, por exemplo, aminoguanidina, poli-ornitina e N-monoetilico L-arginina, análogos de metionina adequados incluem etionina e butionina e análogos de cisteína adequados incluem S-metil-L cisteína. Como com os outros aminoácidos, os análogos de aminoácido são incorporados nas

composições na sua forma de base livre ou na sua forma de sal. Numa forma de realização adicional da invenção, os aminoácidos ou análogos de aminoácido são usados numa concentração, que é suficiente para evitar ou atrasar a agregação da proteína.

Numa forma de realização adicional da invenção, a metionina (ou outros aminoácidos sulfúricos ou análogos aminoácidos) pode ser adicionada para inibir a oxidação de resíduos de metionina para sulfóxido de metionina quando o polipéptido age como o agente terapêutico é um polipéptido que compreende pelo menos um resíduo de metionina susceptível para a dita oxidação. Por "inibir" entende-se a acumulação mínima de espécies oxidadas de metionina sobre tempo. Inibir a metionina oxidante resulta na retenção superior do polipéptido na sua forma molecular adequada. Pode ser usado qualquer estereoisómero de metionina (L ou D) ou combinações do mesmo. A quantidade a ser adicionada deverá ser uma quantidade suficiente para inibir a oxidação dos resíduos de metionina de maneira que a quantidade de sulfóxido de metionina é aceitável para agências reguladoras. Habitualmente, isto significa que a composição contém nada mais que aproximadamente 10% a cerca de 30% de sulfóxido de metionina. Geralmente, isto pode ser conseguido por adição de metionina de maneira que o rácio da metionina adicionada para resíduos de metionina varia de aproximadamente 1:1 para aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 1 para aproximadamente 100:1.

Numa forma de realização adicional da invenção a formulação adicional compreende um estabilizador seleccionado do grupo de polímeros de peso molecular elevado ou compostos moleculares baixos. Numa forma de realização adicional da invenção o estabilizador é seleccionado de polietilenoglicol (por exemplo, PEG 3350), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi /hidroxi celulose ou derivados do mesmo (por exemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L e HPMC), ciclodextrinas, substâncias com enxofre como monotioglicerol, ácido tioglicólico e 2-

metiltioetanol, e sais diferentes (por exemplo, cloreto de sódio). Cada um destes estabilizadores específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção.

As composições farmacêuticas podem também compreender agentes estabilizantes adicionais, que adicionalmente enriquecem estabilidade de um polipéptido terapeuticamente activo. Os agentes estabilizantes de interesse específico à presente invenção incluem, mas não estão limitados a, metionina e EDTA, que protegem o polipéptido contra a oxidação de metionina, e um agente tensioactivo não iónico, que protege o polipéptido contra a agregação associada com a descongelação ou deslizamento mecânico.

Numa forma de realização adicional da invenção a formulação adicional compreende um agente tensioactivo. Noutra forma de realização da invenção, a composição farmacêutica compreende dois agentes tensioactivos diferentes. O termo "Agente tensioactivo" como aqui usado refere-se a quaisquer moléculas ou iões que são compostos por uma parte hidrossolúvel (hidrofílica), a cabeça, e um segmento lipossolúvel (lipofílico). Os agentes tensioactivos acumulam preferencialmente em interfaces, cuja parte hidrofílica é orientada em direcção à água (fase hidrofílica) e a parte lipofílica em direcção à fase de óleo ou hidrofóbica (isto é, vidro, ar, óleo etc.). A concentração, em que os agentes tensioactivos começam a formar micelas, é conhecida como a concentração de micela fundamental ou CMC. Além disso, os agentes tensioactivos baixam a tensão de superfície de um líquido. Os agentes tensioactivos são compostos também compostos como anfipáticos. O termo "Detergente" é um sinónimo usado para agentes tensioactivos em geral.

Agentes tensioactivos aniónicos podem ser seleccionados do grupo de: ácido quenodesoxicólico, sal sódico de ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido Dehidrocólico, ácido Deoxicólico, éster metílico de ácido Deoxicólico, Digitonina, Digitoxigenina, N, N-Dimetildodecilamina N-óxido, Docusato de sódio, sódio de ácido Glicoquenodeoxicólico, hidrato de ácido Glicocólico, monohidrato de ácido Glicodeoxicólico, sal sódico de ácido Glicodeoxicólico, sal sódico de ácido Glicodeoxicólico, sal disódio 3-sulfato de ácido Glicolitocólico, éster etílico de ácido Glicolitocólico, sal sódico N-Lauroilsarcosina, sal sódico N-N-Lauroilsarcosina, N-Lauroilsarcosina, N-Lauroilsarcosina, sulfato dodecil de lítio, Lugol, sal sódico de ácido 1-Octanesulfónico, sal sódico de ácido 1-Octanesulfónico, 1-butanossulfonato de sódio, 1-decanossulfonato de sódio, 1-dodecanossulfonato de sódio, 1-heptanossulfonato de sódio, 1-heptanossulfonato de sódio, 1-nonanossulfonato de sódio, 1-propanossulfonato de monohidrato, 2-bromoetanossulfonato de sódio, hidrato de colato de sódio, bílis de boi ou ovelha, hidrato de colato de sódio, colato de sódio, deoxicolato de sódio, sulfato dodecil de sódio, sulfato dodecil de sódio, hexanossulfonato de sódio, sulfato de octilo de sódio, pentanossulfonato de sódio, taurocolato de sódio, sal sódico de ácido Tauroquenodeoxicólico, monohidrato de sal sódico de ácido Tauroquenodeoxicólico, sal disódio 3-sulfato de ácido Tauroilitocólico, sal sódico de ácido Tauroirsodeoxicólico, sulfato dodecil Trizma®, DSS (Docusato de sódio, registo CAS no [577-11-7]), Docusato de cálcio, registo CAS no [128-49-4]), Docusato de potássio, registo CAS no [7491-09-0]), SDS (sulfato dodecil de sódio ou sulfato lauril de sódio), Dodecilsulfocolina (FOS-Colina-12), Decilsulfocolina (FOS-Colina-10), Nonsulfocolina (FOS-Colina-9), ácido fosfatídico dipalmitoil, caprilato de sódio, e/ou ácido Ursodeoxicólico.

Os agentes tensioactivos catiónicos podem ser seleccionados do grupo de: brometo de alquiltrimetilamónio.

Cloreto de benzalcónio, Cloreto de benzalcónio, cloreto de Benzildimetilhexadecilamónio, cloreto de Benzildimetiltetradecilamónio, Tetracloridrato de Benziltrimetilamónio, brometo de Dimetildioctadecilamónio, brometo de Dodeciletildimetilamónio, brometo de dodeciltrimetilamónio, brometo de dodeciltrimetilamónio, brometo de Etilhexadecildimetilamónio, brometo de Hexadeciltrimetilamónio, brometo de Hexadeciltrimetilamónio, polioxietileno(10)-N-tallow-1,3-diaminopropano, brometo de Tonzónio, e/ou Trimetil(tetradecil)brometo de amónio.

Os agentes tensioactivos não iónicos podem ser seleccionados do grupo de: BigCHAP, Bis(polietileno glicol bis[imidazoil carbonilo]), copolímeros de bloco como copolímeros de bloco polietileneóxido/polipropileneóxido tais como poloxameros, poloxamero 188 e poloxamero 407, Brij® 35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremophor® EL, éter monododecil glicol Decaetileno, N-Decanoil-N-metilglucamina, n-dodecanoil-N-metilglucamida, poliglucósidos de alquilo, óleo de rícino etoxilado, éter monodecil glicol de Heptaetileno, éter monodecil glicol de Heptaetileno, éter monotetradecil glicol de Heptaetileno, éter monodecil glicol de Hexaetileno, éter monohexadecil glicol de Hexaetileno, éter monooctadecil glicol de Hexaetileno, éter monotetradecil glicol de Hexaetileno, Igepal CA-630, Igepal CA-630, Metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, éter monodecil glicol de Nonaetileno, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, éter monodecil glicol de Octaetileno, éter monodecil glicol de Octaetileno, éter monohexadecil glicol de Octaetileno, éter monooctadecil glicol de Octaetileno, éter monotetradecil glicol de Octaetileno, octilo-β-D-glucopiranosido, éter monodecil glicol de Pentaetileno, éter monodecil glicol de Pentaetileno, éter monohexadecil glicol de Pentaetileno, éter monohexil glicol de Pentaetileno, éter monooctadecil glicol de Pentaetileno, éter

monooctil glicol de Pentaetileno, éter diglicidil glicol de Polietileno, éter W-1 polietilenoglicol, éter 10 tridecil polioxietileno, 100 estearato polioxietileno, éter 20 isohexadecil polioxietileno, éter 20 oleico polioxietileno, 40 estearato polioxietileno, 50 estearato polioxietileno, 8 estearato polioxietileno, polioxietileno bis(imidazolil carbonilo), estearato de propilenoglicol 25 de polioxietileno, casca Saponina de Quillaja, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 65, Span® 80, Span® 85, Tergitol, Tipo 15-S-12, Tergitol, Tipo 15-S-30, Tergitol, Tipo 15-S-5, Tergitol, Tipo 15-S-7, Tergitol, Tipo 15-S-9, Tergitol, Tipo NP-10, Tergitol, Tipo NP-4, Tergitol, Tipo NP-40, Tergitol, Tipo NP-7, Tergitol, Tipo NP-9, Tetradecil- β -D-maltosido, éter monodecil glicol de Tetraetileno, éter monododecil glicol de Tetraetileno, éter monotetradecil glicol de Tetraetileno, éter monodecil glicol de Trietileno, éter monododecil glicol de Trietileno, éter monohexadecil glicol de Trietileno, éter monooctil glicol de Trietileno, éter monotetradecil glicol de Trietileno, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton® X-100, Triton® X-114, solução Triton® X-165, solução Triton® X-305, Triton® X-405, Triton® X-45, Triton® X-705-70, TWEEN® 20, TWEEN® 40, TWEEN® 60, TWEEN® 6, TWEEN® 65, TWEEN® 80, TWEEN® 81, TWEEN® 85, Tiloxapol, esfingofosfolípidos (esfingomielina), e esfingoglicolípidos (ceramidas, gangliósidos), fosfolípidos, e/ou n-Undecil- β -D-glucopiranosídeo.

Os agentes tensioactivos bipolares podem ser seleccionados do grupo de: CHAPS, CHAPSO, sal interno propanosulfato 3-(Decildimetilamónio), sal interno propanosulfato 3-(Dodecildimetilamónio), sal interno propanosulfato 3-(Dodecildimetilamónio), 3-(N,N-Dimetilmiristilamónio) propanosulfonato, 3-(N,N-Dimetiloctadecilamónio)-propanosulfonato, sal interno 3-(N,N-Dimetiloctilamónio)

propanosulfonato, 3-(N,N-Dimetilpalmitilamónio) propanosulfonato, N-alquilo-N,N-dimetilamónio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamónio-1-propanosulfonato, Dodecilosfocólina, miristoil lisofosfatidilcolina, Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amónio-1-propanosulfonato), Zwittergent 3-10 (3-(Decildimetilamónio)-propanosulfonato sal interno), Zwittergent 3-08 (3-(Octildimetilamónio)propanosulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, quefalinas, fosfatidil serina), gliceroglicolípidos (galactopiranósido), alquilo, alcoxil (éster alquílico), alcoxi (alquilo éter)- derivados de lisofosfatidil e fosfatidilcolinas, por exemplo, lauroil e derivados de miristoil de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, e modificações do grupo principal polar, ou seja, colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerina, inositol, lisofosfatidilserina e lisofosfatidiltreonina, acilcarnitinas e derivados, derivados de lisina N^{beta}-acilados, arginina ou histidina, ou derivados de lisina ou arginina com cadeia lateral acilada, derivados de dipéptidos N^{beta}-acilados que compreendem qualquer combinação de lisina, arginina ou histidina e um aminoácido neutro ou ácido, derivado N^{beta}-acilado de um tripéptido que compreende qualquer combinação de um aminoácido neutro e dois aminoácidos carregados, ou o agente tensioactivo pode ser seleccionado do grupo de derivados de imidazolina, ácidos gordos de cadeia longa e sais derivados C₆-C₁₂ (por exemplo, ácido oleico e ácido caprílico), N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amónio-1-propanosulfonato, agentes tensioactivos monovalentes (alquilo-arilo-sulfonatos) aniónicos, palmitoil Lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por exemplo, 1 acilo-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina ou treonina), ou misturas derivadas.

O termo "alquil-poliglucosídeos" como aqui usado refere-se a uma cadeia C₅₋₂₀ alquilo recta ou ramificada, -alquenilo ou alquinilo que é substituída por uma ou mais fracções de glucósido tais como maltosido, sacárido etc. As formas de realização destes

alquilo-poliglucósidos incluem C₆₋₁₈-alquilo-poliglucósidos. As formas de realização específicas destes alquilo-poliglucósidos incluem as mesmas cadeias de carbono numeradas tais como a cadeia alquilo C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ e C₂₀. As formas de realização específicas das fracções de glucósido incluem piranoside, glucopiranoside, maltoside, maltotrioside e sacarose. Em formas de realização da invenção menos que 6 fracções de glucósido são fixas ao grupo alquilo. Em formas de realização da invenção com menos de 5 fracções de glucósido são fixadas ao grupo alquilo. Em formas de realização da invenção com menos de 4 fracções de glucósido são fixadas ao grupo alquilo. Em formas de realização da invenção com menos de 3 fracções de glucósido são fixadas ao grupo alquilo. Em formas de realização da invenção com menos de 2 fracções de glucósido são fixadas ao grupo alquilo. As formas de realização específicas de alquilo-poliglucósidos são glucósidos de alquilo, tal como n-decilo β-D-glucopiranoside, decilo β-D-maltopiranoside, dodecil β-D-glucopiranoside, n-dodecil β-D-maltoside, n-dodecil β-D-maltoside, n-dodecil β-D-maltoside, tetradecil β-D-glucopiranoside, decilo β-D-maltoside, hexadecil β-D-maltoside, decilo β-D-maltotrioside, dodecil β-D-maltotrioside, tetradecil β-D-maltotrioside, hexadecil β-D-maltotrioside, n-dodecil-sacarose, sacarose de n-decilo, sacarose monocaprato, monolaurato de sacarose, sacarose monomiristato, e sacarose monopalmitato.

O uso de um agente tensioactivo em composições farmacêuticas é bem conhecido do técnico especializado. Para comodidade, faz-se referência a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19^a edição, 1995.

Numa forma de realização adicional da invenção a formulação adicional compreende inibidores de protease tais como EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e benzamidina-HCl, mas outros

inibidores de protease comercialmente disponíveis podem também ser usados. O uso de um inibidor de protease é especificamente útil em composições farmacêuticas que compreendem zimogéneos de proteases para inibir autocatálise.

É possível que outros ingredientes possam estar presentes na fórmula farmacêutica peptídica da presente invenção. Os ditos ingredientes adicionais podem incluir agentes molhantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de estabilização, modificadores de tonicidade, agentes quelantes, iões metálicos, veículos oleaginosos, proteínas (por exemplo, albumina de soro humano, gelatina ou proteínas) e um ião anfotérico (por exemplo, um aminoácido tais como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Os ditos ingredientes adicionais, naturalmente, não deveriam adversamente afectar a estabilidade total da fórmula farmacêutica da presente invenção.

As composições farmacêuticas contendo um composto de acordo com a presente invenção, podem ser administradas a um doente com necessidade do dito tratamento em diferentes lugares, por exemplo, em lugares tópicos, por exemplo, pele e mucosa, em lugares que deriva absorção, por exemplo, administração numa artéria, numa veia, no coração, e em lugares que envolvem absorção, por exemplo, administração na pele, debaixo da pele, num músculo ou no abdómen. A administração de composições farmacêuticas de acordo com a invenção pode ser feita através de diferentes itinerários de administração, por exemplo, lingual, sublingual, bucal, na boca, oral, no estômago e intestino, nasal, pulmonar, por exemplo, através dos bronquíolos e alvéolos ou uma combinação dos mesmos, epidérmica, cutânea, transdérmica vaginal, rectal, ocular, por exemplo, através da conjuntiva, uretal, e parenteral para pacientes com necessidade de tal tratamento.

As composições da presente invenção podem ser administradas de diferentes formas de dosificação, por exemplo, como soluções, suspensões, emulsões, micro-emulsões, emulsão múltipla, espumas, pomadas, cola, gesso, pomadas, comprimidos, comprimidos revestidos, elixires, cápsulas, por exemplo, cápsulas de gelatina duras e cápsulas de gelatina macias, supositórios, cápsulas rectais, gotas, géis, spray, pó, aerossóis, inaladores, gotas de olho, pomadas oftálmicas, colírios, pessários vaginais, anéis vaginais, pomadas vaginais, solução de injeção, soluções de transformação *in situ*, por exemplo, ajuste *in situ*, gelificação *in situ*, precipitação *in situ*, cristalização *in situ*, solução de infusão, e implantes.

As composições da invenção pode adicionalmente ser composta por, ou fixada a, por exemplo através de, interacções covalentes hidrofóbicas e electrostáticas, um suporte de medicamento, sistema de administração de medicamentos e sistema de administração de medicamentos avançado, para adicionalmente enriquecer a estabilidade do composto da presente invenção, aumentar a biodisponibilidade, aumentar a solubilidade, diminuir os efeitos adversos, obter cronoterapia bem conhecida dos técnicos especializados, e aumentar a adesão do paciente ou qualquer combinação dos mesmos. Os exemplos de excipientes, sistemas de administração de medicamentos e sistemas de administração de medicamentos avançada incluem, mas não estão limitados a, polímeros, por exemplo, celulose e derivados, polissacáridos, por exemplo, dextrana e derivados, amido e derivados, poli(vinil álcool), polímeros de acrilato e de metacrilato, ácido poliacido e poliglicólico e copolímeros de bloco dos mesmos, glicóis de polietileno, proteínas de suporte, por exemplo, albumina, géis, por exemplo, sistemas termogelificação, por exemplo, sistemas copolímeros de bloco bem conhecidos pelos técnicos especializados, micelas, liposomas, microsferas, nanopartículas, cristais líquidos e dispersões dos mesmos, fase L2 e dispersões do mesmo, bem

conhecidos pelos técnicos especializados na matéria de comportamento e fase em sistemas de água-lípido, micelas poliméricas, emulsões múltiplas, auto-emulsificação, auto-microemulsificação, ciclodextrinas e derivados dos mesmos, e dendrímeros.

As composições da presente invenção são úteis na formulação de sólidos, semi-sólidos, pó e soluções para administração pulmonar de compostos da presente invenção, usando, por exemplo, um inalador de dose dosificada, inalador de pó seco e um nebulizador, todos sendo dispositivos bem conhecidos pelos técnicos especializados.

As composições da presente invenção são especificamente úteis na formulação de sistemas controlados sustentados, protelados, retardados, e de administração de medicamento de libertação lenta. Mais especificamente, mas não limitado a, as composições são úteis em formulação de libertação parenteral controlada e sistemas de libertação sustentados (ambos os sistemas conduzindo a uma redução de muitas vezes do número de administrações), bem conhecidos pelos técnicos especializados. Ainda mais preferencialmente, são controlados os sistemas de libertação e libertação sustentados administrados subcutaneamente. Sem limitar o âmbito da invenção, os exemplos de sistemas de libertação úteis controlada e composições são hidrogéis, géis oleaginosos, cristais líquidos, micelas poliméricas, microsferas, nanopartículas. Os métodos para produzir sistemas de libertação controlados úteis para composições da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, cristalização, condensação, co-cristalização, precipitação, co-precipitação, emulsão, dispersão, homogeneização de alta pressão, encapsulação, atomização, micro-encapsulamento, coacervação, separação de fase, evaporação de solvente para produzir microsferas, extrusão e processos de fluído supercríticos. É

feita a referência geral ao Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) e Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).

A administração parenteral pode ser realizada por, injeção subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenoso mediante uma seringa, opcionalmente uma seringa tipo caneta. Alternativamente, a administração parenteral pode ser realizada mediante uma bomba de infusão. Uma opção adicional é uma composição que pode ser uma solução ou suspensão ou um pó para a administração do composto da presente invenção em forma de um líquido nasal ou pulmonar ou pulverização de pó. Como uma outra opção adicional, as composições farmacêuticas contendo o composto da invenção podem também ser adaptadas para administração transdérmica, por exemplo, por injeção sem agulha ou um penso, opcionalmente um penso iontoforético, ou transmucosal, por exemplo, oral, administração.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados mediante a rota pulmonar num veículo, como uma solução, suspensão ou pó seco, usando qualquer um dos tipos conhecidos de dispositivos adequados para administração de medicamento pulmonar. Exemplos destes compreendem, mas não se limitam a, três tipos gerais de gerador de aerossol para administração de medicamento pulmonar, e pode incluir nebulizadores jacto ou ultrasónicos, inaladores doseados, ou inaladores de pó seco (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Ver Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

Baseado numa metodologia de teste padronizada, o diâmetro aerodinâmico (d_a) de uma partícula é definido como o diâmetro geométrico equivalente de uma partícula esférica de referência padrão de densidade de unidade (1 g/cm^3). No caso mais simples, para partículas esféricas, d_a refere-se a um diâmetro de referência (d) como função da raiz quadrada do rácio de densidade como descrito por:

As modificações para esta relação ocorrem para partículas não-esféricas (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. *Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles*. *J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385). Os termos "MMAD" e "MMEAD" são bem descritos e conhecidos da técnica (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. e representa uma medida do valor médio duma distribuição do tamanho das partículas aerodinâmica. *Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles*. *J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385). O diâmetro aerodinâmico de massa média (MMAD) e diâmetro aerodinâmico eficaz de massa média (MMEAD) são usados intermutáveis, são parâmetros estatísticos, e empiricamente descrevem a dimensão de partículas de aerossol em relação ao seu potencial para depositar nos pulmões, independentes da forma real, dimensão, ou densidade (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. *Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles*. *J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385). O MMAD é normalmente calculado a partir da medição feita com impactores, um instrumento que mede um comportamento inercial de partícula em ar.

Numa forma de realização adicional, a formulação poderia ser aerossolizado por qualquer tecnologia de aerossolização conhecida, tais como nebulização, para obter um MMAD de partículas de aerossol inferior a $10 \mu\text{m}$, mais preferencialmente entre $1-5 \mu\text{m}$, e mais preferivelmente entre $1-3 \mu\text{m}$. O tamanho de

partícula preferencial é baseado na dimensão mais eficaz para administração de medicamento ao pulmão profundo, em que a proteína é optimamente absorvida (cf. *Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385).

A deposição de pulmão profundo das formulações pulmonares que compreendem do composto da presente invenção pode opcional ser ainda optimizada usando modificações das técnicas de inalação, por exemplo, mas não limitado a: fluxo de inalação lenta (por exemplo, 30 L/min), retenção de respiração e tempo de actuação.

O termo "formulação estabilizada" refere-se a uma formulação com estabilidade física aumentada, estabilidade química aumentada ou estabilidade física e química aumentada.

O termo "estabilidade física" da formulação proteínica como aqui usado refere-se à tendência da proteína para formar agregados biologicamente inactivos e/ou insolúveis da proteína como resultado da exposição da proteína a tensões termo-mecânicas e/ou interacção com interfaces e superfícies que são desestabilizadoras, tais como superfícies hidrofóbicas e interfaces. A estabilidade física das formulações de proteína aquosas é avaliada mediante inspecção visual e/ou medições de turvação depois da exposição da formulação cheia em recipientes adequados (por exemplo, cartuchos ou frascos) para tensão mecânica/física (por exemplo, nervosismo) em temperaturas diferentes para vários períodos de tempo. A inspecção visual das formulações é realizada debaixo de luz focalizada com um fundo escuro. A turvação da formulação é caracterizada pelo facto de que uma classificação de pontuação visual do grau de turvação, por exemplo, numa escala de 0 a 3 (uma formulação que mostra não

turvação corresponde a uma pontuação visual 0, e uma formulação que mostra turvação visual à luz do dia corresponde a pontuação visual 3). Uma formulação é classificada fisicamente instável em relação a agregação proteínica, quando mostra turvação visual à luz do dia. Alternativamente, a turvação da formulação pode ser avaliada por medições de turvação simples, bem conhecidas do técnico especializado. A estabilidade física das formulações de proteína aquosas podem também ser avaliadas usando um agente espectroscópico ou sonda do estado conformacional da proteína. A sonda é preferencialmente uma molécula pequena que preferencialmente liga a um conformero não-nativo da proteína. Um exemplo de uma sonda pequena molecular espectroscópica de estrutura proteínica é Thioflavin T. A Thioflavin T é um corante fluorescente que foi extensamente usado para a detecção de fibrilas de amilóide. Na presença de fibrilas, e talvez outras configurações proteínicas também, a Thioflavin T faz surgir um novo máximo de excitação em aproximadamente 450 nm e emissão realizada em aproximadamente 482 nm quando ligado a uma forma proteínica de fibrila. A Thioflavin T é essencialmente não-fluorescente nos comprimentos de onda.

Outras moléculas pequenas podem ser usadas como sondas das mudanças na estrutura proteínica dos estados nativos para não-nativos. Por exemplo, as sondas "sistema de libertação hidrofóbico" que ligam preferencialmente a sistemas de libertação hidrofóbicos expostos de uma proteína. Os sistemas de libertação hidrofóbicos são geralmente inseridos dentro da estrutura terciária de uma proteína no seu estado nativo, mas torna-se exposto quando uma proteína começa a desdobrar ou desnaturar. Exemplos destas pequenas moléculas, as sondas espectroscópicas são, tintas aromáticas hidrofóbicas, tais como antraceno, acridina, fenantrolina ou similar. Outras sondas espectroscópicas são complexos ácidos amino de metal, tais como complexos de cobalto de metal de aminoácidos hidrofóbicos, tais

como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, e valina, ou similar.

O termo "estabilidade química" da formulação proteínica como aqui usado refere-se a mudanças químicas covalentes na estrutura proteínica conduzindo à formação de produtos de degradação química com potência biológica menos potencial e/ou propriedades imunogénicas potencialmente aumentadas comparadas com a estrutura de proteína nativa. Vários produtos de degradação química podem ser formados dependendo do tipo e natureza da proteína nativa e o ambiente ao qual a proteína é exposta. A eliminação de degradação química pode provavelmente não ser completamente evitada e quantidades crescentes de produtos de degradação química são frequentemente vistas durante o armazenamento e a utilização da formulação proteínica como bem conhecida pelo técnico especializado. A maioria das proteínas é propensa à deamidação, um processo no qual o grupo de amidas de cadeia lateral em resíduos glutaminil ou asparaginil é hidrolisado para formar um ácido carboxílico livre. Outras vias de degradações implica a formação de produtos de transformação de peso molecular elevado em que duas ou mais moléculas proteínicas são ligadas reciprocamente de forma covalente através de transidação e/ou interações de dissulfuro que conduz à formação de produtos de degradação de dímero, oligómero e polímero covalentemente ligados (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). A oxidação (de por exemplo, resíduos de metionina) pode ser mencionada como outra variante de degradação química. A estabilidade química da formulação proteínica pode ser avaliada ao medir a quantidade dos produtos de degradação química em vários pontos de tempo após exposição a diferentes condições ambientais (a formação de produtos de degradação pode frequentemente ser acelerada por, por exemplo, temperatura crescente). A quantidade de cada produto de degradação individual é frequentemente determinada por separação dos

produtos de degradação dependendo da dimensão da molécula e/ou carregar usando várias técnicas de cromatografia (por exemplo, SEC-HPLC e/ou RP-HPLC).

Assim, como delineado acima, uma "formulação estabilizada" refere-se a uma formulação com estabilidade física aumentada, estabilidade química aumentada ou estabilidade física e química aumentada. Em geral, uma formulação deve ser estável durante o uso e armazenamento (de acordo com o uso recomendado e condições de armazenamento) até a data de expiração ser atingida.

Numa forma de realização da invenção a fórmula farmacêutica que compreende o composto da presente invenção é estável durante mais de 6 semanas de uso e durante mais de 3 anos de armazenamento.

Noutra forma de realização da invenção a fórmula farmacêutica que compreende o composto da presente invenção é estável durante mais de 4 semanas de uso e durante mais de 3 anos de armazenamento.

Numa forma de realização adicional da invenção a fórmula farmacêutica que compreende o composto da presente invenção é estável durante mais de 4 semanas de uso e durante mais de dois anos de armazenamento.

Numa mesma forma de realização adicional da invenção a fórmula farmacêutica que compreende o composto da presente invenção é estável durante mais de 2 semanas de uso e durante mais de dois anos de armazenamento.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de um composto de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento.

Numa forma de realização, um composto de acordo com a invenção é usado para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância diminuída à glicose, diabetes tipo 1, obesidade, hipertensão, síndrome X, dislipidemia, distúrbios cognitivos, aterosclerose, enfarte do miocárdio, cardiopatia coronária e outros distúrbios cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome do intestino irritável, dispepsia e úlceras gástricas.

Noutra forma de realização, um composto de acordo com a invenção é usado na preparação de um medicamento para atrasar ou prevenir a progressão da doença diabetes tipo 2.

Noutra forma de realização, um composto de acordo com a invenção é usado para a preparação de um medicamento para diminuir a ingestão de alimentos, diminuir apoptose célula β , aumentar a função e massa da célula β , e/ou para restaurar a sensibilidade da glucose às células β .

O tratamento com um composto de acordo com a presente invenção pode também ser combinado com um segundo ou mais substâncias farmacologicamente activas, por exemplo, seleccionadas de agentes contra a diabetes, agentes anti-obesidade, agentes que regulam o apetite, agentes anti-hipertensivos, agentes para o tratamento e/ou prevenção de complicações resultando de ou associado com diabetes e agentes para o tratamento e/ou prevenção de complicações e doenças resultando de ou associado com obesidade. Os exemplos destas substâncias farmacologicamente activas são: insulina, sulfonilureias, biguanidas, meglitinidas, inibidores de glucosidase, antagonistas de glucagão, inibidores

DPP-IV (dipeptidil peptidase-IV), inibidores de enzimas hepáticas envolvidas na estimulação de gluconeogenese e/ou glicogenolise, moduladores de absorção de glucose, compostos que modificam do metabolismo de lípido, tais como agentes antihiperlipidémicos como inibidores HMG CoA (estatinas), Polipéptidos Inibidores Gástricos (análogos GIP), ingestão reduzida de alimentos compostos, agonistas RXR e agentes que agem no canal de potássio dependente de ATP das células- β ; Colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; bloqueadores- β tais como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol e metoprolol, inibidores ACE (enzima de conversão de angiotensina) tais como benazeprilo, captoprilo, enalaprilo, fosinoprilo, lisinoprilo, alatrioprilo, quinaprilo e ramiprilo, bloqueadores de canal de cálcio tais como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem e verapamil, e bloqueadores- α tais como doxazosina, urapidil, prazosina e terazosina; agonistas CART (cópia regulada de anfetamina de cocaína), agonistas PYY (neuropéptido Y), agonista PII, agonistas PII2, agonistas PII4, agonistas PPY2/PYY4 misturados, agonistas MC4 (melanocortina 4), antagonistas orexina, agonistas TNF (factor de necrose tumoral), agonistas CRF (factor de libertação de corticotropina), antagonistas CRF PB (proteína aglutinante do factor de libertação de corticotropina), agonistas urocortina, agonistas β 3, agonistas MSH (hormona estimulantes de melanócito), antagonistas MCH (hormona de concentração de melanócito), agonistas CCK (colecistoquinina), inibidores de reabsorção de serotonina, inibidores de reabsorção de serotonina e noradrenalina, compostos misturados de serotonina e noradrenérgicos, agonistas 5HT (serotonina), agonistas bombesina, antagonistas galanina, hormona de crescimento, compostos de libertação de hormona de crescimento, agonistas TRH (hormona de libertação de tireotropina), moduladores UCP 2 ou 3 (separando proteína 2 ou 3), agonistas leptina, agonistas DA (bromocriptina, doprexina), inibidores de lipase/amilase,

moduladores RXR (receptor X retinóide), agonistas TR β ; antagonistas histamina H3, agonistas ou antagonistas de Polipéptidos Inibidores Gástricos (análogos GIP), análogos de gastrina e gastrina.

O tratamento com um composto de acordo com esta invenção pode também ser combinado com cirurgia - uma cirurgia que influencia os níveis de glucose e/ou homeostase de lípido, tais como banda gástrica ou *bypass* gástrico.

Deverá ser compreendido que qualquer combinação adequada dos compostos, de acordo com a invenção, com um ou mais dos compostos acima mencionados e opcionalmente um ou mais substâncias farmacologicamente activas adicionais são consideradas estar no âmbito da presente invenção.

A presente invenção é subsequentemente ilustrada pelos exemplos seguintes que, no entanto, não devem ser considerados como limitadores do âmbito de protecção. As características descritas na descrição precedente e nos exemplos seguintes podem, separadamente e com qualquer combinação dos mesmos, ser material para realizar a invenção em diversas formas do mesmo.

EXEMPLOS

Abreviaturas usadas:

r.t: temperatura ambiente

DIPEA: diisopropiletilamina

H₂O: água

CH₃CN: acetonitrilo

DMF: NN dimetilformamida

HBTU: 2(1H-Benzotriazol-1-il-)-1,1,3,3-tetrametilurónio
hexafluorofosfato

Fmoc: 9 H-fluoreno-9-ilmetóxicarbonilo

Boc: tert butiloxicarbonilo

OtBu: tert éster de butilo

tBu: tert butilo

Trt: trifenilmetilo

Pmc: 2,2,5,7,8-Pentametilo-croman-6-sulfonilo

Dde: 1-(4,4-Dimetilo-2,6-dioxociclohexilideno)etilo

ivDde: 1-(4,4-Dimetilo-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo

Mtt: 4-metiltritilo

Mmt: 4-metoxitritilo

DCM: diclorometano

TIS: triisopropilsilano)

TFA: ácido trifluoracético

Et₂O: dietiléter

NMP: 1-Metilo-pirrolidina-2-ona

DIPEA: Diisopropiletilamina

HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazola

HOBt: 1-Hidroxibenzotriazola

DIC: Diisopropilcarbodiimida

A: Síntese de péptido ligante de resina.

A resina peptídica protegida foi sintetizada de acordo com a estratégia Fmoc num sintetizador de péptido Applied Biosystems 433 em escala 0,25 mmol ou 1,0 mmol usando os protocolos do fabricante fornecedor FastMoc UV que emprega HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio hexafluorofosfato) ou HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio hexafluorofosfato) acoplamentos mediados em NMP (N-metilo pirrolidona), e monitorização UV da desprotecção do grupo de protecção Fmoc. A resina de início usada para a síntese das amidas peptídicas GLP-1 foi a resina Rink-Amide e tanto Wang como a resina clorotritil foram usados para péptidos GLP-1 com um carboxi C-terminal. Os derivados de aminoácido protegidos usados eram aminoácidos Fmoc padrão (fornecidos por exemplo, por Anaspec, ou Novabiochem) fornecidos em cartuchos adequados pré-pesados para o sintetizador ABI433A com a excepção de aminoácidos não naturais tais como Fmoc-Aib-OH (ácido Fmoc-aminoisobutírico). O aminoácido N terminal era Boc protegido no grupo amino alfa (por exemplo, Boc-His(Boc)OH foi usado para péptidos com His no N-terminal). O grupo amino de epsilon de lisina na posição 26 foi protegido com Mtt, Mmt, Dde, ivDde, ou Boc, dependendo da rota para fixação da parte aglutinante de albumina e separador. A síntese dos péptidos pode, em alguns casos, ser aperfeiçoada pelo uso de dipéptidos protegidos na união de amida de dipeptídeo com um grupo que pode ser clivado sob condições acídicas tais, mas não limitadas a 2-Fmoc-oxi-4-metoxibenzilo ou 2,4,6-trimetoxibenzilo. Em casos em que uma serina ou uma treonina estão presentes no péptido, o uso de dipéptidos de pseudoprolina pode ser usado (ver por exemplo, catálogo de Novobiochem 2002/2003 ou versão nova, ou W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403).

Procedimento para remoção de ivDde ou Dde-protectão.

A resina (0.25 mmol) foi colocada num agitador manual/aparelho de filtração e tratada com 2% de hidrazina em N-metilo pirrolidona (20 ml, 2x12 min) para eliminar o grupo Dde ou ivDde e lavada com N-metilo pirrolidona (4x20 ml).

Procedimento para remoção de Mtt ou Mmt-protectão.

A resina (0.25 mmol) foi colocada num agitador manual/aparelho de filtração e tratada com 2% de TFA e 2-3% de TIS em DCM (20 ml, 5-10 minutos repetindo 6-12 vezes) para eliminar o grupo Mtt ou Mmt e lavada com DCM (2x20 ml), 10% de MeOH e 5% de DIPEA em DCM (2x20 ml) e N-metilo pirrolidona (4x20 ml).

Procedimento para fixação de cadeia lateral para resíduo de Lisina.

A resíduo aglutinante de albumina (B-U-cadeia lateral de fórmula I) pode ser fixada ao péptido GLP-1 por acilação para péptido aglutinante de resina ou acilação em solução para o péptido desprotegido usando reactivo acilante padrão tal como, mas não limitada a, DIC, HOBT/DIC, HOAt/DIC, ou HBTU.

Fixação ao péptido aglutinante de resina:

Via |

O resíduo aglutinante albumina (éster activo ou anidrido simétrico) activado (B-U-cadeia lateral de fórmula I) tal como

ácido octadecanedióico mono-(2,5-dioxo-pirrolidina-1-il) éster (Ebashi et al. EP511600, 4 molaes equivalentes relativos ao péptido ligante resina) foi dissolvido em NMP (25 mL), adicionado à resina e agitado durante a noite à temperatura ambiente. A mistura reactiva foi filtrada e a resina foi lavada extensivamente com NMP, diclorometano, 2-propanol, metanol e éter dietílico.

Via ||

O resíduo aglutinante albumina (B-U-cadeia lateral de fórmula I) foi dissolvido em N-metilo pirrolidona/cloreto de metileno (1:1, 10 ml). O reactivo activante, tal como hidroxibenzotriazola (HOBt) (4 molaes equivalentes relativos à resina) e diisopropilcarbodiimida (4 molaes equivalentes molaes relativos à resina), foram adicionados e a solução foi agitada durante 15 min. A solução foi adicionada à resina e diisopropietilamina (4 molaes equivalentes molaes relativos à resina) foi adicionada. A resina foi agitada 2 a 24 horas à temperatura ambiente. A resina foi lavada com N-metilo pirrolidona (2x20 ml), N-metilo pirrolidona/cloreto de metileno (1:1) (2x20 ml) e cloreto de metileno (2x20 ml).

Via |||

O resíduo aglutinante albumina (éster activo ou anidrido simétrico) activo (B-U-cadeia lateral de fórmula I) tal como ácido octadecanedióico mono-(2,5-dioxo-pirrolidina-1-il) éster (Ebashi et al. EP511600, 1-1,5 molaes equivalentes relativamente ao péptido GLP-1) foi dissolvido num solvente orgânico tal como acetonitrilo, THF, DMF, DMSO ou numa mistura de água/solvente orgânico (1-2 ml) e adicionado a uma solução do

péptido em água (10-20 ml) juntamente com 10 molaes equivalentes de DIPEA. No caso de grupos de protecção no resíduo aglutinante de albumina, tais como tert-butilo, a mistura reactiva foi liofilizada O/N e o péptido bruto isolado desprotegido mais tarde - no caso de um grupo tert-butilo, o péptido foi dissolvido numa mistura de ácido trifluoracético, água e triisopropilsilano (90:5:5). Após 30 minutos, a mistura foi, evaporada em vácuo e o péptido final purificado por HPLC preparado.

Procedimento para remoção de Fmoc-protecção: A resina (0.25 mmol) foi colocada num matraz de filtro num aparelho manual de agitação e tratada com N-metilo pirrolidona/cloreto de metileno (1:1) (2x20 ml) e com N-metilo pirrolidona (1x20 ml), uma solução de 20% piperidina em N-metilo pirrolidona (3x20 ml, 10 minutos cada). A resina foi lavada com N-metilo pirrolidona (2x20 ml), N-metilo pirrolidona/cloreto de metileno (1:1) (2x20 ml) e cloreto de metileno (2x20 ml).

Procedimento para clivagem do péptido da resina:

O péptido foi clivado da resina ao agitar durante 180 minutos à temperatura ambiente com uma mistura de ácido trifluoracético, água e triisopropilsilano (95:2.5:2.5 a 92:4:4). A mistura de clivagem foi filtrada e o filtrado foi concentrado a um óleo por uma corrente de nitrogénio. O péptido bruto foi precipitado deste óleo com 45 ml de éter dietílico e lavado 1 a 3 vezes com 45 ml éter dietílico.

Purificação: O péptido bruto foi purificado por HPLC semi-preparado numa coluna 20 mm X 250 mm embalada com sílica C-18 5 μ ou 7 μ . Dependendo do péptido, foi usado um ou dois sistemas de purificação.

TFA: Após secar o péptido bruto foi dissolvido em 5 ml 50% ácido acético H₂O e diluído para 20 ml com H₂O e injectado na coluna que logo foi eluída com um gradiente de 40-60% CH₃CN em 0.1% TFA 10 ml/min durante 50 minutos a 40 °C. Foi recolhido o péptido contendo fracções. O péptido purificado foi liofilizado depois de diluição do eluato com água. Sulfato de amónio: A coluna foi equilibrada com 40% CH₃CN em 0.05 M (NH₄)₂SO₄, que foi ajustado para pH 2.5 com concentrado H₂SO₄. Após a secagem do péptido bruto foi dissolvido em 5 ml 50% ácido acético H₂O e diluído para 20 ml com H₂O e injectado na coluna que logo foi eluída com um gradiente de 40% - 60% CH₃CN em 0.05M (NH₄)₂SO₄, pH 2.5 em 10 ml/min durante 50 minutos a 40 °C. Foi recolhido o péptido contendo fracções e diluído com 3 volumes de H₂O e passado através de um cartucho Sep-Pak® C18 (Waters part. #:51910) que foi equilibrado com 0.1% TFA. Foi logo eluído com 70% CH₃CN que contém 0.1% TFA e o péptido purificado foi isolado por liofilização depois da diluição do eluato com água.

O produto final obtido foi caracterizado por RP-HPLC analítico (tempo de retenção) e por LCMS.

A análise RP-HPLC foi realizada usando detecção UV a 214 nm e um Vydac 218TP54 4.6 mm X 250 mm coluna sílica C18 5µ (The Separations Group, Hesperia, USA) que foi eluído em 1 ml/min em 42 °C. Foram usadas duas condições de eluição diferentes:

A1: Equilibração da coluna com uma solução tampão com 0.1 M (NH₄)₂SO₄, que foi ajustada para pH 2.5 com concentrado H₂SO₄ e eluição por um gradiente de 0% a 60% CH₃CN na mesma solução tampão durante 50 minutos.

B1: Equilibração da coluna com 0.1 % TFA/H₂O e eluição por um gradiente de 0% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O para 60% CH₃CN/0.1% TFA/H₂O durante 50 minutos.

B6: Equilibração da coluna com 0.1 % TFA/H₂O e eluição por um gradiente de 0% CH₃CN/0.1 % TFA/H₂O para 90% CH₃CN/0.1 % TFA/H₂O durante 50 minutos.

Em alternativa, a análise RP-HPLC foi realizada usando detecção UV em 214 nm e um Symmetry300, 3.6 mm X 150 mm, coluna de sílica C-18 (Waters) que foi eluído em 1 ml/min a 42 °C.

B4: Equilibração da coluna com 0.05% TFA/H₂O e eluição por um gradiente de 5% CH₃CN/0.05% TFA/H₂O para 95% CH₃CN/0.05% TFA/H₂O durante 15 minutos.

Foi usada a instrumentação seguinte:

O LCMS foi realizado numa disposição que consistia num espectrómetro de massa quadrupolo Sciex API 100 Single, bomba Perkin Elmer Series 200 Quard, amostrador automático Perkin Elmer Series 200, detector UV Applied Biosystems 785A, detector difusor de luz evaporada Sedex 75.

O controlo de instrumentos e recolha de dados foram feitos pelo software de controlo Sciex Sample executado num computador com Windows 2000.

A bomba HPLC está conectada a dois reservatórios de eluente contendo:

A: 0.05% de ácido trifluoracético em água

B: 0.05% de ácido trifluoracético em acetonitrilo

A análise é realizada à temperatura ambiente injectando um volume apropriado da amostra (preferencialmente 20 µl) na coluna que é eluída com um gradiente de acetonitrilo.

As condições de HPLC, definições do detector e espectrómetro de massa usadas são dadas na tabela seguinte.

Coluna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 µm

Gradiente: 5%-90% de acetonitrilo linear durante 7.5 minutos em 1.5 ml/min

Detecção: 210 nm (saída análoga de DAD)

ELS (saída análoga de ELS), 40 °C

MS modo de ionização API-ES

Alternativamente o LCMS foi realizado numa disposição composta por Hewlett Packard series 1100 G1312A Bom Pump, Hewlett Packard series 1100 Column compartment, Hewlett Packard series 1100 G1315A DAD diode array detector, Hewlett Packard series 1100 MSD e Sedere 75 Evaporative Light Scattering detector controlled by HP Chemstation software. A bomba HPLC está conectada a dois reservatórios de eluente contendo:

A: 10mM NH₄OH em água

B: 10mM NH₄OH em 90% de acetonitrilo

A análise foi realizada a 23 °C injectando um volume apropriado da amostra (preferencialmente 20 µl) sobre a coluna que é eluída com um gradiente de A e B.

As condições HPLC, definições do detector e espectrómetro de massa usadas são dadas na tabela seguinte.

Column Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 Om

Gradiente 5% - 100% de acetonitrilo linear durante 6.5 minutos em 1.5 ml/min

Detecção 210 nm (saída análoga de DAD)

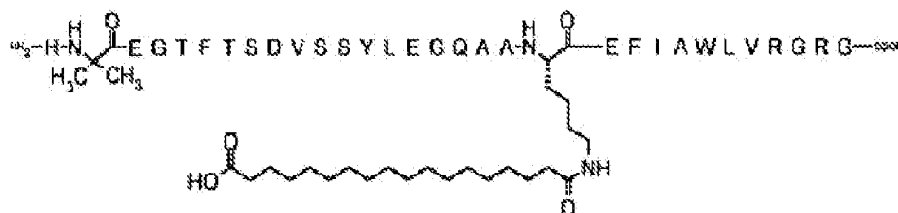
ELS (saída análogo de ELS)

MS modo de ionização API-ES. Scan 100-1000 amu fase 0.1 amu

Radioligante aglutinado a membranas plasmáticas que expressam o receptor GLP-1 humano

O ensaio aglutinante foi realizado com membranas plasmáticas purificadas contendo o receptor GLP-1 humano. As membranas plasmáticas contendo os receptores foram purificadas de expressão estável BHK tk-ts 13 células. As membranas foram diluídas em Solução Tampão de Ensaio (50 mM HEPES, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 0.005% Tween 20; pH=7.4) para uma concentração final de 0.2 mg/ml de proteína e distribuído a placas de microtitulação de cavidade 96 pré-revestidas com 0.3 % PEI. As membranas na presença de 0.05 nM [¹²⁵]GLP-1, ligantes não marcados em concentrações crescentes e concentrações HSA diferentes (0.005%, 0.05%, e 2%) foram incubadas 2 horas a 30 °C. Após a incubação, os ligantes livres foram separados dos ligantes aglutinados por filtração através de um colector de vácuo seguido 2X100 µl lavando com uma solução tampão de ensaio gelado. Os filtros foram secos durante a noite a RT, agitados e quantificados num contador-γ.

Exemplo 1



N- ϵ^{26} (17-carboxiheptadecanoil)-[Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

Uma resina (Fmoc-Gly-NovaSyn TGT, 0.22 mmol/g Novabiochem 0.25 mmol) foi usada para produzir a sequência primária numa máquina ABI433A de acordo com directrizes de fabricantes. Todos grupos de protecção eram ácido lábil com a excepção do resíduo usado na posição 26 (FmocLys(ivDde)-OH; Novabiochem) que permite a desprotecção específica desta lisina em vez de qualquer outra lisina.

Procedimento

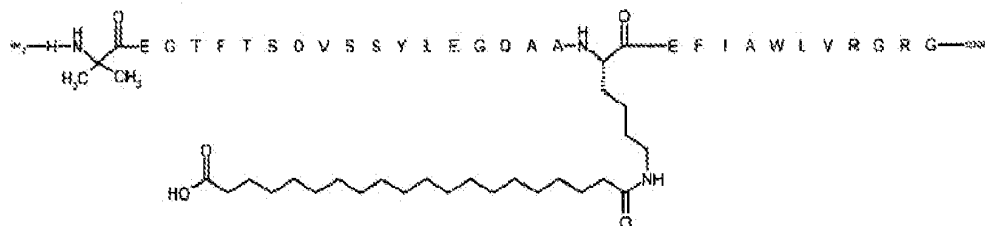
A resina (0.09 mmol) foi colocada num agitador manual/aparelho de filtração e tratada com 4% de hidrazina no N-metilo pirrolidona em (4x10 min. 4x4 ml) para eliminar o grupo ivDde. A resina foi lavada com N-metilo pirrolidona (3x4 ml). O ácido octadecanedióico mono-(2,5-dioxopirrolidona-1-il)éster) (4 molaes equivalentes relativos à resina) foi dissolvido em DMF (4ml). A solução foi adicionada à resina e a diisopropiletilamina (8 molaes equivalentes relativos à resina) foi adicionada. A resina foi agitada 24 horas à temperatura ambiente. A resina foi lavada com N-metilo pirrolidona (4x4 ml) e DCM (4x4ml). O péptido foi clivado da resina ao agitar durante 180 minutos à temperatura ambiente com uma mistura de ácido

trifluoracético, água e triisopropilsilano (92.5:5.0:2.5 4 ml). A mistura de clivagem foi filtrada e o péptido bruto foi precipitado de 40 ml de éter dietílico e lavada 3 vezes com 45 ml de éter dietílico. O péptido bruto foi purificado por HPLC preparado numa coluna 20 mm X 250 mm embalada com sílica C-18 7 μ . O péptido bruto foi dissolvido em 5 ml 50% ácido acético em água e diluído para 20 ml com H₂O e injectado na coluna que foi logo eluído com um gradiente de 25-65% (CH₃CN em água com 0.1% TFA) 20 ml/min durante 40 minutos a RT. O péptido contendo fracções foi recolhido. O péptido purificado foi liofilizado depois da diluição do eluato com água.

HPLC (método B4): RT= 9.94 minutos (91%)

LCMS: m/z = 1232 (MH₃³⁺) Calculado para (MH₃³⁺) = 1232

Exemplo 2



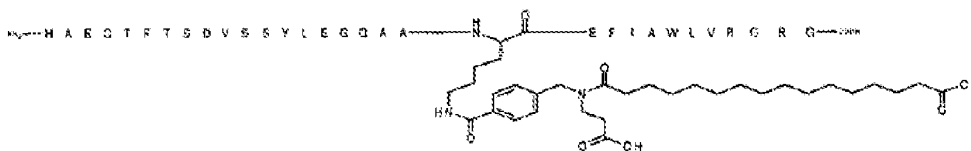
N- ϵ^{26} (19-carboxinonadecanoil)-[AibB, Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

Preparado como no Exemplo 1 e de acordo com os "métodos sintéticos".

HPLC (método B4): RT= 10.42 minutos (91%)

LCMS: m/z = 1242 (MH₃³⁺), calculado para (MH₃³⁺) = 1242

Exemplo 3



N- ϵ^{26} (4-{[N-(2-carboxietil)-N-(15-carboxipentadecanoil) amino] metil}benzoil[Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

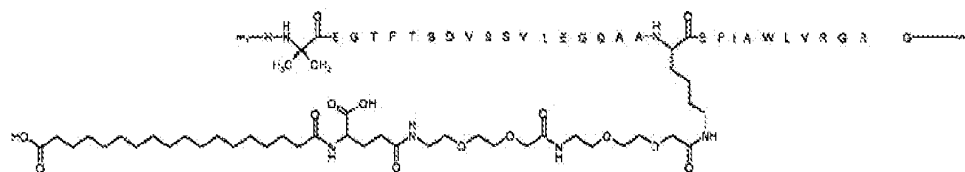
Para uma solução de 4-(N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-N-(15-(tert-butoxicarbonil) pentadecanoil) aminometil) ácido benzóico (36 mg, 60 μ mol) em THF (1 ml) foram adicionados DIPEA (7 μ l) e O-(1-succinimidilo)-N,N,N',N'-tetrametilurônio hexafluorofosfato (TSTU, 17 Mg, 56 μ l). Depois de agitar durante 1 hora à temperatura ambiente, a mistura foi diluída com THF (1 ml), e 1 ml da solução resultante foi adicionada a uma solução de [Arg34]GLP-1-(7-37) péptido (aproximadamente 100 Mg) e DIPEA (103 μ l) em água (5 ml). Depois de 0.5 hora mais da solução THF do agente acilante (0.4 ml) foi adicionada. Depois de agitar à temperatura ambiente durante 1.5 hora, a mistura reactiva foi filtrada e aplicada ao HPLC preparado (eluição de gradiente com 35-55% MeCN/55-35% água/10% água com 1% TFA). As fracções contendo o produto desejado foram combinadas e liofilizadas. O produto foi então tratado com 25 ml de uma mistura de TFA e água (95/5 vol) durante 15 minutos à temperatura ambiente, concentrado, e purificado outra vez por HPLC. Foram obtidos 15.4 mg do composto base.

HPLC (método B4): RT = 9.41 minutos (99%)

LCMS: m/z = 1287 (MH_3^{3+}). Calculado para (MH_3^{3+}): 1287

Exemplo 4

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Aib8,Arg34]GLP-1 -(7-37)péptido.

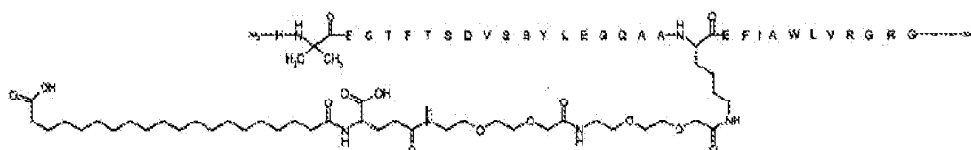


O [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido foi preparado por uma síntese de péptido Fmoc-fase sólida standard e purificado pelo HPLC preparado. O [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido foi dissolvido em água (15 ml) e DIPEA (50ul) foi adicionado. 17-((S)-1-tert-Butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidina-1-iloxicarbonilmetóxi) etóxi] etilcarbamoil} metóxi) etóxi] etilcarbamoil}propilcarbamoil) éster tert-butilo ácido heptadecanóico (21 mg) foi dissolvido em acetonitrilo/água 2:1 (1,5 ml) e adicionado em partes pequenas. A reacção foi controlada por HPLC. Quando não foi mais [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido encontrado, a mistura reactiva foi liofilizada O/N. Ao composto isolado foi adicionado 10 ml de 90% TFA/5% TIS/5% água e a mistura reactiva manteve-se durante 2 horas, evaporada *in vacuo*, e coevaporado com heptano. O óleo residual foi dissolvido em 15ml de água com 1% de NH₃-aq e purificado pelo HPLC preparado para dar o composto base.

HPLC (método B4): RT = 9.60 minutos (100%)

LCMS: m/z = 1372 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1372

Exemplo 5



N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi]acetilo] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)péptido.

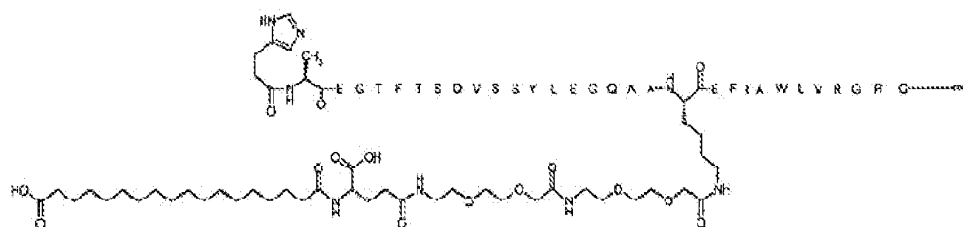
O péptido foi preparado de acordo com: A. Uma síntese de péptido aglutinante resina na escala 0.25 mmol numa resina Fmoc-Gly-Wang (0.66 mmol/g Novabiochem) foi usada para produzir a sequência primária numa máquina ABI433A de acordo com directrizes de fabricantes. Todos os grupos de protecção eram ácido lábil com a excepção do resíduo usado na posição 26 (FmocLys(Mtt)-OH; Novabiochem) que é ácido super lábil, que permite a desprotecção específica desta lisina, melhor que qualquer outra lisina.

Procedimento para remoção de Mtt-protecção. A resina (0.25 mmol) foi colocada num agitador manual/aparelho de filtração e tratada com 2% TFA, 3% TIS em DCM (20 ml, 5-10 minutos repetidos 6-12 vezes) para eliminar o grupo Mtt e lavada com DMF. A síntese foi continuada com Procedimento para fixação de cadeias laterais para resíduo de Lisina, seguindo a Rota II, com o Procedimento apropriado para remoção de Fmoc-protecção. Desprotecção final, purificação de HPLC e análise pelo HPLC e LC-MS de acordo com os procedimentos.

HPLC (método B6): RT = 34.56 minutos (100%)

LCMS: m/z = 1381.8 (MH_3^{3+}). Calculado para (M_4H^+): 4142.7

Exemplo 6



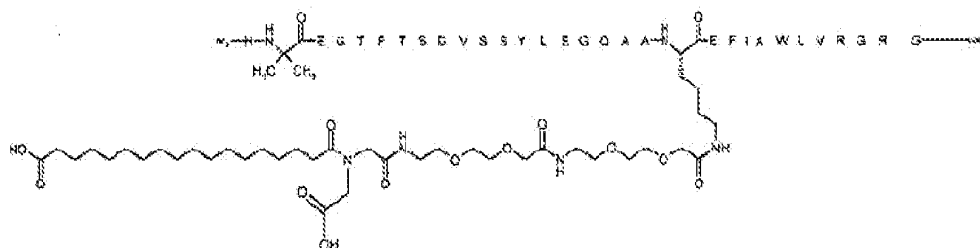
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [3-(4-Imidazolilo)Propionil7,Arg34]GLP-1-(7-37)péptido

Preparado como no exemplo 5 e de acordo com "métodos sintéticos".

HPLC (método B6): RT = 32.89 minutos (100%)

LCMS: m/z = 1362.3 (MH_3^{3+}). Calculado para (M_4H^+): 4085.6

Exemplo 7



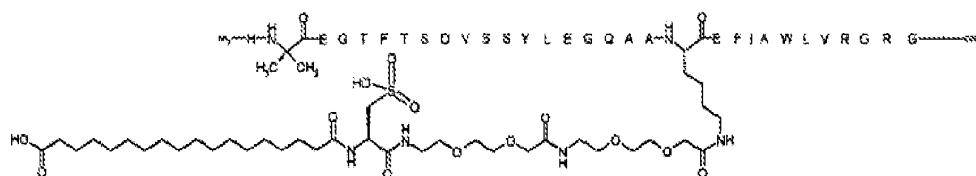
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-(carboximetilamino)acetilamino]etóxi) etóxi] acetilamino) etóxi]etóxi)acetilo] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)péptido

Preparado como no Exemplo 5 e de acordo com "métodos sintéticos".

HPLC (método B6): RT = 32.67 minutos (100%)

LCMS: m/z = 1367.3 (MH_3^{3+}). Calculado para (M_4H^+): 4100.6

Exemplo 8



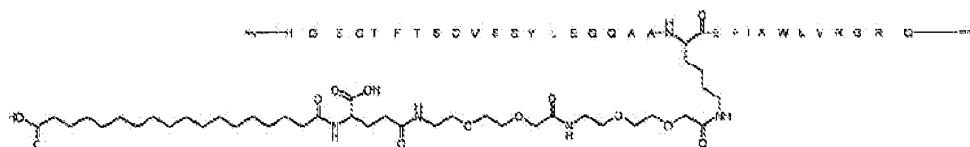
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanolamino)-3(S)-sulfopropionilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)péptido

Preparado como no Exemplo 5 e de acordo com "métodos sintéticos".

HPLC (método B6): RT = 32.04 minutos (100%)

LCMS: m/z = 1379.8 (MH_3^{3+}). Calculado para (M_4H^+): 4136.7

Exemplo 9



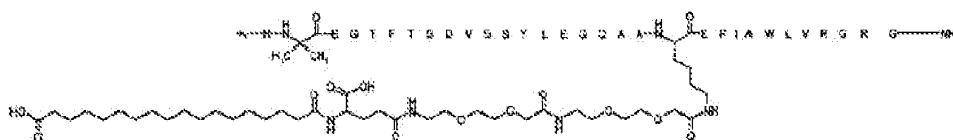
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Gly8,Arg34]GLP-1-(7-37)péptido.

[Gly8,Arg34]GLP-1(7-37) péptido que começa de 150 mg de resina de cloreto 2-clorotritilo (1.4 mmol/g) foi preparada por uma síntese peptídica de fase sólida Fmoc usando Apex396 de Advanced Chemtech. O resíduo Lys na posição 26 foi protegido como Lys(ivDde) enquanto as cadeias laterais funcionais para os outros aminoácidos eram protegidas com grupos de protecção de ácido lábil normal. O resíduo Lys foi desprotegido com 3% de hidrazina/3% de piperidina em NMP durante 1 hora. Então, as duas unidades de 8-amino-3,6-ácido dioxaoctanóico, ácido γ -glutâmico e ácido octadecanedióico foram acopladas à resina anexa ao péptido usando DIC/HOAt. O péptido foi por fim desprotegido e clivado da resina com TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2). O péptido foi isolado por LC-MS.

HPLC: eluído em 46% de acetonitrilo

MALDI: 4087 (MH₊)

Exemplo 10



N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-amida

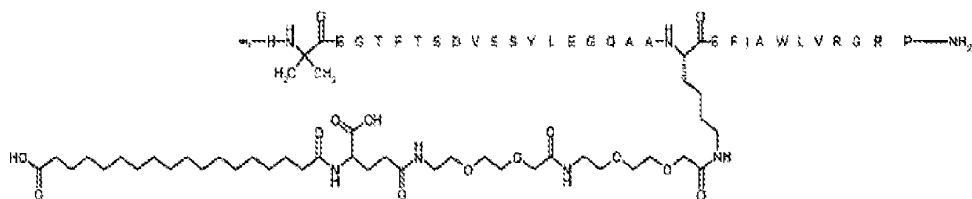
[Aib8,34]GLP-1(7-37) amida que começa de 200 mg de resina Tentagel RAM S (0.26 mmol/g) foi preparada por uma síntese peptídica de fase sólida Fmoc usando Apex396 de Advanced Chemtech. O resíduo Lys na posição 26 foi protegido como Lys(ivDde) enquanto as cadeias laterais funcionais para os outros aminoácidos foram protegidas com grupos de protecção de ácido lábil normal. O resíduo Lys foi desprotegido com 3% de hidrazina/3% de piperidina em NMP durante 1 hora. Então, as duas unidades de 8-amino-3,6-ácido dioxaoctanóico, ácido γ-glutâmico e ácido octadecanedióico foram acopladas à resina anexa ao péptido usando DIC/HOAt. O péptido foi por fim desprotegido e clivado da resina com TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2). O péptido foi isolado por

LC-MS.

HPLC: eluído em 49% acetonitrilo

MALDI: 4114(MH₊)

Exemplo 11



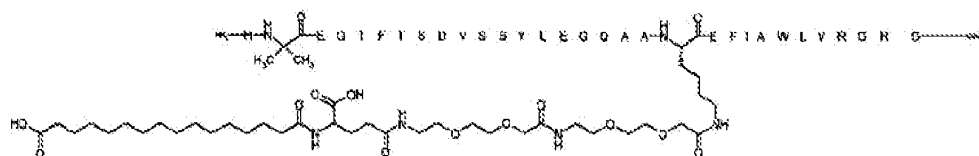
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴,Pro³⁷]GL P-1-(7-37)amida

O péptido foi preparado numa resina de amida Rink (0.70 mmol/g Novabiochem) e inclusive como no Exemplo 5 e de acordo com "métodos sintéticos".

HPLC (método B6): RT = 32.13 min (100%). (método A1): RT = 44.33 min (98.4%)

LCMS: m/z = 1385.3 (MH_3^{3+}). Calculado para (M_4H^+): 4153.8

Exemplo 12

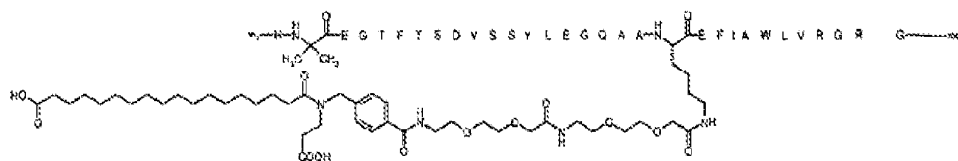


Aib⁸, Lys²⁶ (N- ϵ^{26} -{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(pentadecanoilamino) -4-carboxibutirilamino) etóxi) etóxi] acetilo)etóxi)etóxi) acetilo)}),Arg³⁴)GLP-1 H(7-37)-OH

HPLC (método B6): RT= 30.41 min

LCMS: m/z = 1362.9 (MH_3^{3+}) tem calculado para (M^+) = 4085.61

Exemplo 13



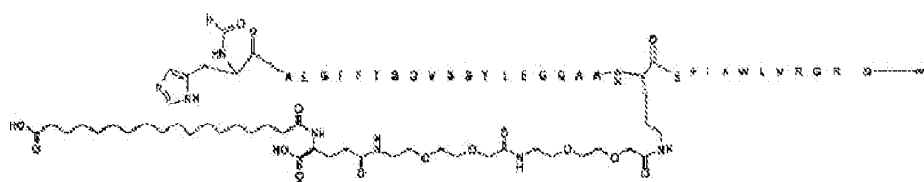
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-{[N-(2-carboxietilo)-N-(17-carboxiheptadecanoil)amino]metilo}benzoil)amino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi]acetilo][Aib8,Arg34]GLP-1 (7-37)

[Gly8,Arg34]GLP-1(7-37) péptido que começa de 150 mg de resina cloreto 2-clorotritilo (1.4 mmol/g) foi preparada por uma síntese peptídica de fase sólida Fmoc usando Apex396 de Advanced Chemtech. O resíduo Lys na posição 26 foi protegido como Lys(ivDde) enquanto as cadeias laterais funcionais para os outros aminoácidos foram protegidas com grupos de protecção de ácido lábil normal. O resíduo Lys foi desprotegido com 3% de hidrazina/3% de piperidina em NMP durante 1 hora. Então, as duas unidades de 8-amino-3,6-ácido dioxaoctanóico e 4{[(2-tert-butoxicarboniletilo)-(17-tert-butoxicarbonilo-heptadecanoil)-amino-metilo]-ácido benzóico foram acopladas à resina anexa ao péptido usando DIC/HOAt. O péptido foi por fim desprotegido e clivado da resina com TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2). O péptido foi isolado por LC-MS preparado.

HPLC: eluído em 52% acetonitrilo

MALDI: 4191 (MH₊)

Exemplo 14

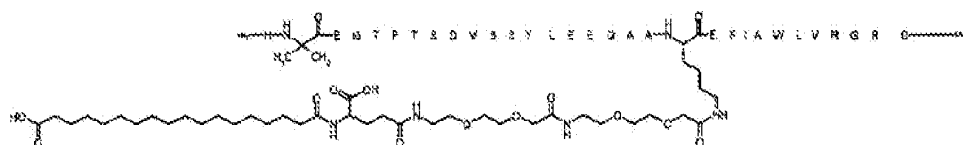


N- α^7 -formilo, N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi]acetilo] [Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido

HPLC (método B6): RT= 32,6 min

LCMS: m/z = 1377.3 (MH₃³⁺) tem calculado para (M⁺) = 4128.0

Exemplo 15



N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi]acetilo] [Aib8, Glu22, Arg34]GLP-1-(7-37)péptido.

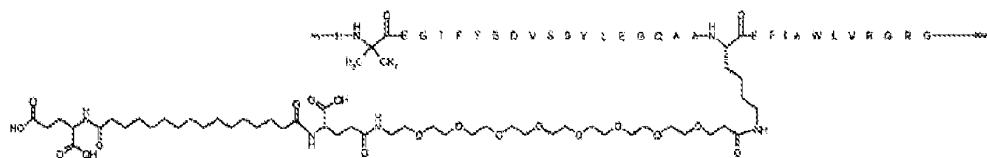
[Aib8,Glu22,Arg34]GLP-1(7-37) péptido que começa de 150 mg de resina Fmoc-Gly-Wang (0.66 mmol/g) foi preparada por uma síntese peptídica de fase sólida Fmoc usando Apex396 de Advanced Chemtech. O resíduo Lys na posição 26 foi protegido como Lys(Mtt) enquanto as cadeias laterais funcionais para os outros aminoácidos foram protegidas com grupos de protecção de ácido lábil normal. O resíduo Lys foi desprotegido com 2% de TFA/2% de TIS em DCM durante 4x5 minutos. As duas unidades de 8-amino-3,6-ácido dioxaoctanóico, ácido γ -glutâmico e éster tert-butilo ácido octadecanóico, foram acopladas à resina anexa ao péptido

usando DIC/HOAt. O péptido foi por fim desprotegido e clivado da resina com TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2). O péptido foi isolado por LC-MS.

HPLC: eluído em 50% acetonitrilo

MALDI: 4187 (MH₊)

Exemplo 16



N-ε²⁶{3-dicarboxipropilo)carbamoil)pentadecanoilamino)-(S)-4-carboxibutirilamino] etóxi) etóxi] etóxi} etóxi) etóxi]etóxi}etóxi)etóxi]propionil} [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)-péptido

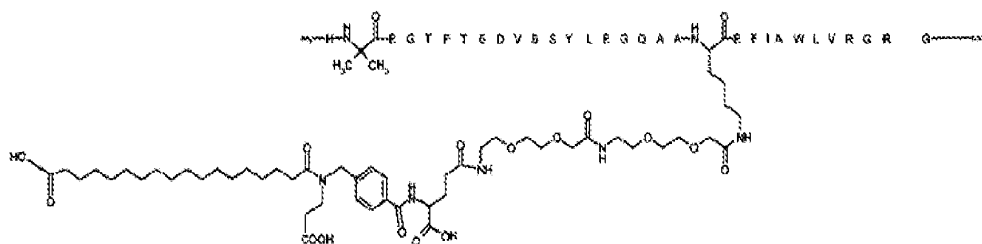
Método e análise

Preparado como no Exemplo 3 e de acordo com "métodos sintéticos".

HPLC (método B4): RT = 10.29 min (92%)

LCMS: m/z = 1450 (MH₃³⁺). Calculado para (MH₃³⁺): 1450

Exemplo 17



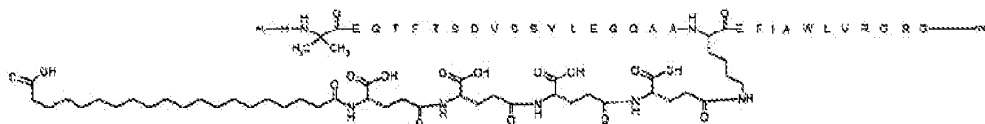
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-{[4-{[N-(2-carboxietilo)-N-(17-carboxiheptadecanoil)amino]metilo}benzoil)amino](4(S)-carboxibutirilamino)etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Aib8,Arg34]GLP-1(7-37)

[Aib8,Arg34]GLP-1(7-37) péptido que começa de 150 mg de resina Fmoc-Gly-Wang (0.66 mmol/g) foi preparada por uma síntese peptídica de fase sólida Fmoc usando Apex396 de Advanced Chemtech. O resíduo Lys na posição 26 foi protegido como Lys(Mtt) enquanto as cadeias laterais funcionais para os outros aminoácidos foram protegidas com grupos de protecção de ácido lábil normal. O resíduo Lys foi desprotegido com 2% de TFA/2% de TIS em DCM durante 4x5 minutos. As duas unidades de 8-amino-3,6-ácido dioxaoctanóico, ácido γ -glutâmico e 4{[(2-tert-butoxicarboniletilo)-(17-tert-butoxicarbonilo-heptadecanoil)-amino]-metilo}-ácido benzóico foram acopladas à resina anexa ao péptido usando DIC/HOAt. O péptido foi por fim desprotegido e clivado da resina com TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2). O péptido foi isolado por HPLC preparado.

HPLC: eluído em 51% acetonitrilo

MALDI: 4320 (MH₊)

Exemplo 18



N- ϵ^{26} -{ (S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino) butirilamino) butirilamino)butirilamino)butirilamino} [Aib8, Arg 34]GLP-1-(7-37)

O péptido foi sintetizado usando química Fmoc num Liberty Microwave Peptide Synthetizer (CEM Corporation). A síntese foi realizada numa resina Gly-Wang (Novabiochem) com uma carga de 0.66 mmol/g usando 4 vezes o excesso de aminoácidos e DIC/HOAt para acoplamento. A histidina N-terminal foi Boc-protégida e a lisina para ser modificada foi Mtt-protégida. Depois de síntese da estrutura peptídica, o grupo Mtt foi eliminado com 3% de TFA em DCM e a cadeia lateral foi construída nos protocolos de síntese peptídica normal usando Liberty. Na última fase, o diácido gorduroso foi agregado como um mono-t-butilester.

Depois de clivagem com TFA/TIS/água (95:2.5:2.5), o péptido foi dissolvido em 50% de acetonitrilo por adição de DIPEA e purificado num sistema Waters LC-MS usando uma coluna 10 μ m X-Terra Prep MS C18 executada à temperatura ambiente. Depois de 5 minutos em 30% CH₃CN, 0.08% TFA, 4 ml/min, a coluna foi eluída com um gradiente linear de 30 a 70% CH₃CN durante 40 minutos. As fracções contendo o composto desejado foram recolhidas e a concentração do péptido no eluato foi determinada por medição da absorção de UV em 280 nm assumindo coeficientes de extinção molares de 1280 e 3690 para tirosina e triptofano, respectivamente. A identidade e pureza foram confirmadas por MALDI. Depois da determinação de concentração, o eluato foi distribuído em frascos contendo a quantidade desejada e seca por centrifugação a vácuo.

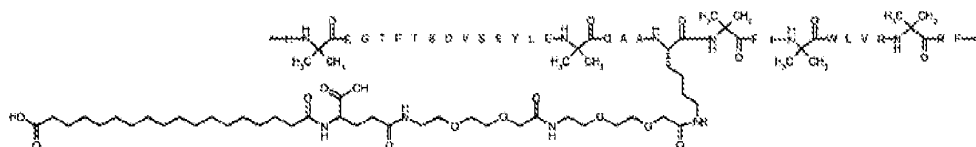
HPLC: eluído em 52% acetonitrilo

etóxi}etóxi}etóxi)etóxi}etóxi}etóxi)etóxi]propionilo}[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido.

LCMS*: m/z: = 1417 (MH₃³⁺), calculado para (MH₃³⁺) 1417

*HPLC (eluído em 0.5 ml/min em 42 °C por um gradiente linear de 5 ---->80% acetonitrilo, 85->10% água e 10% de uma solução de 1.0% de ácido trifluoracético durante 50 min. Detecção UV em 214 num Symmetry300, 5um, coluna de sílica 3.9 mm X 150 mm C-18.)método B4): Rt = 32.09 min (95 %)

Exemplo 21

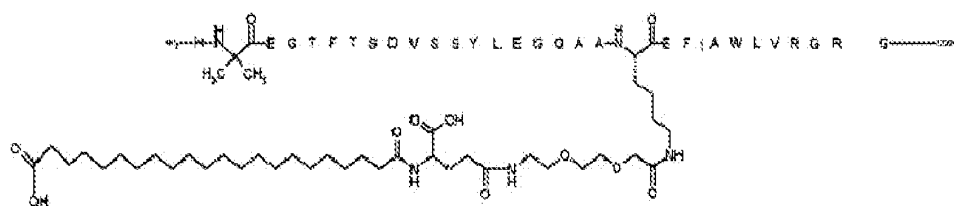


N-ε²⁶-{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)etóxi)etóxi]acetilo)etóxi)etóxi)acetilo)}-[Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷, Lys²⁶] GLP-1 (7-37) amida

HPLC (método B6): RT= 35.0 min

LCMS: m/z = 1394.0 (MH₃³⁺) tem calculado para (M⁺) = 4180.0

Exemplo 22



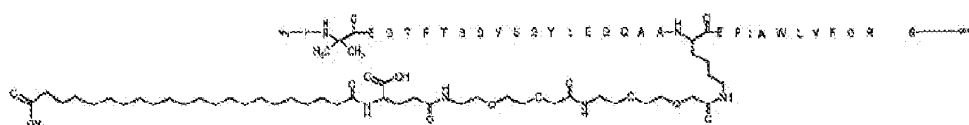
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-[4-(21-carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi]etóxi)acetilo] [Aib8; Arg34]GLP-1-(7-37)

Preparado usando o mesmo método como no Exemplo 19.

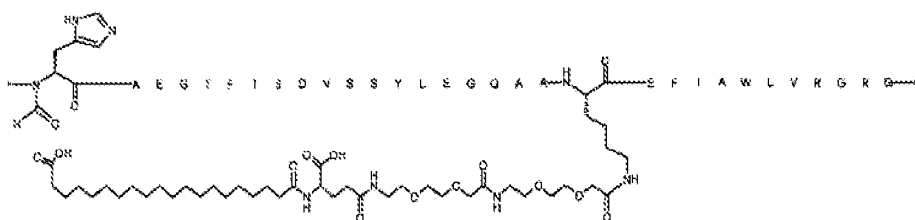
HPLC: eluído em 53.4% acetonitrilo

MALDI: 4025 (MH⁺)

Outros compostos descritos na presente aplicação presente incluem:

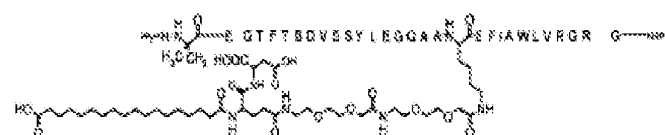
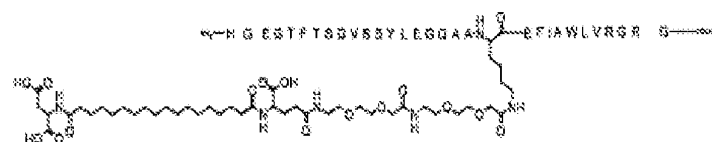
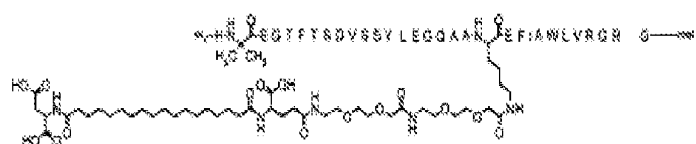
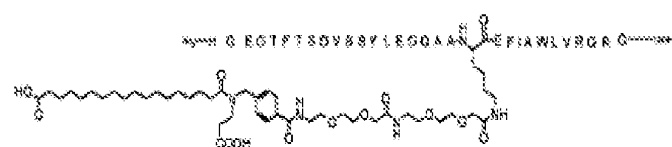
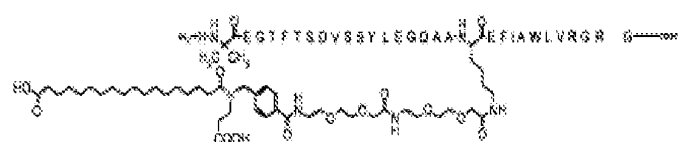
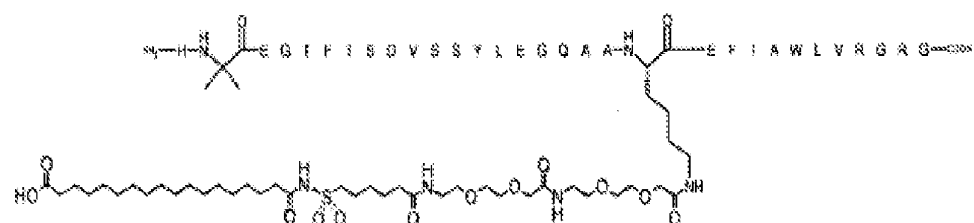
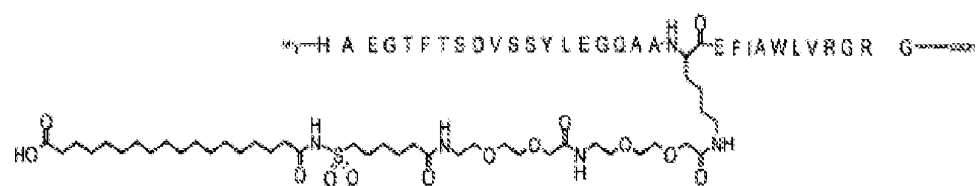


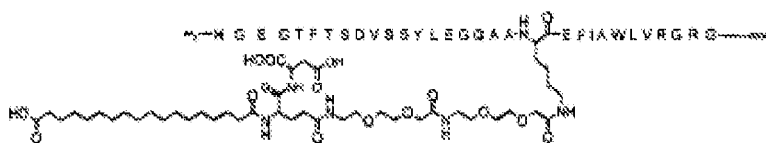
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi)acetilo] [Aib8,Arg34]GLP-1-(7-37)péptido.



N- α 1-formil-N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Arg34]GLP-1-(7-37)péptido.







Estudo farmacodinâmico usando ratos db/db

Num aspecto desta invenção, os agonistas GLP-1 têm uma duração de acção de pelo menos 24 horas depois de dosificação de 30 nmol/kg a ratos db/db.

A eficácia e duração da acção são medidas em ratos db/db.

Os ratos db/db machos são enviados de Taconic, Dinamarca com a idade de 8-10 semanas. A partir do tempo de chegada, os ratos são abrigados sob condições normais mas a 24 °C. Os ratos são mantidos 10 por gaiola até experimentação com livre acesso a alimentação normal (Altromin, Brogaarden APS., Dinamarca) e água corrente num dia normal: ciclo de luz (luz acesa às 6h da manhã). Os ratos são usados durante 1 experiência por semana durante 3 semanas. Depois disto, os ratos sofrem eutanásia.

Após um período de aclimatização de 1 semana, o açúcar no sangue é medido para amostragem do capilar da extremidade da cauda. Em resumo, 5 µl de sangue é recolhido em tubos capilares de vidro heparinizado e imediatamente suspensos em 250 µl de solução tamponada de EBIO (Eppendorf; Alemanha) num tubo Eppendorf 1.5 ml. A concentração do açúcar no sangue é medida pelo método de oxidase de glucose no analisador EBIO Plus Auto(Eppendorf, Alemanha).

O corte de valor para glucose no sangue é 10 mM. Ao avaliar os ratos, é essencial, que todos os 42 ratos introduzidos na experiência tenham valores de glucose no sangue acima dos 10 mM, mas também que a variação dos inter-ratos seja pequena. Consequentemente, se muitos ratos não forem seriamente diabéticos, considerando que alguns são, o início das experiências deveria ser posposta uma semana e feitas novas medições de glucose no sangue basais.

Baseado nos valores de glucose no sangue basais, os ratos são destinados para 7 grupos de n=6 com o grupo de alinhamento que significam os valores de glucose no sangue.

No dia do teste de glucose no sangue basal, os valores matutinos são constatados como descrito anteriormente e o peso corporal basal de cada rato é constatado. Um tempo 0, o composto é doseado subcutaneamente na zona da nuca (volume da dose aprox. 300 µl/50 g rato). Os valores de glucose no sangue são seguidos até 48 horas (tempo 1, 3, 6, 24 e 48 h) e o peso corporal terminal é constatado.

Todos os dados são introduzidos no GrafPad Prism onde são calculados os pesos médios de glucose no sangue e corpo delta.

Um aspecto desta invenção é preparar análogos GLP-1/derivados com plasma estendido semi-vivos que são adequados para uma única administração semanal. As propriedades cinéticas do fármaco podem ser avaliadas em mini porcos ou porcos domésticos como descrito em baixo.

Seleção farmacocinética uma vez por semana de análogos GLP-1

A selecção farmacocinética de análogos GLP-1 para identificação de candidatos uma vez por semana foi realizada em candidatos que de acordo com o plano das selecções de projecto, foram mostradas para serem suficientemente potentes em relação à redução de glucose potencial num modelo de rato diabético (ratos db/db) e posteriormente tenha um tempo de duração de 48 horas ou mais no modelo de rato db/db.

Seleção primária

A primeira parte da selecção farmacocinética consistiu da administração de uma dose individual subcutânea de 2 nmol/kg para três mini porcos pesando 8-12 kg. As amostras de sangue foram extraídas de cada animal em pré-dose, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós a injeção. Todas as amostras de sangue foram estabilizadas com um tampão de estabilização especial que consiste em: EDTA (disódio) 0.18 M, Aprotinin 15000 KIE/ml, Val-Pyr 0.30 mM, pH ajustado para 7.4 para evitar a degradação enzimática dos análogos GLP-1. O plasma foi recolhido de cada amostra de sangue estabilizada por centrifugação (4 °C, 10 minutos, 1270 G (4000 rpm), e analisada para o conteúdo do análogo GLP-1 através de ensaios ELISA. Três ensaios ELISA diferentes foram usados para a análise de plasma: O "Ensaio Total" que usa a combinação de anticorpos F1/Ra2135 que detecta a molécula 7-37GLP-1 N-terminalmente intacta e a molécula 9-37GLP-1 N-terminal enzimaticamente degradada com um limite de detecção (LOD) de 35 pM e uma margem dinâmica analítica de 35-30000 pM. O "Ensaio intacto" usa a combinação de anticorpos F1/Mab26.1. Este ensaio apenas detectou a molécula 7-37GLP-1 N-terminalmente intacta. O LOD era 35 pM e uma margem dinâmica analítica de 35-30000 pM. O "Ensaio intacto-Aib" usou a combinação de anticorpos F1/GLP162-3F15. Este ensaio detectou o Aib N-terminal estabilizado da molécula GLP-1 que permite a

detecção de análogos GLP-1 estabilizados. O LOD foi de 45 pM e a margem dinâmica analítica 45-30000 pM.

Todos os perfis de tempo de concentração de plasma foram analisados farmacocineticamente por uma análise não-comportamental. Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram calculados se os dados foram permitidos: t_{max} , C_{max} , AUC, AUC/dose, AUC_{Extrapol} , λ_z , $t_{1/2}$, CL/F, V_z/F e MRT.

Seleção secundária

Uma segunda parte da seleção farmacocinética foi conduzida naqueles compostos com um vida média de terminal inicial de 60-70 horas ou mais. Esta seleção era consistida de uma dose individual de administração intravenosa e subcutânea de 2 nmol/kg para seis mini porcos para cada forma de administração. A amostra de sangue programada foi estendida de 0-120 horas para 0-432 e 0-504 horas depois da administração intravenosa e subcutânea, respectivamente. Isto foi feito para aumentar a precisão e exactidão das estimativas de parâmetro farmacocinéticas, especialmente a vida média terminal, AUC e a clareza de parâmetros derivados e volume de distribuição, e para calcular a biodisponibilidade após a administração subcutânea.

Ensaio GLP-1 (AIB8-INTACT)

O ensaio foi um ensaio em duas partes com incubação simultânea do analite com receptor e anticorpo detector. Um preparado para usar substrato quimiluminiscente foi usado para maximizar o sinal. O ensaio não reconhece o endógeno GLP-1 (7-37) nem o DPPIV clivado GLP-1 (9-37).

Plasma de referência para ensaios de GLP-1

0-plasma foi obtido a partir do agrupado de plasma EDTA sem Valina Pirrolidida e Aprotinina de animais em jejum. O agrupado plasma EDTA foi incubado a 37 °C durante 4 horas para eliminar traços de GLP-1 e após a incubação de Valina Pirrolidida e Aprotinina foram adicionadas.

Soluções Tampão

Solução tampão de revestimento

O PBS foi usado como solução tampão de revestimento: 10mM de fosfato sódico e 145 mM de cloreto de sódio ajustado ao pH 7.4.

Solução tampão de lavagem

PBS com 0.05% (v/v) Tween 20

Solução Tampão de ensaio

PBS com 0.05% (v/v) Tween 20, 10 g/L BSA e 10 mg/L anti-TNP.

Solução tampão streptavidina

Solução tampão de lavagem com um 0.5 M NaCl adicional.

Substrato

Preparado para usar substrato SuperSignal Elisa Femto (Pierce, cat.no. 37075).

Padrões

Os padrões foram obtidos a partir de 25 μ M de uma solução concentrada de 0113-0000-0217. O péptido foi seriamente diluído em plasma de referência para fazer padrões com concentrações finais de 30000-10000-3333-1111-370-123-41 e 0 pM. Os padrões foram armazenados em tubos Micronic em 100 μ L de alíquotas a -20 °C.

Procedimento de ensaio

2000 Micro-placas Crystal (negro) foram revestidas com anticorpos monoclonais GLPb1-7F1, 100 μ L de 5 μ g/mL em PBS durante a noite a 4 °C.

As placas foram lavadas 5 vezes com solução tampão de lavagem num lavador de placa automatizada (SkanWasher; Skatron) e deixadas a descansar durante pelo menos 30 minutos com solução tampão de lavagem para bloquear os restantes locais.

20 μ L da amostra ou padrão foi adicionada a cada cavidade em duplicado imediatamente seguido de 100 μ L GLP162-3F15 com biotina, 1 μ g/mL em solução tampão de ensaio. As placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente num agitador de placa seguido por 5 ciclos de lavagem como descrito anteriormente.

100 µL de solução streptavidina-peroxidase (KPL, código 14-30-00, 1:20000 em solução tampão streptavidina) foi adicionada a cada cavidade e incubada durante 1 hora à temperatura ambiente num agitador de placa. As placas foram lavadas como anteriormente mencionado e após esvaziar 100 µL de SuperSignal femto foi agregada. As placas foram colocadas num agitador durante 1 minuto e medidas no Orion Luminometer (Berthold). Os dados foram transferidos para MultiCalc e curvas padrão calculados usando o método 4PL pesado. As concentrações de amostra foram calculadas a partir da curva padrão.

ENSAIO GLP-1 (TOTAL)

O ensaio foi um ensaio em duas partes com incubação simultânea do analite com anticorpo receptor e detector. O ensaio reconhece GLP-1 clivado N-terminalmente até GLP-1 (12-37).

Soluções Tampão

Solução tampão de revestimento

O PBS foi usado como solução tampão de revestimento: 10mM de fosfato sódico e 145 mM de cloreto de sódio ajustado a pH 7.4.

Solução tampão de lavagem

PBS com 0.05% (v/v) Tween 20

Solução tampão de ensaio

PBS com 0.05% (v/v) Tween 20, 10 g/L BSA e 10 mg/L anti-TNP.

Solução tampão de streptavidina

Solução de tampão de lavagem com 0.5 M NaCl adicional.

Substrato

Substrato rápido TMB (KemEnTec código 4380A)

Solução tampão inibidor

4 M H_3PO_4

Padrões

Os padrões foram obtidos a partir de 25 μM de solução concentrada de 0113-0000-0217. O péptido foi seriamente diluído em plasma de referência para fazer padrões com concentrações finais de 30000-10000-3333-1111-370-123-41 e 0 pM. Os padrões foram armazenados em tubos Micronic em 100 μL de partes alíquotas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Procedimento de ensaio

As placas de microtitulação Maxisorp (NUNC) foram revestidas com anticorpo monoclonal GLPb1-7F1, 100 µL de 5 µg/mL em PBS durante a noite a 4 °C.

As placas foram lavadas 5 vezes com solução tampão de lavagem num lavador de placa automatizada (SkanWasher, Skatron) e permitiu permanecer durante pelo menos 30 minutos com solução tampão de lavagem para bloquear os restantes sítios.

20 µL de amostra ou padrão foi adicionado a cada cavidade imediatamente seguido de 100 µL Ra2135 biotinilado, 1 µg/mL em solução tampão de ensaio. As placas foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente num agitador de placa seguido de 5 ciclos de lavagem, como anteriormente descrito.

100 µL de solução de streptavidina-peroxidase (Amersham Biosciences código RPN4401V, 1:8000 em solução tampão de ensaio) foi adicionada a cada cavidade e incubada durante 1 hora à temperatura ambiente num agitador de placa. As placas foram lavadas como anteriormente descrito e após esvaziar 100 µL de TMB foi adicionado e depois de 5 minutos, parado com 100 µL H_3PO_4 .

As placas foram medidas no Victor Multilabel Reader (Wallac). Os dados foram transferidos para MultiCalc e curvas padrão calculadas usando o método 4PL pesado. As concentrações de amostra foram calculadas a partir da curva padrão.

Os procedimentos experimentais em vida, análise de plasma e análise farmacocinética foram idênticos àqueles descritos sob a selecção primária.

Fórmula farmacêutica:

Um composto da invenção pode ser formulada como:

Composto de exemplo 4	6,25 mg/ml
Propilenoglicol	14,0 mg/ml
Fenol	5.5 mg/ml

Solução Tampão de Fosfato pH 8.15

Opcionalmente, o composto é tratado com calor e/ou base antes da formulação como descrito em W02006/051110.

Lisboa, 02 de Novembro de 2010

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o EPO nega qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- WO 9629342 A
- WO 9808871 A
- WO 9943708 A
- WO 0034331 A
- WO 0069911 A
- WO 0246227 A
- EP 511600 A, Ebashi
- WO 200605111 0 A

Literatura de documentos não-patente citada na descrição

- **Siegel et al.** *Regul. Pept.*, 1999, vol. 79, 93-102
- **Mentlein et al.** *Eur. J. Biochem.*, 1993, vol. 214, 829-35
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 1995
- **Williams; PoliL J.** *Parenteral Sci. Technol.*, 1984, vol. 38, 48-59
- **Masters.** *Spray-Drying Handbook.* Longman Scientific and Technical, 1991, 491-676
- **Broadhead et al.** *Drug Devel. Ind. Pharm.*, 1992, vol. 18, 1169-1206
- **Mumenthaler et al.** *Pharm. Res.*, 1994, vol. 11, 12-20

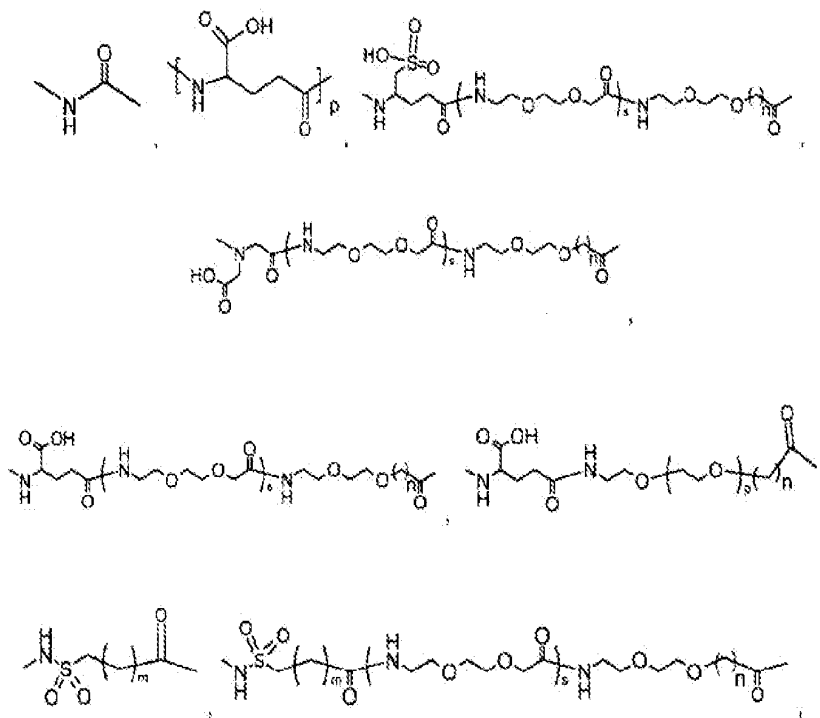
- **Carpenter; Crowe.** *Cryobiology*, 1988, vol. 25, 459-470
- **Roser.** *Biopharm.*, 1991, vol. 4, 47-53
- Handbook of Pharmaceutical Controlled Release. Marcel Dekker, 2000
- Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery. Marcel Dekker, 2000, vol. 99
- **Yu J; Chien YW.** Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. *Crit Rev Ther Drug Carr Sys*, 1997, vol. 14 (4), 395-453
- **Edwards DA; Ben-Jebria A; Langer R.** Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol*, 1998, vol. 84 (2), 379-385
- **Edwards DA; Ben-Jebria A; Langer R.** represents a measure of the median value of an aerodynamic particle size distribution. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol*, 1998, vol. 84 (2), 379-385
- **Edwards DA; Ben-Jebria A; Langer R.** Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol*, 1998, vol. 84 (2), 379-385
- **Edwards DA; Ben-Jebria A; Langer A.** Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J Appl Physiol*, 1998, vol. 84 (2), 379-385
- **Ahern. T.J.; Manning M.C.** Stability of Protein Pharmaceuticals. Plenum Press, 1992
- **W.R. Sampson.** *J. Pep. Sci.*, 1999, vol. 5, 403

Reivindicações

1. Um análogo GLP-1 com pelo menos um resíduo aminoácido não-protogénico nas posições 7 e/ou 8 relativamente à sequência GLP-1 (7-37), que é acilado com uma parte B-U' ao resíduo de lisina na posição 26, caracterizado por

(i) B-U' compreende pelo menos dois grupos acídicos, um dos quais é anexo terminalmente;

(ii) U' é seleccionado de

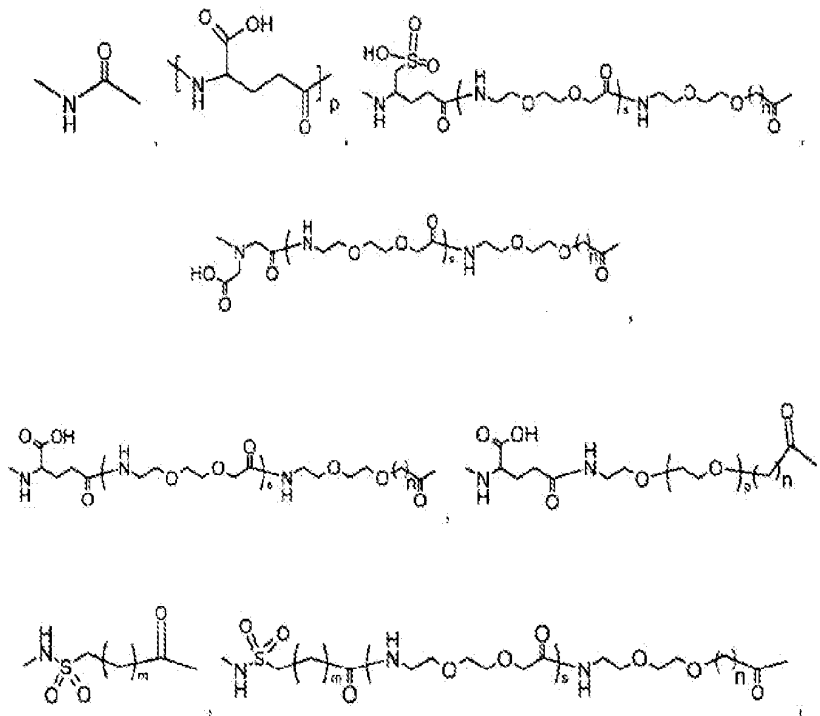


Reivindicações

1. Um análogo GLP-1 com pelo menos um resíduo aminoácido não-protogénico nas posições 7 e/ou 8 relativamente à sequência GLP-1 (7-37), que é acilado com uma parte B-U' ao resíduo de lisina na posição 26, caracterizado por

(i) B-U' compreende pelo menos dois grupos acídicos, um dos quais é anexo terminalmente;

(ii) U' é selecionado de





e

em que

m é 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6,

n é 1, 2, ou 3,

s é 0, 1, 2, ou 3,

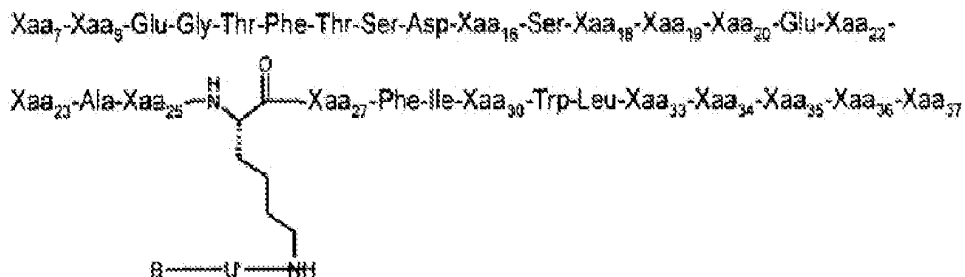
t é 0, 1, 2, 3, ou 4,

p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ou 23; e (iii) B é um grupo ácido seleccionado de



em que l é 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20.

2. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 1, o qual é um composto de fórmula I (SEQ ID N°. 2):



Fórmula I

em que

Xaa₇ é L-histidina, imidazopropionil, α-hidróxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidróxi-histidina, homohistidina, N^α-acetilo-histidina, N^α-formilo-histidina, α-fluorometilo-histidina, α-metilo-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina ou 4-piridilalanina;

Xaa₈ é Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil);

Xaa₁₆ é Val ou Leu;

Xaa₁₈ é Ser, Lys ou Arg;

Xaa₁₉ é Tyr ou Gln;

Xaa₂₀ é Leu ou Met;

Xaa₂₂ é Gly, Glu ou Aib;

Xaa₂₃ é Gln, Glu, Lys ou Arg;

Xaa₂₅ é Ala ou Val;

Xaa₂₇ é Glu ou Leu;

Xaa₃₀ é Ala, Glu ou Arg;

Xaa₃₃ é Val ou Lys;

Xaa₃₄ é Lys, Glu, Asn ou Arg;

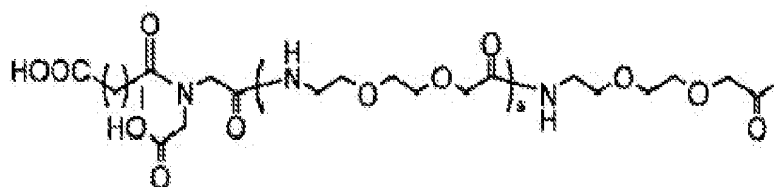
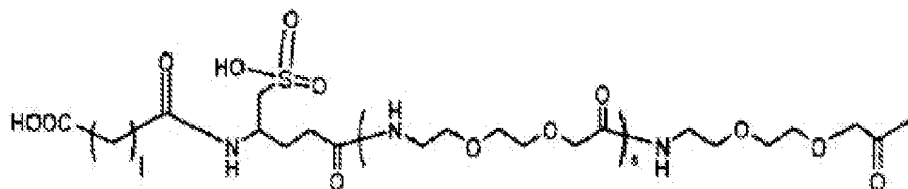
Xaa₃₅ é Gly ou Aib;

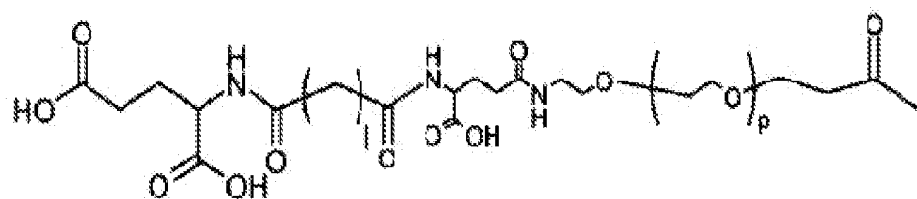
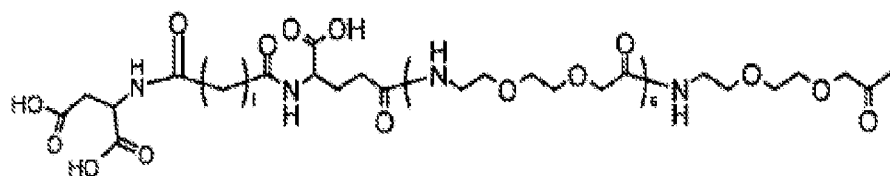
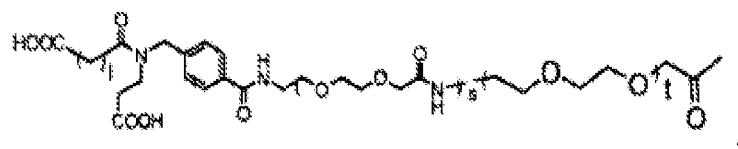
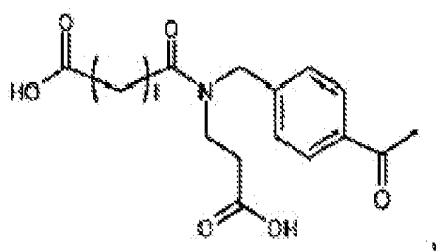
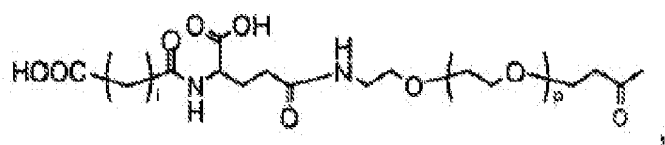
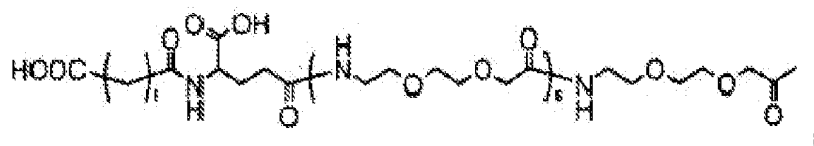
Xaa₃₆ é Arg, Gly ou Lys, ou é ausente;

Xaa₃₇ é Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, ou é ausente.

3. Um análogo GLP-1 de acordo com as reivindicações 1-2, em que m é 2, 3, 4, ou 5; n é 1 ou 2; s é 0, 1, ou 2; t é 0, 1, 2, ou 3; p é 1, 2, 3, 4, 7, 11, ou 23.

4. Um análogo GLP-1 de acordo com as reivindicações 1-3 caracterizado por B-U' ser





em que l é 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20,

p é 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12,

s é 0, 1, ou 2,

t é 0 ou 1,

m é 2, 3, ou 4.

5. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 4, em que l é 14, 15, 16, 17, ou 18; p é 1, 2, 3, 4, ou 11; s é 0, 1, ou 2; t é 0 ou 1.

6. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que s é 1.

7. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que l é 16.

8. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que p é 3 ou 4.

9. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que n é 1.

10. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-9, em que Xaa₇ é His ou desamino-histidina; Xaa₈ é Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, ou Aib; Xaa₁₆ é Val; Xaa₁₈ é Ser; Xaa₁₉ é Tyr; Xaa₂₀ é Leu; Xaa₂₂ é Gly, Glu, ou Aib; Xaa₂₃ é Gln ou Glu; Xaa₂₅ é Ala; Xaa₂₇ é Glu; Xaa₃₀ é Ala ou Glu; Xaa₃₃ é Val; Xaa₃₄ é Lys ou Arg; Xaa₃₅ é Gly ou Aib; Xaa₃₆ é Arg ou Lys; Xaa₃₇ é Gly, amida, ou ausente.

11. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por Xaa₇ é His; Xaa₈ é Gly ou Aib; Xaa₁₆ é Val; Xaa₁₈ é Ser; Xaa₁₉ é Tyr; Xaa₂₀ é Leu; Xaa₂₂ é Glu ou Aib; Xaa₂₃ é Gln; Xaa₂₅ é Ala; Xaa₂₇ é Glu; Xaa₃₀ é Ala; Xaa₃₃ é Val; Xaa₃₄ é Lys ou Arg; Xaa₃₅ é Gly ou Aib; Xaa₃₆ é Arg; Xaa₃₇ é Gly.

12. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, em que o dito análogo GLP-1 compreende uma modificação do N-terminal L-histidina na posição 7 da sequência GLP-1 (7-37).

13. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 12, em que o dito análogo GLP-1 compreende imidazopropionil⁷, α -hidroxihistidina⁷ ou N-metilo-histidina⁷, D-histidina⁷, desamino-histidina⁷, 2-amino-histidina⁷, β -hidroxihistidina⁷, homohistidina⁷, N ^{α} -acetil-histidina⁷, α -fluorometil-histidina⁷, α -metil-histidina⁷, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina⁷, ou 4-piridilalanina⁷.

14. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, em que o dito análogo GLP-1 compreende uma substituição do L-alanina na posição 8 da sequência GLP-1 (7-37) para outro resíduo aminoácido.

15. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 14, em que o dito análogo GLP-1 compreende Aib⁸, Gli⁸, Val⁸, Ile⁸, Leu⁸, Ser⁸, Thr⁸, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil).

16. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 15, em que o dito análogo GLP-1 compreende Aib⁸.

17. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende não mais que quinze resíduos de aminoácidos que foram alterados, adicionados ou eliminados como comparado com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

18. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 17, em que não mais que dez resíduos de aminoácidos foram alterados, adicionados ou eliminados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

19. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 18, em que não mais que seis resíduos de aminoácidos foram alterados, adicionados ou eliminados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

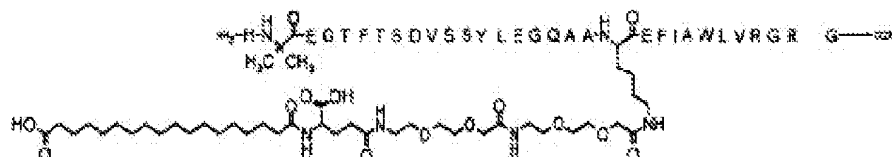
20. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende não mais que 3 resíduos de aminoácidos, os quais não são codificados pelo código genético.

21. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende apenas um resíduo de lisina.

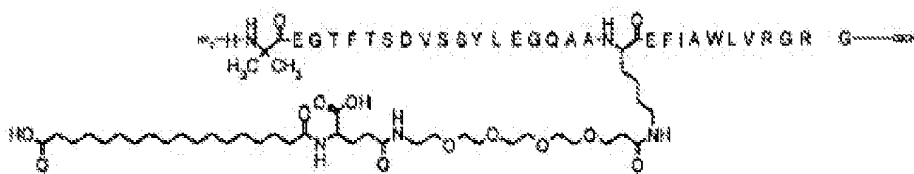
22. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que é Aib⁸, Arg³⁴-GLP-1(7-37),

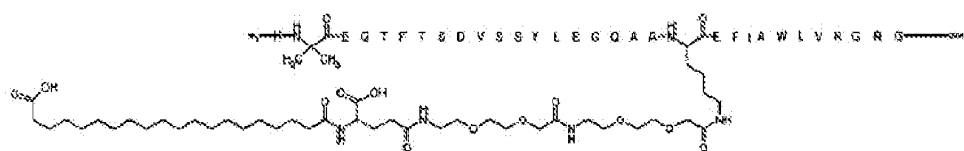
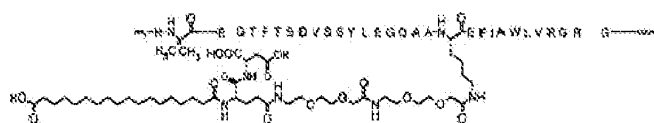
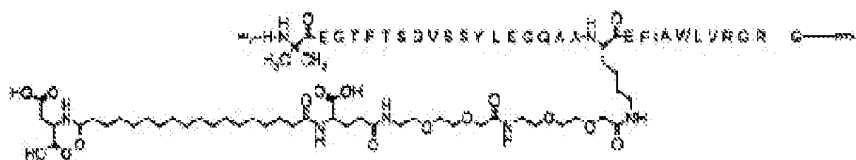
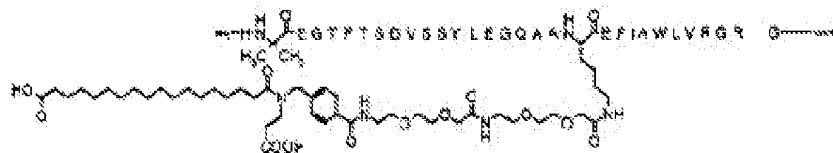
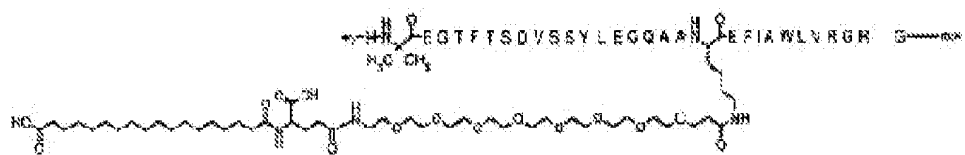
Aib^{8,22}, Arg³⁴-GLP-1(7-37), [3-(4-Imidazolilo)Propionilo⁷, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido, Aib⁸, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1(7-37), ou Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1(7-37)amida; todos os quais são substituídos por B-U' na posição 26.

23. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, o qual é seleccionado de

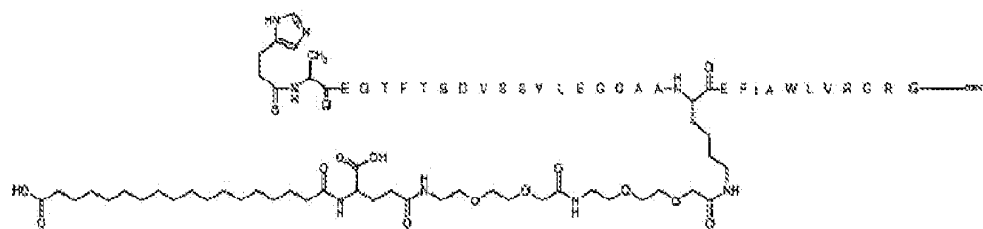


N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,

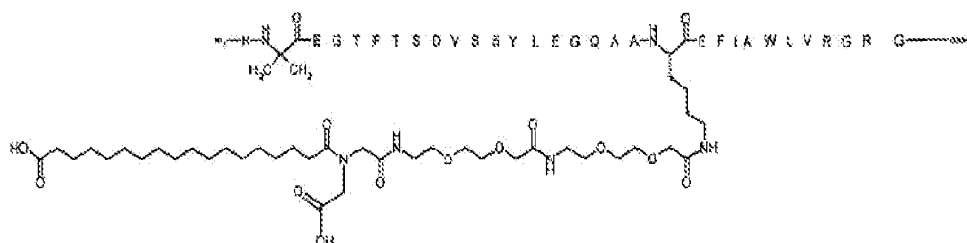




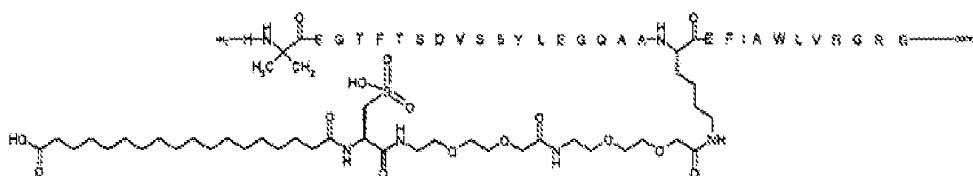
N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



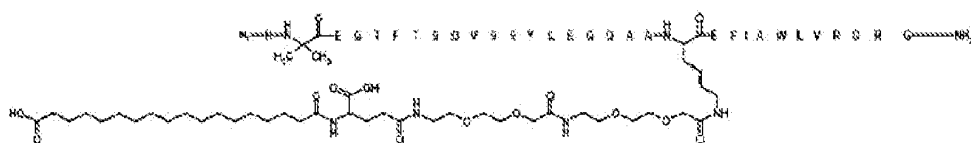
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [3-(4-Imidazolilo)Propionilo⁷,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



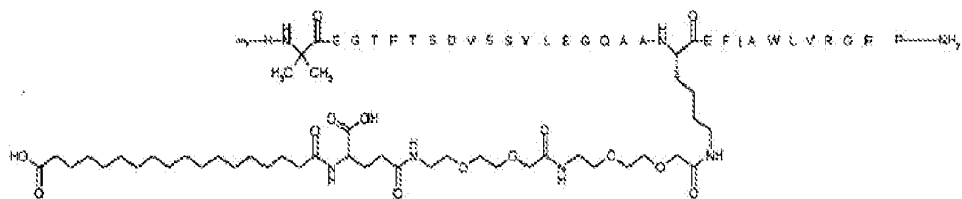
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-(carboximetiloamino)acetilamino]etóxi) etóxi] acetilamino) etóxi]etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



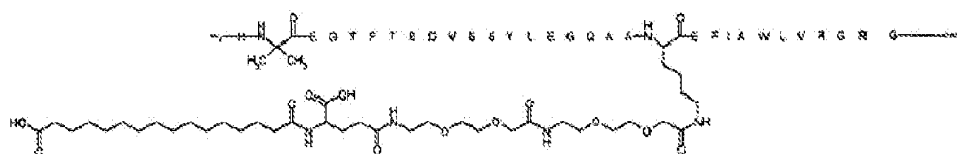
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-3(S)-sulfopropionilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



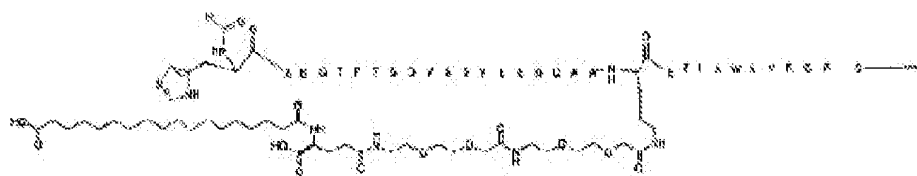
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-amida,



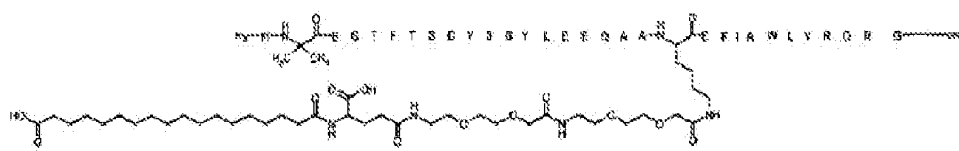
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴, Pro³⁷]GLP-1-(7-37) amida,



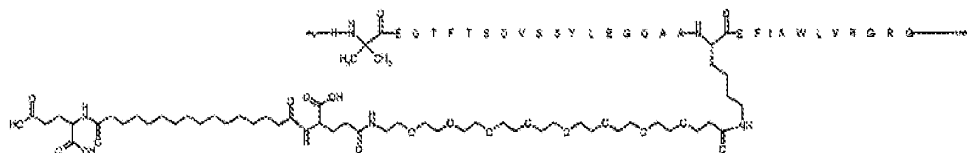
Aib⁸, Lys²⁶(N- ϵ^{26} -{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(pentadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)etóxi)etóxi]acetilo)etóxi) etóxi) acetil)}) , Arg³⁴) GLP-1 H(7-37)-OH,



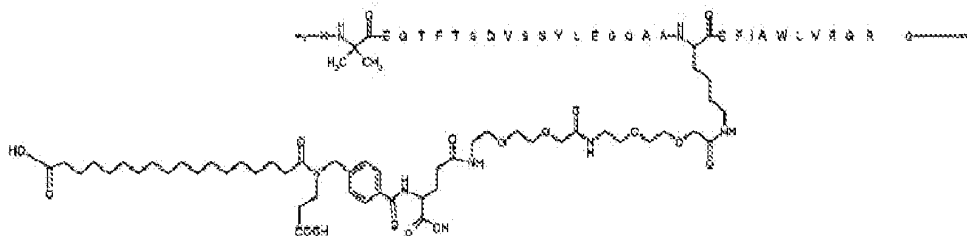
N- α^7 -formilo, N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido,



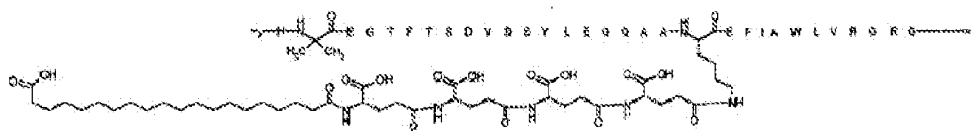
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Glu²², Arg³⁴] GLP-1-(7-37) péptido,



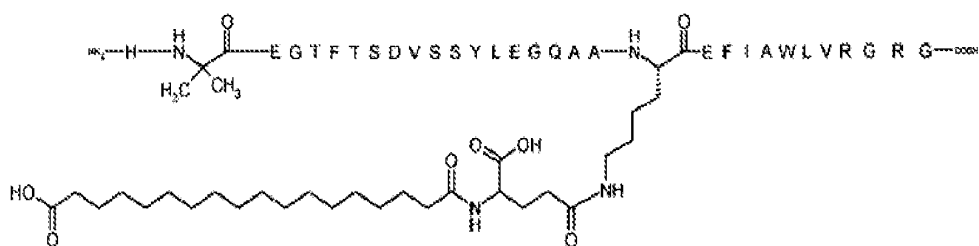
N- ϵ^{26} -{3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-[4-(15-(N-(S)-1,3-dicarboxipropilo)carbamoil)pentadecanoilamino)-(S)-4-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]etóxi}etóxi)etóxi]etóxi} etóxi)etóxi]propionil} [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1-(7-37)-péptido,



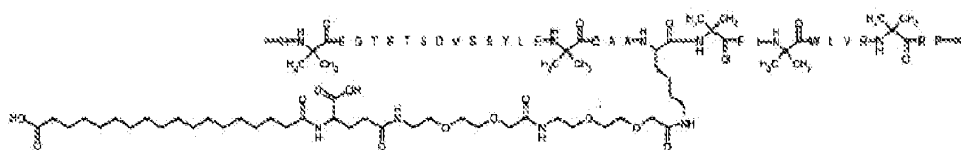
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-{[N-(2-carboxietilo)-N-(17-carboxiheptadecanoil)amino]metilo}benzoil)amino](4(S)-carboxibutirilamino)etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1(7-37),



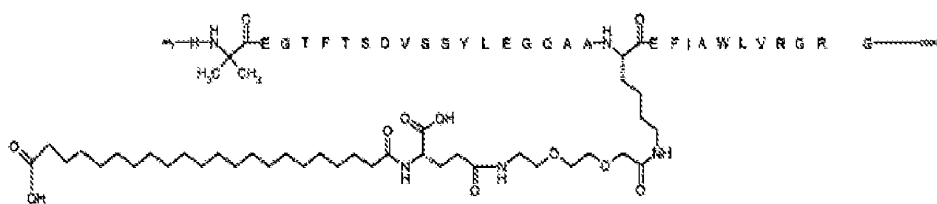
N- ϵ^{26} -{ (S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino) butirilamino) butirilamino)butirilamino)butirilamino} [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1-(7-37),



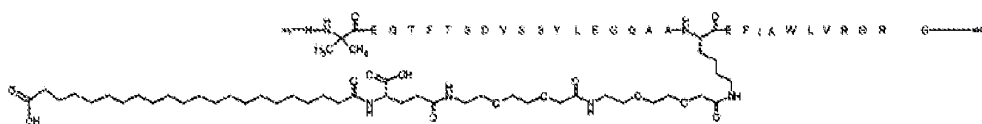
N- ϵ^{26} -4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilo-
[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido,



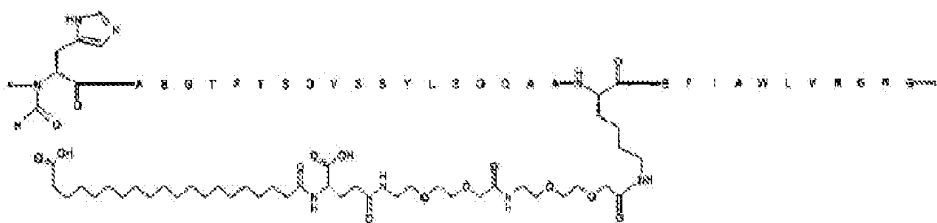
N- ϵ^{26} -{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino) etóxi) etóxi] acetilo) etóxi) etóxi)acetilo)}-[Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷, Lys²⁶] GLP-1 (7-37), amida



N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-[4-(21-Carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi]etóxi)acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37),



N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



e

N- α 1-formilo-N- ϵ ²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo][Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido.

24. Um método para aumentar o tempo de acção num doente de um análogo GLP-1 para mais de aproximadamente 40 horas, caracterizado por modificar pelo menos um dos resíduos de aminoácidos na posição 7 e 8 de um péptido GLP-1 (7-37) ou um análogo do mesmo, e acilando o dito análogo GLP-1 com uma parte B-U'- como descrito em qualquer uma das reivindicações precedentes no resíduo de lisina na posição 26 do dito análogo GLP-1.

25. Uma composição farmacêutica que compreende um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

26. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25, a qual é adequada para administração parenteral.

27. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento.

28. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância diminuída à glicose, diabetes tipo 1, obesidade, hipertensão, síndrome X, dislipidemia, distúrbios cognitivos, aterosclerose, enfarte do miocárdio, cardiopatía coronária e outros distúrbios cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome do intestino irritável, dispepsia e úlceras gástricas.

29. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para atrasar ou prevenir a progressão na diabetes tipo 2.

30. Uso de um composto de acordo com qualquer p as reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para diminuir a ingestão de alimentos, diminuir apoptose célula β , aumentar a função e massa da célula β , e/ou para restaurar a sensibilidade da glucose às células β .

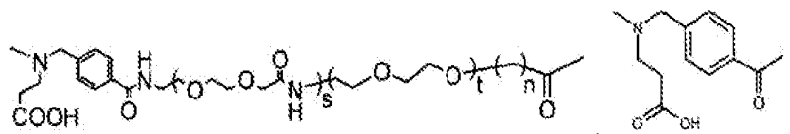
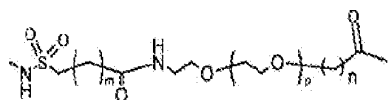
31. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para uso como um medicamento.

32. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para uso no tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância diminuída à glicose, diabetes tipo 1, obesidade, hipertensão, síndrome X, dislipidemia, distúrbios cognitivos, aterosclerose, enfarte do miocárdio, cardiopatía coronária e outros distúrbios cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome do intestino irritável, dispepsia e úlceras gástricas.

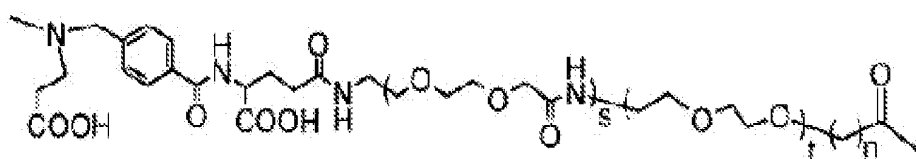
33. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para usar para atrasar ou prevenir a progressão em diabetes tipo 2.

34. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para diminuir a ingestão de alimentos, diminuir apoptose célula β , aumentar a função e massa da célula β , e/ou para restaurar a sensibilidade da glucose às células β .

Lisboa, 02 de Novembro de 2010



e



em que

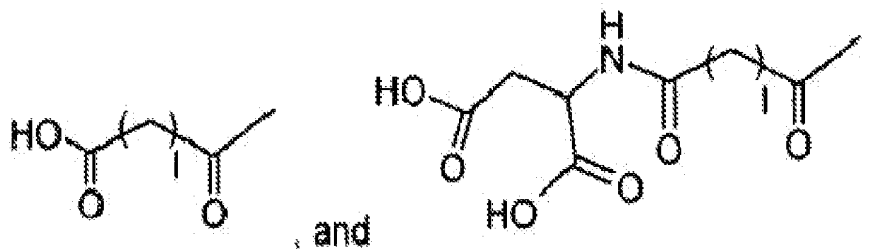
m é 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6,

n é 1, 2, ou 3,

s é 0, 1, 2, ou 3,

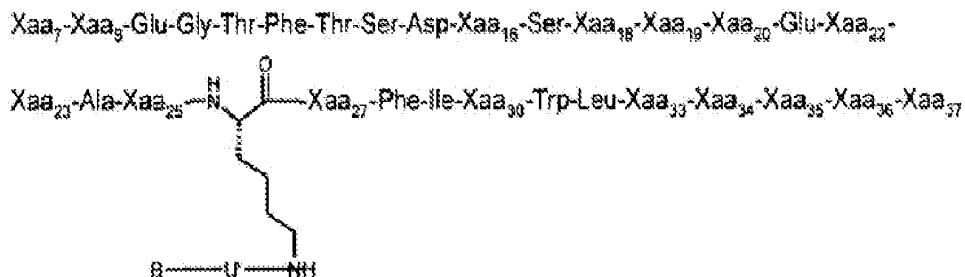
t é 0, 1, 2, 3, ou 4,

p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ou 23; e (iii) B é um grupo ácido seleccionado de



em que l é 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20.

2. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 1, o qual é um composto de fórmula I (SEQ ID N°. 2):



Formula I

em que

Xaa₇ é L-histidina, imidazopropionil, α-hidróxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidróxi-histidina, homohistidina, N^α-acetilo-histidina, N^α-formilo-histidina, α-fluorometilo-histidina, α-metilo-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina ou 4-piridilalanina;

Xaa₈ é Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil);

Xaa₁₆ é Val ou Leu;

Xaa₁₈ é Ser, Lys ou Arg;

Xaa₁₉ é Tyr ou Gln;

Xaa₂₀ é Leu ou Met;

Xaa₂₂ é Gly, Glu ou Aib;

Xaa₂₃ é Gln, Glu, Lys ou Arg;

Xaa₂₅ é Ala ou Val;

Xaa₂₇ é Glu ou Leu;

Xaa₃₀ é Ala, Glu ou Arg;

Xaa₃₃ é Val ou Lys;

Xaa₃₄ é Lys, Glu, Asn ou Arg;

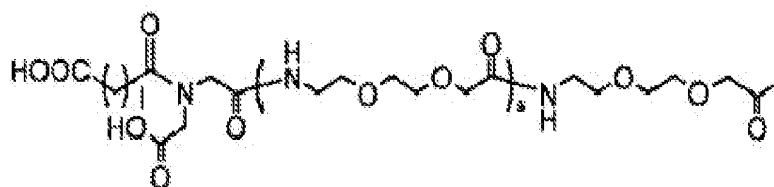
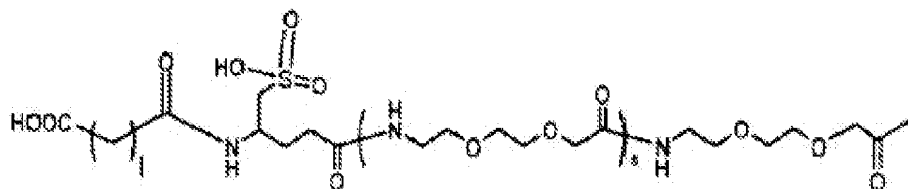
Xaa₃₅ é Gly ou Aib;

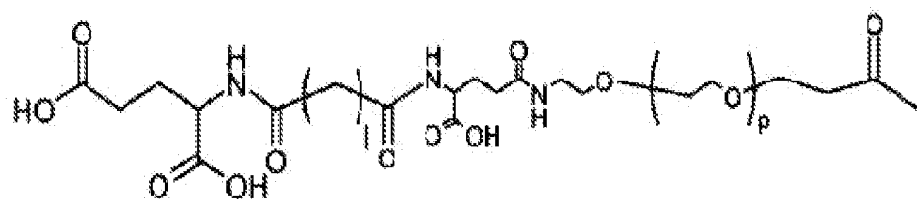
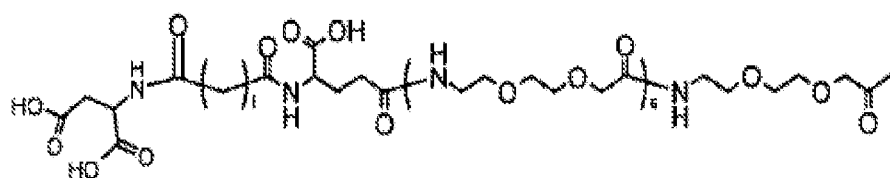
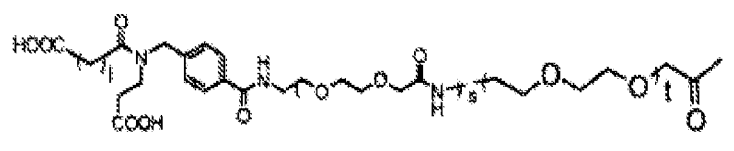
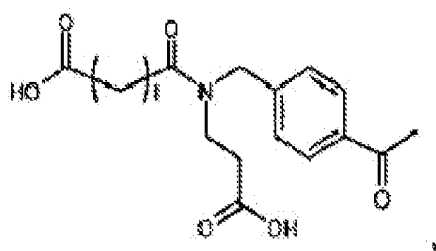
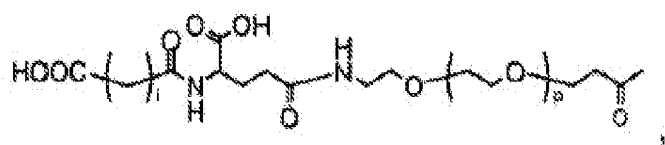
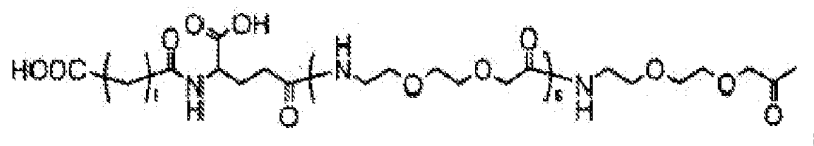
Xaa₃₆ é Arg, Gly ou Lys, ou é ausente;

Xaa₃₇ é Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, ou é ausente.

3. Um análogo GLP-1 de acordo com as reivindicações 1-2, em que m é 2, 3, 4, ou 5; n é 1 ou 2; s é 0, 1, ou 2; t é 0, 1, 2, ou 3; p é 1, 2, 3, 4, 7, 11, ou 23.

4. Um análogo GLP-1 de acordo com as reivindicações 1-3 caracterizado por B-U' ser





em que l é 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20,

p é 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12,

s é 0, 1, ou 2,

t é 0 ou 1,

m é 2, 3, ou 4.

5. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 4, em que l é 14, 15, 16, 17, ou 18; p é 1, 2, 3, 4, ou 11; s é 0, 1, ou 2; t é 0 ou 1.

6. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que s é 1.

7. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que l é 16.

8. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que p é 3 ou 4.

9. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que n é 1.

10. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-9, em que Xaa₇ é His ou desamino-histidina; Xaa₈ é Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, ou Aib; Xaa₁₆ é Val; Xaa₁₈ é Ser; Xaa₁₉ é Tyr; Xaa₂₀ é Leu; Xaa₂₂ é Gly, Glu, ou Aib; Xaa₂₃ é Gln ou Glu; Xaa₂₅ é Ala; Xaa₂₇ é Glu; Xaa₃₀ é Ala ou Glu; Xaa₃₃ é Val; Xaa₃₄ é Lys ou Arg; Xaa₃₅ é Gly ou Aib; Xaa₃₆ é Arg ou Lys; Xaa₃₇ é Gly, amida, ou ausente.

11. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por Xaa₇ é His; Xaa₈ é Gly ou Aib; Xaa₁₆ é Val; Xaa₁₈ é Ser; Xaa₁₉ é Tyr; Xaa₂₀ é Leu; Xaa₂₂ é Glu ou Aib; Xaa₂₃ é Gln; Xaa₂₅ é Ala; Xaa₂₇ é Glu; Xaa₃₀ é Ala; Xaa₃₃ é Val; Xaa₃₄ é Lys ou Arg; Xaa₃₅ é Gly ou Aib; Xaa₃₆ é Arg; Xaa₃₇ é Gly.

12. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, em que o dito análogo GLP-1 compreende uma modificação do N-terminal L-histidina na posição 7 da sequência GLP-1 (7-37).

13. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 12, em que o dito análogo GLP-1 compreende imidazopropionil⁷, α -hidroxihistidina⁷ ou N-metilo-histidina⁷, D-histidina⁷, desaminohistidina⁷, 2-amino-histidina⁷, β -hidroxihistidina⁷, homohistidina⁷, N ^{α} -acetil-histidina⁷, α -fluorometil-histidina⁷, α -metil-histidina⁷, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina⁷, ou 4-piridilalanina⁷.

14. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, em que o dito análogo GLP-1 compreende uma substituição do L-alanina na posição 8 da sequência GLP-1 (7-37) para outro resíduo aminoácido.

15. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 14, em que o dito análogo GLP-1 compreende Aib⁸, Gli⁸, Val⁸, Ile⁸, Leu⁸, Ser⁸, Thr⁸, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil).

16. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 15, em que o dito análogo GLP-1 compreende Aib⁸.

17. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende não mais que quinze resíduos de aminoácidos que foram alterados, adicionados ou eliminados como comparado com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

18. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 17, em que não mais que dez resíduos de aminoácidos foram alterados, adicionados ou eliminados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

19. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 18, em que não mais que seis resíduos de aminoácidos foram alterados, adicionados ou eliminados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

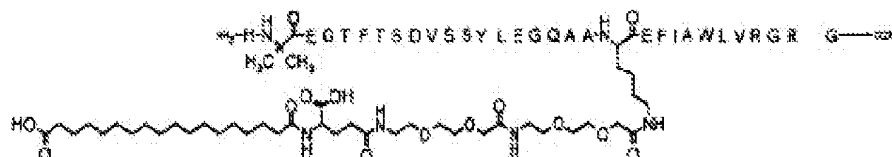
20. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende não mais que 3 resíduos de aminoácidos, os quais não são codificados pelo código genético.

21. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende apenas um resíduo de lisina.

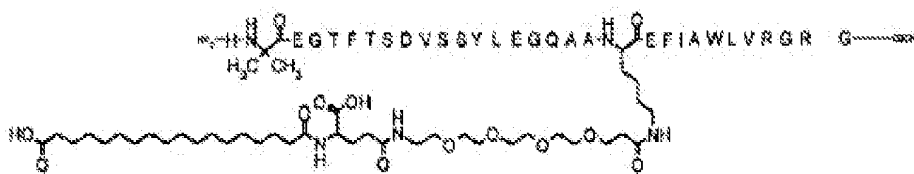
22. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que é Aib⁸, Arg³⁴-GLP-1(7-37),

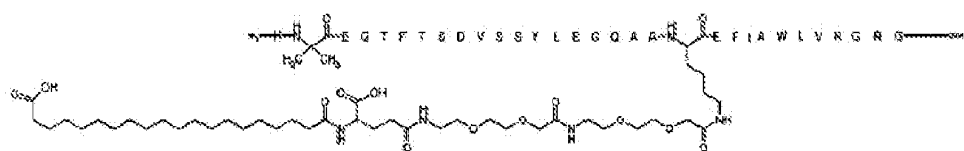
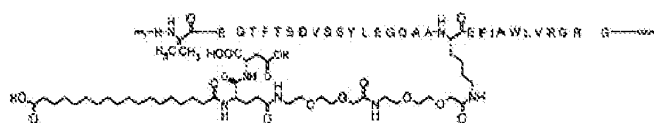
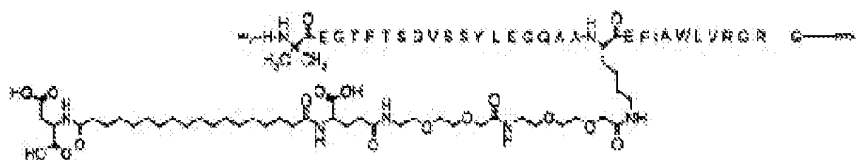
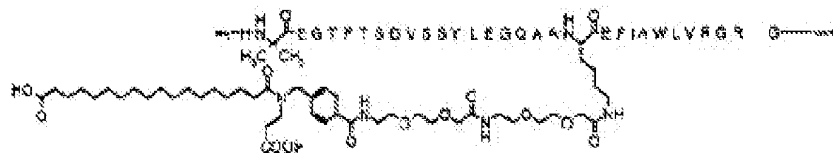
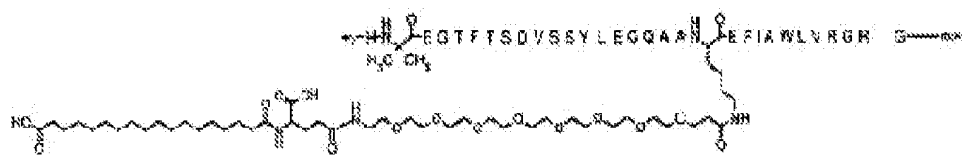
Aib^{8,22}, Arg³⁴-GLP-1(7-37), [3-(4-Imidazolilo)Propionilo⁷, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido, Aib⁸, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1(7-37), ou Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1(7-37)amida; todos os quais são substituídos por B-U' na posição 26.

23. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, o qual é seleccionado de

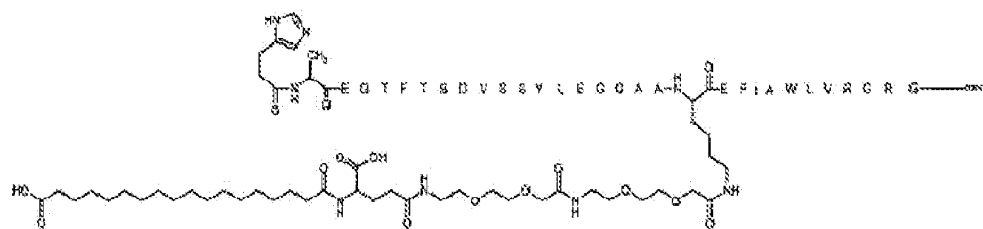


N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,

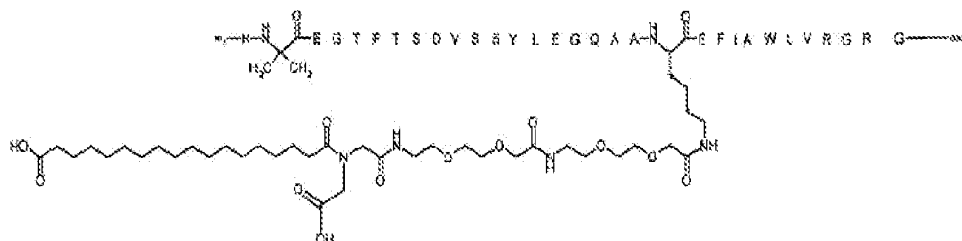




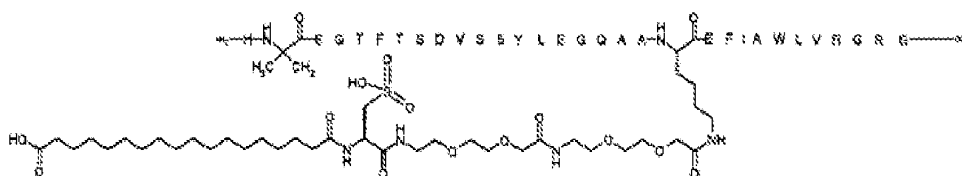
N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



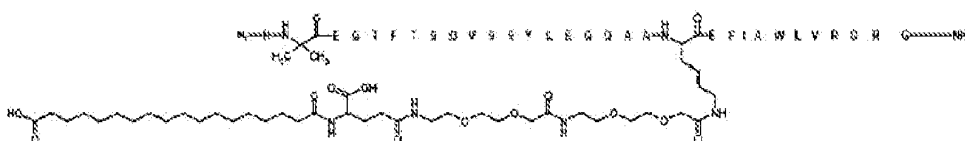
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [3-(4-Imidazolilo)Propionilo⁷,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



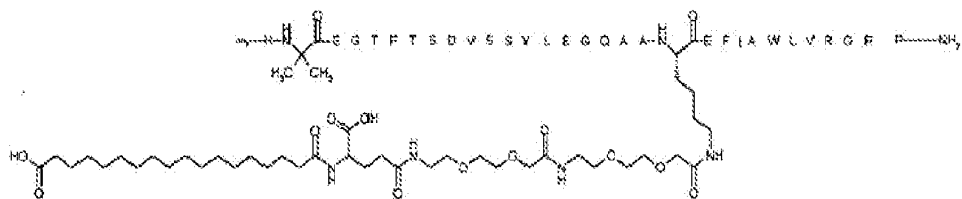
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-(carboximetiloamino)acetilamino]etóxi) etóxi] acetilamino) etóxi]etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



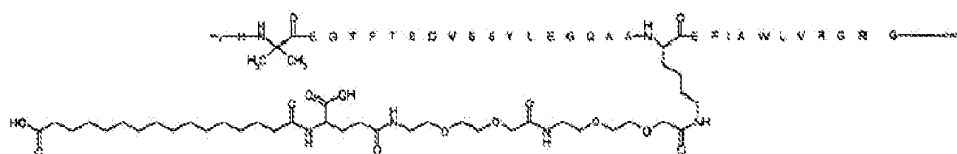
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-3(S)-sulfopropionilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



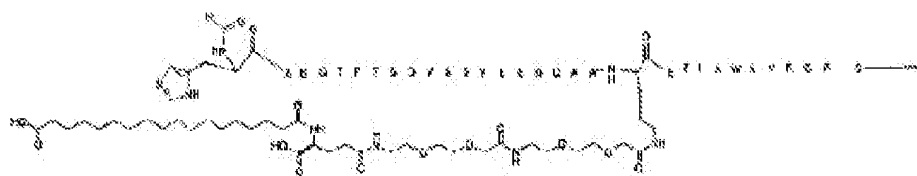
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-amida,



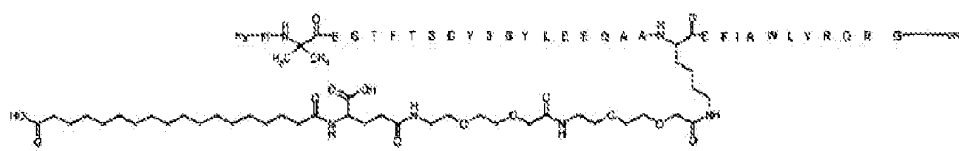
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴, Pro³⁷]GLP-1-(7-37) amida,



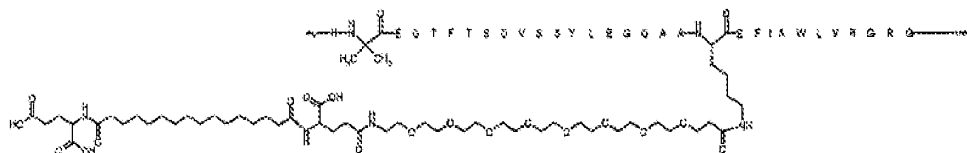
Aib⁸, Lys²⁶(N- ϵ^{26} -{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(pentadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)etóxi)etóxi]acetilo)etóxi) etóxi) acetil)}) , Arg³⁴)GLP-1 H(7-37)-OH,



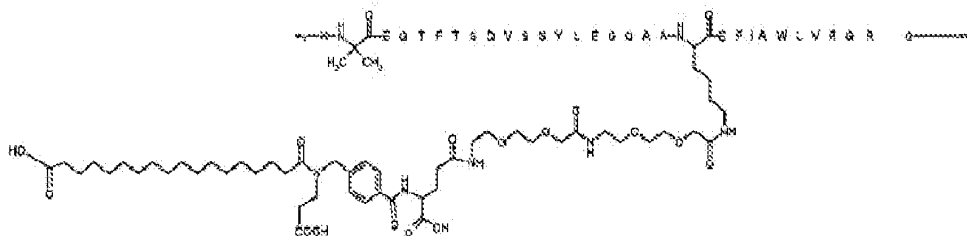
N- α^7 -formilo, N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido,



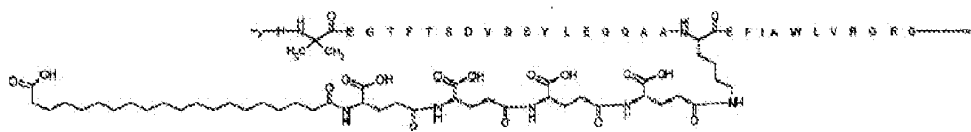
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Glu²², Arg³⁴] GLP-1-(7-37) péptido,



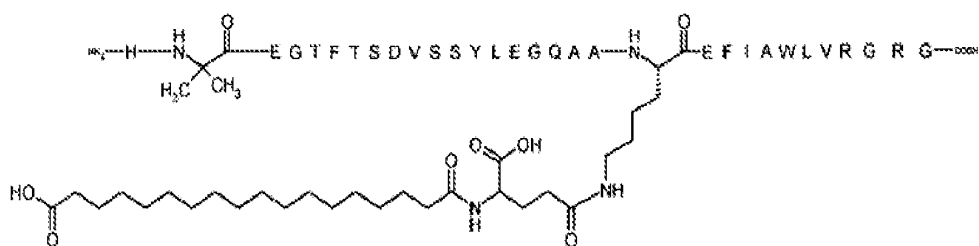
N- ϵ^{26} -{3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-[4-(15-(N-(S)-1,3-dicarboxipropilo)carbamoil)pentadecanoilamino)-(S)-4-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]etóxi}etóxi)etóxi]etóxi} etóxi)etóxi]propionil} [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1-(7-37)-péptido,



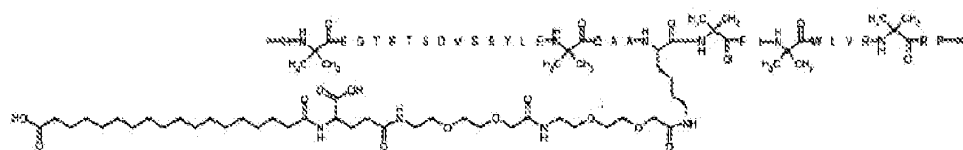
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-{[N-(2-carboxietilo)-N-(17-carboxiheptadecanoil)amino]metilo}benzoil)amino](4(S)-carboxibutirilamino)etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1(7-37),



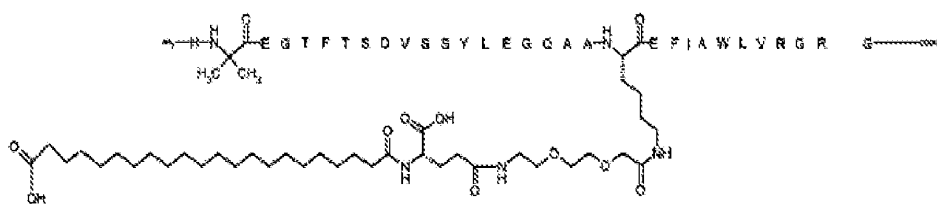
N- ϵ^{26} -{ (S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino) butirilamino) butirilamino)butirilamino)butirilamino} [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1-(7-37),



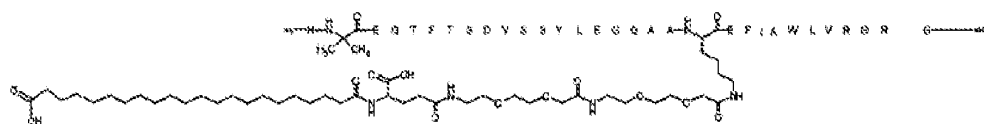
N-ε²⁶-4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilo-
[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido,



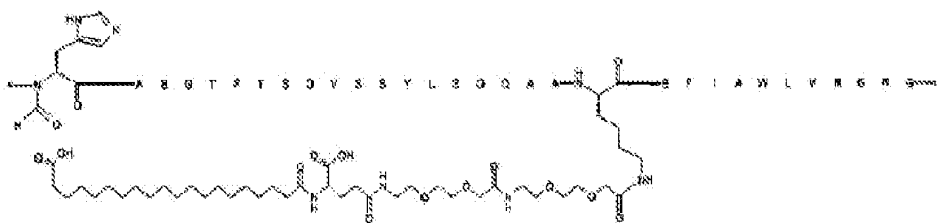
N-ε²⁶-{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino) etóxi) etóxi] acetilo) etóxi) etóxi)acetilo)}-[Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷, Lys²⁶] GLP-1 (7-37), amida



N-ε²⁶-[2-(2-[2-[4-(21-Carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi]etóxi)acetilo][Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37),



N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo][Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



e

N- α 1-formilo-N- ϵ ²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido.

24. Um método para aumentar o tempo de acção num doente de um análogo GLP-1 para mais de aproximadamente 40 horas, caracterizado por modificar pelo menos um dos resíduos de aminoácidos na posição 7 e 8 de um péptido GLP-1 (7-37) ou um análogo do mesmo, e acilando o dito análogo GLP-1 com uma parte B-U'- como descrito em qualquer uma das reivindicações precedentes no resíduo de lisina na posição 26 do dito análogo GLP-1.

25. Uma composição farmacêutica que compreende um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

26. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25, a qual é adequada para administração parenteral.

27. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento.

28. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância diminuída à glicose, diabetes tipo 1, obesidade, hipertensão, síndrome X, dislipidemia, distúrbios cognitivos, aterosclerose, enfarte do miocárdio, cardiopatía coronária e outros distúrbios cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome do intestino irritável, dispepsia e úlceras gástricas.

29. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para atrasar ou prevenir a progressão na diabetes tipo 2.

30. Uso de um composto de acordo com qualquer p as reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para diminuir a ingestão de alimentos, diminuir apoptose célula β , aumentar a função e massa da célula β , e/ou para restaurar a sensibilidade da glucose às células β .

31. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para uso como um medicamento.

32. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para uso no tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância diminuída à glicose, diabetes tipo 1, obesidade, hipertensão, síndrome X, dislipidemia, distúrbios cognitivos, aterosclerose, enfarte do miocárdio, cardiopatía coronária e outros distúrbios cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome do intestino irritável, dispepsia e úlceras gástricas.

33. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para usar para atrasar ou prevenir a progressão em diabetes tipo 2.

34. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para diminuir a ingestão de alimentos, diminuir apoptose célula β , aumentar a função e massa da célula β , e/ou para restaurar a sensibilidade da glucose às células β .

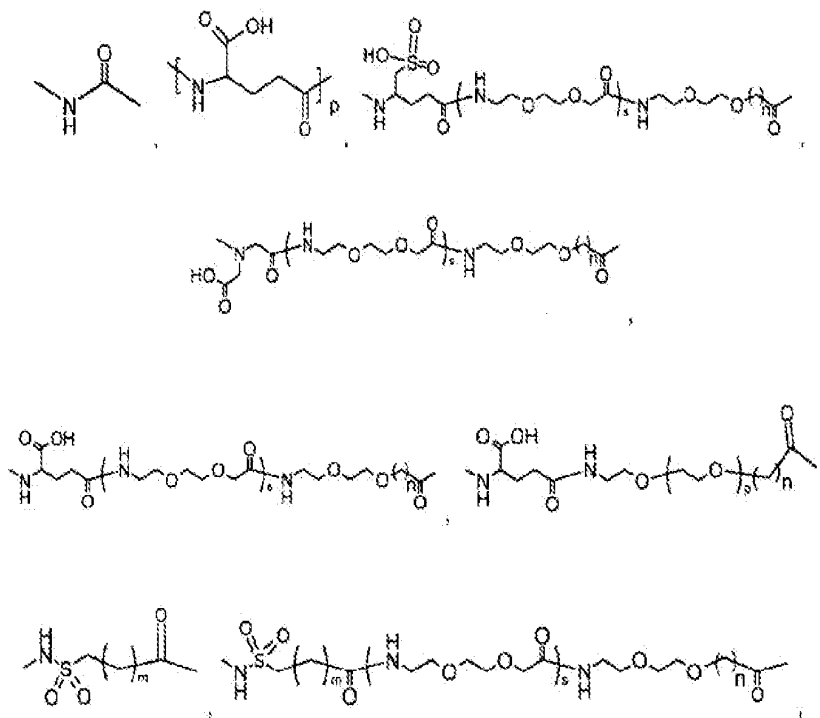
Lisboa, 02 de Novembro de 2010

Reivindicações

1. Um análogo GLP-1 com pelo menos um resíduo aminoácido não-protogénico nas posições 7 e/ou 8 relativamente à sequência GLP-1 (7-37), que é acilado com uma parte B-U' ao resíduo de lisina na posição 26, caracterizado por

(i) B-U' compreende pelo menos dois grupos ácidos, um dos quais é anexo terminalmente;

(ii) U' é seleccionado de





e

em que

m é 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6,

n é 1, 2, ou 3,

s é 0, 1, 2, ou 3,

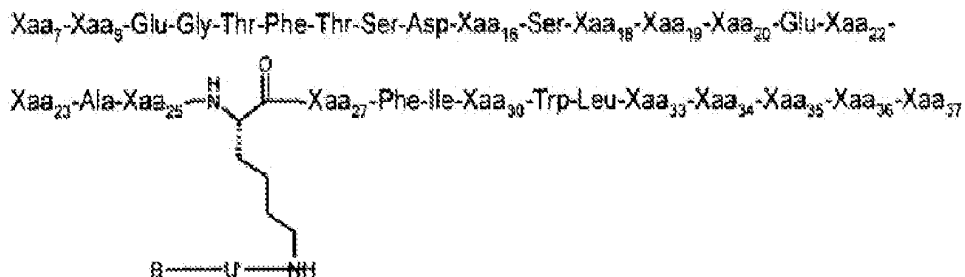
t é 0, 1, 2, 3, ou 4,

p é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ou 23; e (iii) B é um grupo ácido seleccionado de



em que l é 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20.

2. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 1, o qual é um composto de fórmula I (SEQ ID N°. 2):



Fórmula I

em que

Xaa₇ é L-histidina, imidazopropionil, α-hidróxi-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidróxi-histidina, homohistidina, N^α-acetilo-histidina, N^α-formilo-histidina, α-fluorometilo-histidina, α-metilo-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina ou 4-piridilalanina;

Xaa₈ é Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil);

Xaa₁₆ é Val ou Leu;

Xaa₁₈ é Ser, Lys ou Arg;

Xaa₁₉ é Tyr ou Gln;

Xaa₂₀ é Leu ou Met;

Xaa₂₂ é Gly, Glu ou Aib;

Xaa₂₃ é Gln, Glu, Lys ou Arg;

Xaa₂₅ é Ala ou Val;

Xaa₂₇ é Glu ou Leu;

Xaa₃₀ é Ala, Glu ou Arg;

Xaa₃₃ é Val ou Lys;

Xaa₃₄ é Lys, Glu, Asn ou Arg;

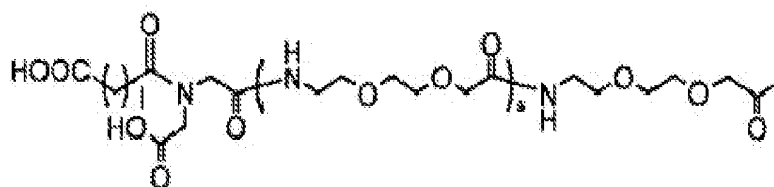
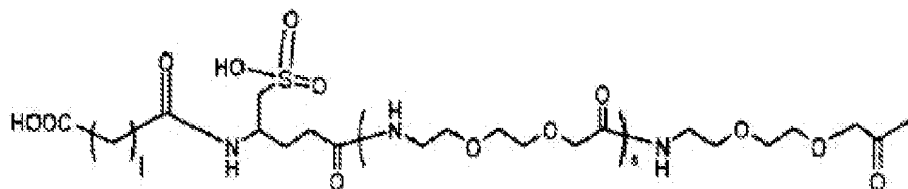
Xaa₃₅ é Gly ou Aib;

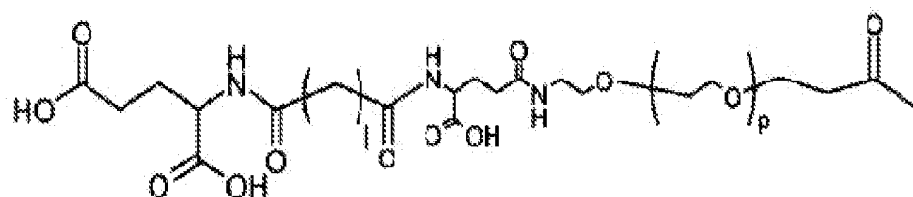
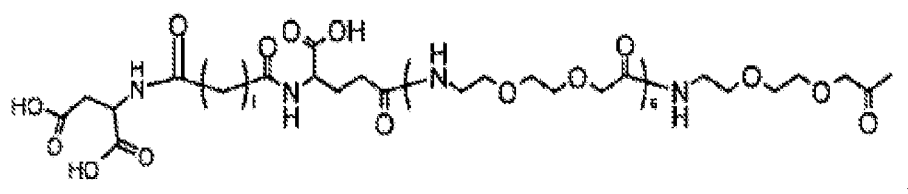
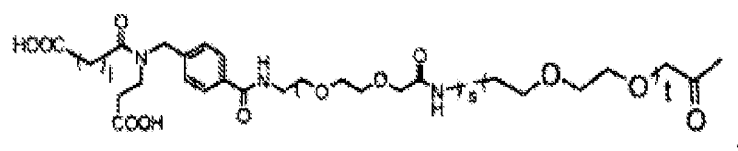
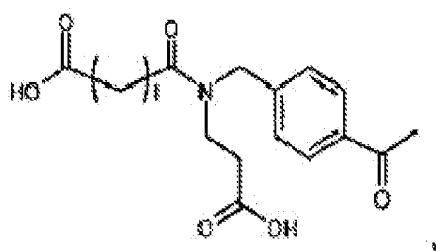
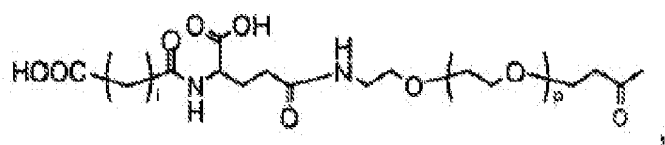
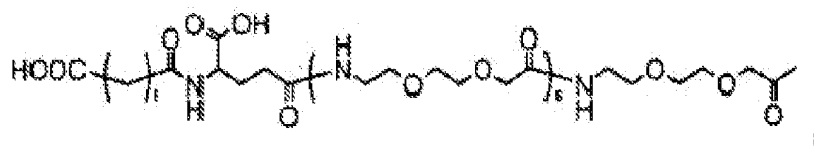
Xaa₃₆ é Arg, Gly ou Lys, ou é ausente;

Xaa₃₇ é Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, ou é ausente.

3. Um análogo GLP-1 de acordo com as reivindicações 1-2, em que m é 2, 3, 4, ou 5; n é 1 ou 2; s é 0, 1, ou 2; t é 0, 1, 2, ou 3; p é 1, 2, 3, 4, 7, 11, ou 23.

4. Um análogo GLP-1 de acordo com as reivindicações 1-3 caracterizado por B-U' ser





em que l é 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20,

p é 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12,

s é 0, 1, ou 2,

t é 0 ou 1,

m é 2, 3, ou 4.

5. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 4, em que l é 14, 15, 16, 17, ou 18; p é 1, 2, 3, 4, ou 11; s é 0, 1, ou 2; t é 0 ou 1.

6. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que s é 1.

7. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que l é 16.

8. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que p é 3 ou 4.

9. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que n é 1.

10. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-9, em que Xaa₇ é His ou desamino-histidina; Xaa₈ é Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, ou Aib; Xaa₁₆ é Val; Xaa₁₈ é Ser; Xaa₁₉ é Tyr; Xaa₂₀ é Leu; Xaa₂₂ é Gly, Glu, ou Aib; Xaa₂₃ é Gln ou Glu; Xaa₂₅ é Ala; Xaa₂₇ é Glu; Xaa₃₀ é Ala ou Glu; Xaa₃₃ é Val; Xaa₃₄ é Lys ou Arg; Xaa₃₅ é Gly ou Aib; Xaa₃₆ é Arg ou Lys; Xaa₃₇ é Gly, amida, ou ausente.

11. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por Xaa₇ é His; Xaa₈ é Gly ou Aib; Xaa₁₆ é Val; Xaa₁₈ é Ser; Xaa₁₉ é Tyr; Xaa₂₀ é Leu; Xaa₂₂ é Glu ou Aib; Xaa₂₃ é Gln; Xaa₂₅ é Ala; Xaa₂₇ é Glu; Xaa₃₀ é Ala; Xaa₃₃ é Val; Xaa₃₄ é Lys ou Arg; Xaa₃₅ é Gly ou Aib; Xaa₃₆ é Arg; Xaa₃₇ é Gly.

12. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, em que o dito análogo GLP-1 compreende uma modificação do N-terminal L-histidina na posição 7 da sequência GLP-1 (7-37).

13. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 12, em que o dito análogo GLP-1 compreende imidazopropionil⁷, α -hidroxihistidina⁷ ou N-metilo-histidina⁷, D-histidina⁷, desaminohistidina⁷, 2-amino-histidina⁷, β -hidroxihistidina⁷, homohistidina⁷, N ^{α} -acetil-histidina⁷, α -fluorometil-histidina⁷, α -metil-histidina⁷, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina⁷, ou 4-piridilalanina⁷.

14. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, em que o dito análogo GLP-1 compreende uma substituição do L-alanina na posição 8 da sequência GLP-1 (7-37) para outro resíduo aminoácido.

15. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 14, em que o dito análogo GLP-1 compreende Aib⁸, Gli⁸, Val⁸, Ile⁸, Leu⁸, Ser⁸, Thr⁸, ácido carboxílico (1-aminociclopropil), ácido carboxílico (1-aminociclobutil), ácido carboxílico (1-aminociclopentil), ácido carboxílico (1-aminociclohexil), ácido carboxílico (1-aminocicloheptil), ou ácido carboxílico (1-aminociclooctil).

16. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 15, em que o dito análogo GLP-1 compreende Aib⁸.

17. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende não mais que quinze resíduos de aminoácidos que foram alterados, adicionados ou eliminados como comparado com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

18. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 17, em que não mais que dez resíduos de aminoácidos foram alterados, adicionados ou eliminados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

19. Um análogo GLP-1 de acordo com a reivindicação 18, em que não mais que seis resíduos de aminoácidos foram alterados, adicionados ou eliminados em comparação com GLP-1 (7-37) (SEQ ID N°. 1).

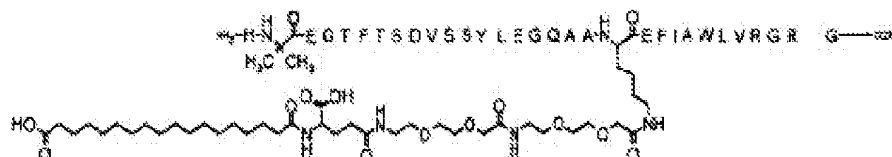
20. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende não mais que 3 resíduos de aminoácidos, os quais não são codificados pelo código genético.

21. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito análogo GLP-1 compreende apenas um resíduo de lisina.

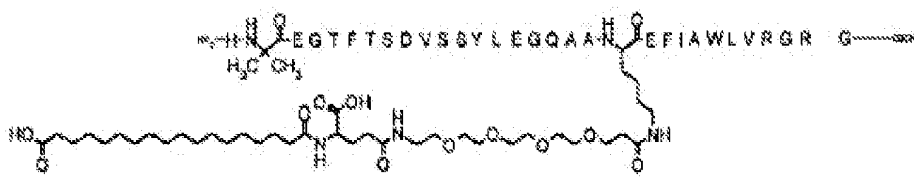
22. Um análogo GLP-1 de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que é Aib⁸, Arg³⁴-GLP-1(7-37),

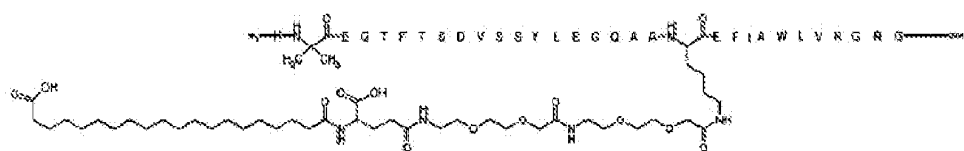
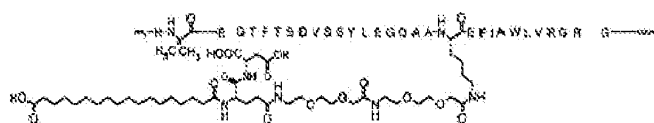
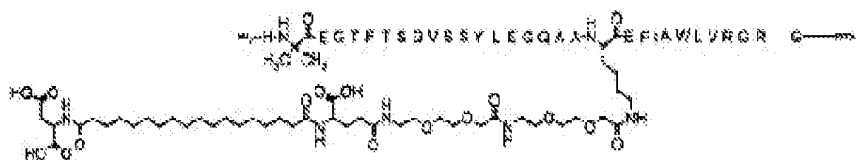
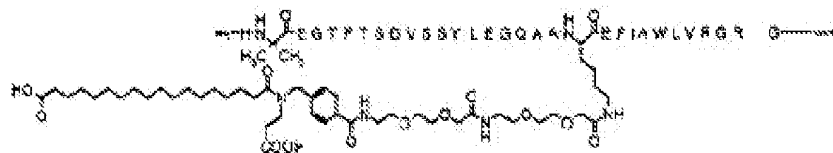
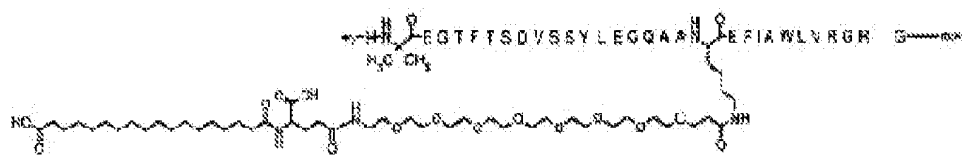
Aib^{8,22}, Arg³⁴-GLP-1(7-37), [3-(4-Imidazolilo)Propionilo⁷, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido, Aib⁸, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1(7-37), ou Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷-GLP-1(7-37)amida; todos os quais são substituídos por B-U' na posição 26.

23. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, o qual é seleccionado de

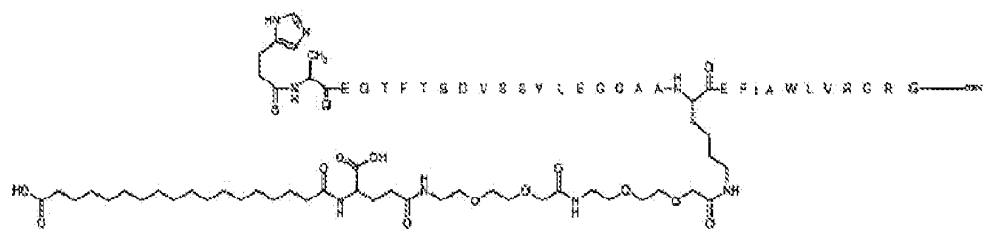


N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,

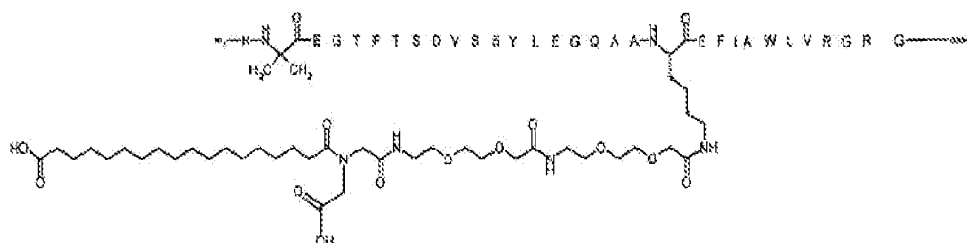




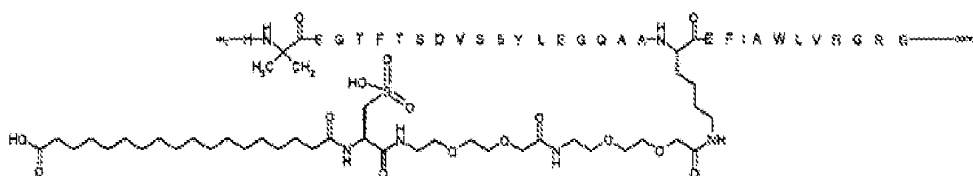
N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



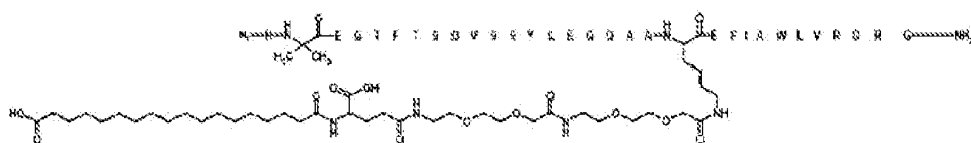
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [3-(4-Imidazolilo)Propionilo⁷,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



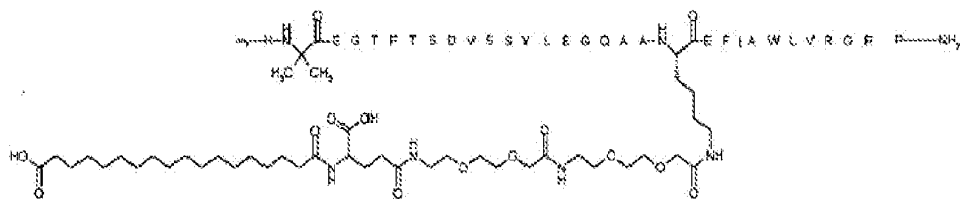
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-(carboximetiloamino)acetilamino]etóxi) etóxi] acetilamino) etóxi]etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



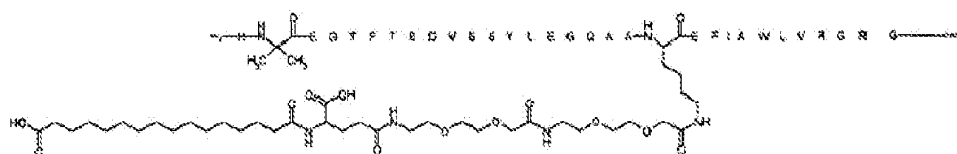
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-3(S)-sulfopropionilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



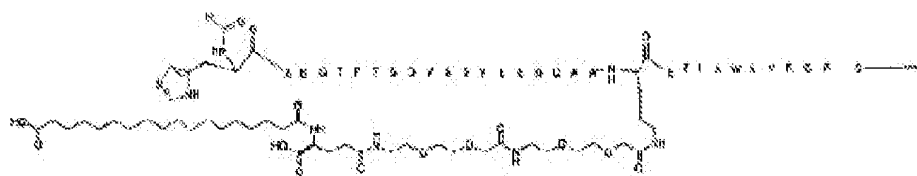
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-amida,



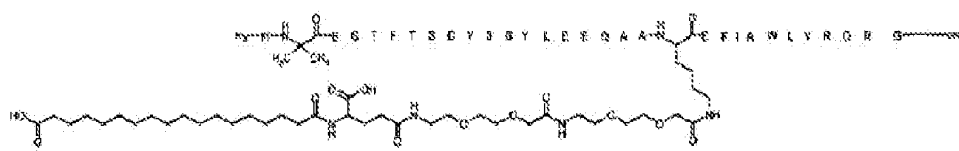
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴, Pro³⁷]GLP-1-(7-37) amida,



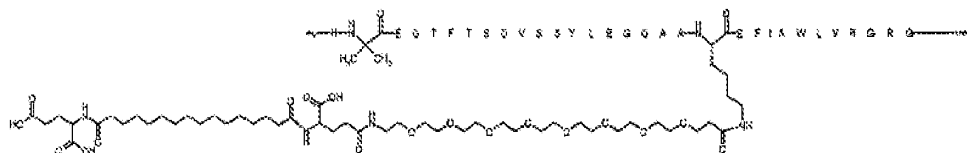
Aib⁸, Lys²⁶(N- ϵ^{26} -{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(pentadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)etóxi)etóxi]acetilo)etóxi) etóxi) acetil)}) , Arg³⁴) GLP-1 H(7-37)-OH,



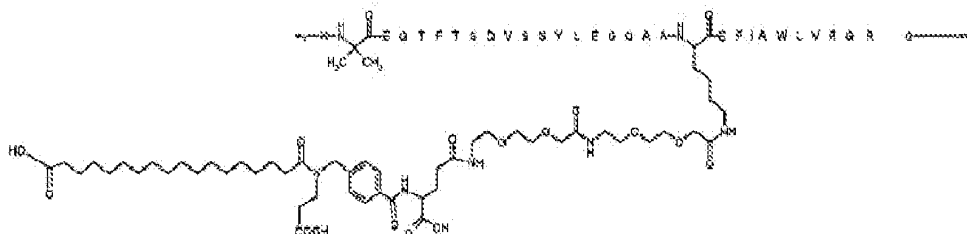
N- α^7 -formilo, N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido,



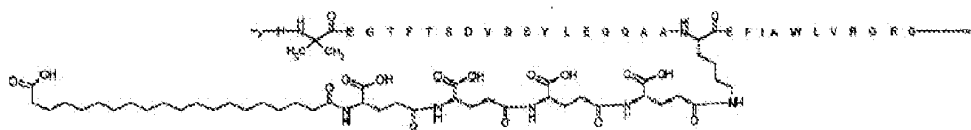
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino) etóxi] etóxi) acetilo] [Aib⁸, Glu²², Arg³⁴] GLP-1-(7-37) péptido,



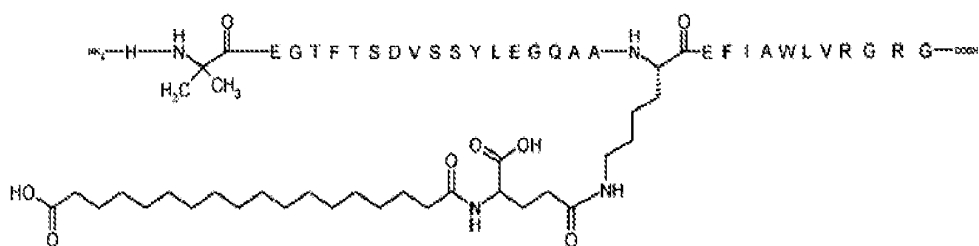
N- ϵ^{26} -{3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-[4-(15-(N-(S)-1,3-dicarboxipropilo)carbamoil)pentadecanoilamino)-(S)-4-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]etóxi}etóxi)etóxi]etóxi} etóxi)etóxi]propionil} [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1-(7-37)-péptido,



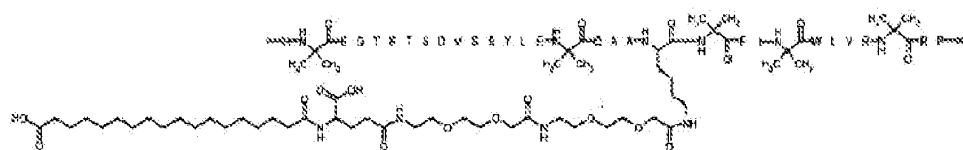
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-{[N-(2-carboxietilo)-N-(17-carboxiheptadecanoil)amino]metilo}benzoil)amino](4(S)-carboxibutirilamino)etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi) acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1(7-37),



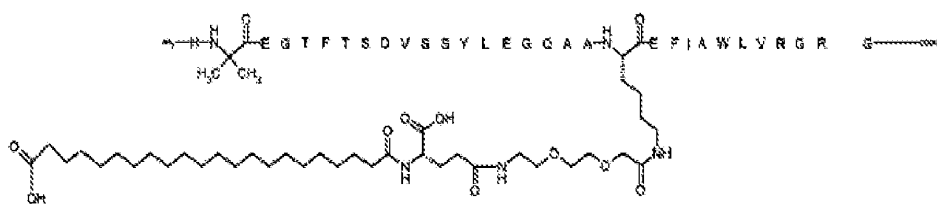
N- ϵ^{26} -{ (S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-((S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino) butirilamino) butirilamino)butirilamino)butirilamino} [Aib⁸, Arg³⁴] GLP-1-(7-37),



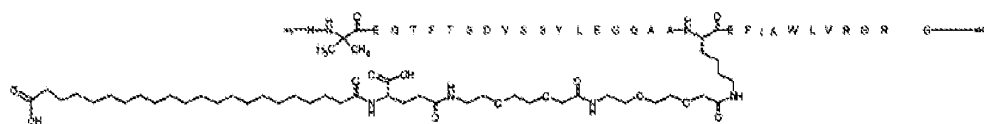
N-ε²⁶-4-(17-Carboxiheptadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilo-
[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-péptido,



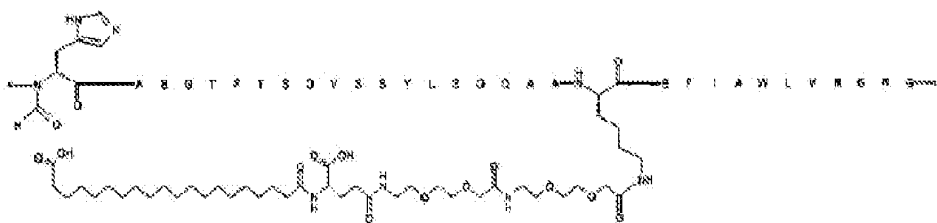
N-ε²⁶-{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4-carboxibutirilamino) etóxi) etóxi] acetilo) etóxi) etóxi)acetilo)}-[Aib^{8,22,27,30,35}, Arg³⁴, Pro³⁷, Lys²⁶] GLP-1 (7-37), amida



N-ε²⁶-[2-(2-[2-[4-(21-Carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi]etóxi)acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37),



N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiuneicosanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido,



e

N- α 1-formilo-N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(S)-carboxibutirilamino]etóxi)etóxi]acetilamino)etóxi]etóxi)acetilo] [Arg³⁴]GLP-1-(7-37)péptido.

24. Um método para aumentar o tempo de acção num doente de um análogo GLP-1 para mais de aproximadamente 40 horas, caracterizado por modificar pelo menos um dos resíduos de aminoácidos na posição 7 e 8 de um péptido GLP-1 (7-37) ou um análogo do mesmo, e acilando o dito análogo GLP-1 com uma parte B-U'- como descrito em qualquer uma das reivindicações precedentes no resíduo de lisina na posição 26 do dito análogo GLP-1.

25. Uma composição farmacêutica que compreende um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

26. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25, a qual é adequada para administração parenteral.

27. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento.

28. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância diminuída à glicose, diabetes tipo 1, obesidade, hipertensão, síndrome X, dislipidemia, distúrbios cognitivos, aterosclerose, enfarte do miocárdio, cardiopatia coronária e outros distúrbios cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome do intestino irritável, dispepsia e úlceras gástricas.

29. Uso de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para atrasar ou prevenir a progressão na diabetes tipo 2.

30. Uso de um composto de acordo com qualquer p as reivindicações 1-23 para a preparação de um medicamento para diminuir a ingestão de alimentos, diminuir apoptose célula β , aumentar a função e massa da célula β , e/ou para restaurar a sensibilidade da glucose às células β .

31. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para uso como um medicamento.

32. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para uso no tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância diminuída à glicose, diabetes tipo 1, obesidade, hipertensão, síndrome X, dislipidemia, distúrbios cognitivos, aterosclerose, enfarte do miocárdio, cardiopatia coronária e outros distúrbios cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome do intestino irritável, dispepsia e úlceras gástricas.

33. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para usar para atrasar ou prevenir a progressão em diabetes tipo 2.

34. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23 para diminuir a ingestão de alimentos, diminuir apoptose célula β , aumentar a função e massa da célula β , e/ou para restaurar a sensibilidade da glucose às células β .

Lisboa, 02 de Novembro de 2010