



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

**(11) BR 112013029409-4 B1**



**(22) Data do Depósito:** 17/05/2012

**(45) Data de Concessão:** 29/03/2022

**(54) Título:** PRODUTO DE PEPTÍDEO COMPREENDENDO TENSOATIVO LIGADO DE FORMA COVALENTE A PEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE O COMPREENDE, BEM COMO USO DE PRODUTO DE PEPTÍDEO NO TRATAMENTO DE CONDIÇÃO ASSOCIADA À RESISTÊNCIA À INSULINA, DOENÇA CARDIOVASCULAR E DIABETES

**(51) Int.Cl.:** C07K 14/605; A61K 38/26; A61K 47/36; C07H 15/04; A61P 3/10.

**(30) Prioridade Unionista:** 05/10/2011 US 61/543,716; 18/05/2011 US 61/487,640.

**(73) Titular(es):** MEDERIS DIABETES, LLC.

**(72) Inventor(es):** JOHN J. NESTOR.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2012038434 de 17/05/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2012/158965 de 22/11/2012

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 14/11/2013

**(57) Resumo:** PRODUTO DE PEPTÍDEO COMPREENDENDO TENSOATIVO LIGADO DE FORMA COVALENTE A PEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE O COMPREENDE, BEM COMO USO DE PRODUTO DE PEPTÍDEO NO TRATAMENTO DE CONDIÇÃO ASSOCIADA À RESISTÊNCIA À INSULINA, DOENÇA CARDIOVASCULAR E DIABETES. A presente invenção refere-se a um produto de peptídeo que compreende um tensoativo X, covalentemente ligado a um peptídeo, o peptídeo compreendendo um aminoácido U ligante e pelo menos outro aminoácido: em que o tensoativo X é um grupo de Fórmula I: Fórmula I, onde as definições são aqui apresentadas. A presente invenção refere-se ainda ao uso dos referidos produtos de peptídeo no tratamento de condição associada à resistência à insulina, doença cardiovascular e diabetes, bem como a composição farmacêutica compreendendo os referidos produtos de peptídeo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"PRODUTO DE PEPTÍDEO COMPREENDENDO TENSOATIVO  
LIGADO DE FORMA COVALENTE A PEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO  
FARMACÊUTICA QUE O COMPREENDE, BEM COMO USO DE  
PRODUTO DE PEPTÍDEO NO TRATAMENTO DE CONDIÇÃO  
ASSOCIADA À RESISTÊNCIA À INSULINA, DOENÇA  
CARDIOVASCULAR E DIABETES".**

#### **Referência Cruzada**

[0001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisional dos Estados Unidos Número de Série 61/487.640, depositado em 18 de maio de 2011, e Pedido de Patente Provisional dos Estados Unidos Número de Série 61/543.716, depositado em 5 de outubro de 2011, que são incorporados aqui por referência em suas íntegras.

#### **Campo da Invenção**

[0002] A prevalência crescente de diabetes melito é uma crise de saúde mundial de proporções epidêmicas que é um principal contribuidor para morbidez e mortalidade do paciente e um maior ônus econômico. A obesidade é um importante fator de risco para a diabetes tipo 2, e aproximadamente 90% de pacientes com diabetes tipo 2 estão com excesso de peso ou obesos. A obesidade é um problema rapidamente crescente mundialmente e atualmente mais de 65% de adultos N<sup>os</sup> Estados Unidos estão com excesso de peso (Hedley, A.A., e outro (2004) JAMA 291: 2847-2850). Existe uma necessidade de desenvolvimento de tratamentos farmacêuticos seguros e eficazes para obesidade e diabetes melito.

#### **Sumário da Invenção**

[0003] São descritos aqui composições e métodos para o tratamento ou prevenção de distúrbios associados com a resistência à insulina incluindo e não limitados à obesidade, a síndrome metabólica,

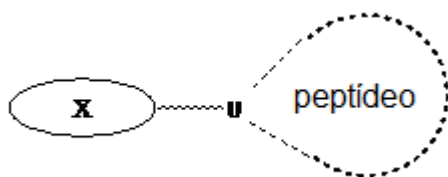
diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose ou similares. Em algumas modalidades, os métodos incluem tratamento profilático e/ou terapêutico com peptídeos e/ou proteínas. Produtos farmacêuticos de peptídeo e/ou proteína frequentemente sofrem de diversas limitações em seu uso em medicina (Nestor, J.J., Jr. (2007) *Comprehensive Medicinal Chemistry II* 2: 573-601) – curta duração de ação, fraca biodisponibilidade, e ausência de seletividade do subtipo de receptor. Além disso, peptídeos e/ou proteínas são instáveis em formulações, frequentemente sendo objeto de agregação.

[0004] São descritos aqui certos peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados (por exemplo, GLP-1, glucagon, análogos relacionados ou similares) que provêm mais longa duração de ação e/ou biodisponibilidade melhorada na administração das proteínas e/ou peptídeos modificados. Tais peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados são adequados para a prevenção e/ou tratamento de condições associadas com a obesidade, a síndrome metabólica, resistência à insulina, diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose, ou similares.

[0005] Em algumas modalidades, os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui são ligados a tensoativos de glicosídeo. Em um aspecto, os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados são ligados a um tensoativo de glicosídeo em que o peptídeo e/ou proteína é ligado ao glicosídeo no tensoativo e o glicosídeo é então ligado a um grupo hidrofóbico. São também fornecidos aqui, em algumas modalidades, reagentes e intermediários para a síntese de peptídeos e/ou proteínas modificados (por exemplo, GLP-1 modificado, glucagon, análogos de glucagon ou GLP-1, ou similares) por meio da incorporação de tensoativos.

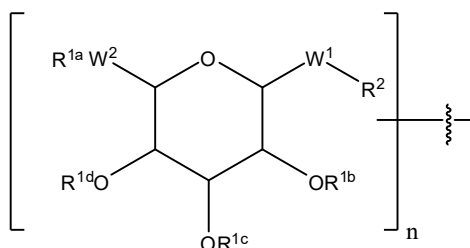
[0006] São fornecidos aqui, em algumas modalidades, produtos de peptídeo compreendendo um tensoativo X, covalentemente ligado a um

peptídeo, o peptídeo compreendendo um aminoácido U ligante e pelo menos um outro aminoácido:



Fórmula I-A

[0007] em que o tensoativo X é um grupo de Fórmula I:



Fórmula I

em que:

[0008]  $R^{1a}$  é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída;

[0009]  $R^{1b}$ ,  $R^{1c}$ , e  $R^{1d}$  são cada qual, independentemente em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída;

[00010]  $W^1$  é independentemente, em cada ocorrência,  $-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-$ ,  $-(C=O)-$ ,  $-(C=O)-O-$ ,  $-(C=O)-NH-$ ,  $-(C=S)-$ ,  $-(C=S)-NH-$ , ou  $-CH_2-S-$ ;

[00011]  $W^2$  é  $-O-$ ,  $-CH_2-$  ou  $-S-$ ;

[00012]  $R^2$  é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída,  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $C_2$ - $C_4$ -alceno,  $C_2$ - $C_4$ -alcino,  $-NH(C=O)-CH_2-Br$ ,  $-(CH_2)_m$ -maleimida, ou  $-N_3$ ;

[00013]  $n$  é 1, 2 ou 3; e

[00014]  $m$  é 1-10;



[00015] o peptídeo é selecionado de Fórmula II:

[00016] aa<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-aa<sub>3</sub>-aa<sub>4</sub>-aa<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-aa<sub>7</sub>-aa<sub>8</sub>-aa<sub>9</sub>-aa<sub>10</sub>- aa<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-aa<sub>13</sub>-  
aa<sub>14</sub>-aa<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-aa<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>- aa<sub>21</sub>-aa<sub>22</sub>-aa<sub>23</sub>-aa<sub>24</sub>-aa<sub>25</sub>-aa<sub>26</sub>-aa<sub>27</sub>-  
aa<sub>28</sub>-aa<sub>29</sub>-aa<sub>30</sub>-aa<sub>31</sub>-aa<sub>32</sub>-aa<sub>33</sub>-aa<sub>34</sub>-aa<sub>35</sub>-aa<sub>36</sub>-aa<sub>37</sub>-Z Fórmula II (**SEQ. ID.**  
**Nº. 1**)

em que:

[00017] Z é OH, ou -NH-R<sup>3</sup>, em que R<sup>3</sup> é H ou C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquila substituída ou não substituída, ou uma cadeia de PEG de menos do que 10 Da;

[00018] aa<sub>1</sub> é His, N-Ac-His, pGlu-His, ou N-R<sup>3</sup>-His;

[00019] aa<sub>2</sub> é Ser, Ala, Gly, Aib, Ac4c ou Ac5c;

[00020] aa<sub>3</sub> é Gln, ou Cit;

[00021] aa<sub>4</sub> é Gly, ou D-Ala;

[00022] aa<sub>5</sub> é Thr, ou Ser;

[00023] aa<sub>6</sub> é Phe, Trp, F2Phe, Me2Phe, ou Nal2;

[00024] aa<sub>7</sub> é Thr, ou Ser;

[00025] aa<sub>8</sub> é Ser, ou Asp;

[00026] aa<sub>9</sub> é Asp, ou Glu;

[00027] aa<sub>10</sub> é Tyr, Leu, Met, Nal2, Bip, ou Bip2EtMeO;

[00028] aa<sub>11</sub> é Ser, Asn, ou U;

[00029] aa<sub>12</sub> é Lys, Glu, Ser, Arg, ou U;

[00030] aa<sub>13</sub> é ausente ou Tyr, Gln, Cit, ou U;

[00031] aa<sub>14</sub> é ausente ou Leu, Met, Nle, ou U;

[00032] aa<sub>15</sub> é ausente ou Asp, Glu, ou U;

[00033] aa<sub>16</sub> é ausente ou Ser, Gly, Glu, Aib, Ac5c, Lys, Arg, ou U;

[00034] aa<sub>17</sub> é ausente ou Arg, hArg, Gln, Glu, Cit, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00035] aa<sub>18</sub> é ausente ou Arg, hArg, Ala, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00036] aa<sub>19</sub> é ausente ou Ala, Val, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00037] aa<sub>20</sub> é ausente ou Gln, Lys, Arg, Cit, Glu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou

U;

[00038] aa<sub>21</sub> é ausente ou Asp, Glu, Leu, Aib, Ac4c Ac5c, ou U;

[00039] aa<sub>22</sub> é ausente ou Phe, Trp, Nal2, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U

[00040] aa<sub>23</sub> é ausente ou Val, Ile, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00041] aa<sub>24</sub> é ausente ou Gln, Ala, Glu, Cit, ou U;

[00042] aa<sub>25</sub> é ausente ou Trp, Nal2, ou U;

[00043] aa<sub>26</sub> é ausente ou Leu, ou U;

[00044] aa<sub>27</sub> é ausente ou Met, Val, Nle, Lys, ou U;

[00045] aa<sub>28</sub> é ausente ou Asn, Lys, ou U;

[00046] aa<sub>29</sub> é ausente ou Thr, Gly, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00047] aa<sub>30</sub> é ausente ou Lys, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00048] aa<sub>31</sub> é ausente ou Arg, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00049] aa<sub>32</sub> é ausente ou Asn, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00050] aa<sub>33</sub> é ausente ou Arg, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00051] aa<sub>34</sub> é ausente ou Asn, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00052] aa<sub>35</sub> é ausente ou Asn, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U;

[00053] aa<sub>36</sub> é ausente ou Ile, Aib, Ac4c, Ac5C, ou U;

[00054] aa<sub>36</sub> é ausente ou Ala, Aib, Ac4c, Ac5C, ou U;

[00055] aa<sub>37</sub> ausente ou U;

[00056] U é um aminoácido natural ou não natural que compreende um grupo funcional usado para ligação covalente ao tensoativo X;

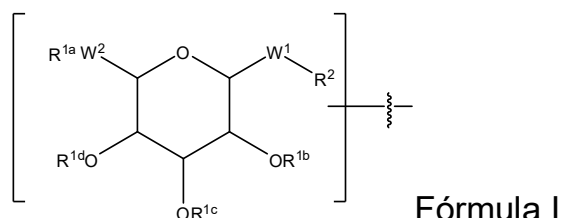
[00057] em que quaisquer dois de aa<sub>1</sub>-aa<sub>37</sub> são opcionalmente ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam; e

[00058] contanto que um, ou pelo menos um de aa<sub>11</sub> – aa<sub>37</sub> seja o aminoácido ligante U covalentemente ligado a X.

[00059] Em algumas modalidades, n é 1. Em algumas modalidades, n é 2, e um primeiro glicosídeo é ligado a um segundo glicosídeo por meio de ligação entre W<sup>2</sup> do primeiro glicosídeo e qualquer um de OR<sup>1b</sup>, OR<sup>1c</sup> ou OR<sup>1d</sup> do segundo glicosídeo. Em algumas modalidades, n é 3,

e um primeiro glicosídeo é ligado a um segundo glicosídeo por meio de ligação entre  $W^2$  do primeiro glicosídeo e qualquer um de  $OR^{1b}$ ,  $OR^{1c}$  ou  $OR^{1d}$  do segundo glicosídeo, e o segundo glicosídeo é ligado a um terceiro glicosídeo por meio de ligação entre  $W^2$  do segundo glicosídeo e qualquer um de  $OR^{1b}$ ,  $OR^{1c}$  ou  $OR^{1d}$  do terceiro glicosídeo.

[00060] Em uma modalidade, compostos de Fórmula I-A são compostos em que X tem a estrutura:



em que:

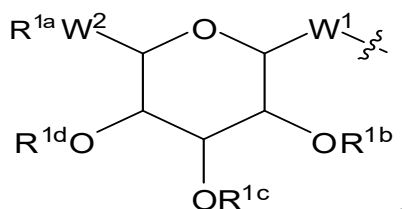
[00061]  $R^{1a}$  é H, um grupo de proteção, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, ou uma porção contendo núcleo esteroide;

[00062]  $R^{1b}$ ,  $R^{1c}$ , e  $R^{1d}$  são cada qual, independentemente em cada ocorrência, H, um grupo de proteção, ou um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída;

[00063]  $W^1$  é independentemente, em cada ocorrência,  $-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-$ ,  $-(C=O)$ ,  $-(C=O)-O-$ ,  $-(C=O)-NH-$ ,  $-(C=S)-$ ,  $-(C=S)-NH-$ , ou  $-CH_2-S-$ ;  $W^2$  é  $-O-$ ,  $-S-$ ;

[00064]  $R^2$  é uma ligação,  $C_2$ - $C_4$ -alceno,  $C_2$ - $C_4$ -alcino, ou  $-(CH_2)_m$ -maleimida; e  $m$  é 1-10.

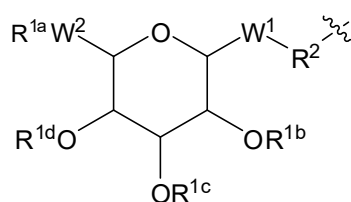
[00065] Em outra modalidade, compostos de Fórmula I-A são compostos em que X tem a estrutura:



[00066] Consequentemente, na modalidade descrita acima,  $R^2$  é uma ligação.

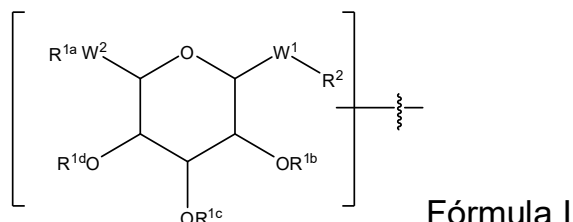
[00067] Por exemplo, em uma modalidade exemplar da Estrutura de X descrita acima,  $W^1$  é  $-C(=O)NH-$ ,  $R^2$  é uma ligação entre  $W^1$  e um resíduo de aminoácido U dentro do peptídeo (por exemplo, um grupo amino na cadeia lateral de um resíduo de lisina presente no peptídeo).

[00068] Em uma outra modalidade, compostos de Fórmula I-A são compostos em que X tem a estrutura:



[00069] Por exemplo, em uma modalidade exemplar da Estrutura de X descrita acima,  $W^1$  é  $-CH_2-$  e  $R^2$  é um grupo funcional maleimida ligado à alquila sobre X e  $R^2$  é ligado a uma porção adequada de um resíduo de aminoácido U dentro do peptídeo (por exemplo, um grupo tiol em um resíduo de cisteína do peptídeo forma um tioéter com a maleimida sobre X).

[00070] Em ainda outra modalidade, compostos de Fórmula I-A são compostos em que X tem a estrutura:



em que:

[00071]  $R^{1a}$  é H, um grupo de proteção, um grupo  $C_1-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, ou uma porção contendo núcleo esteroide;

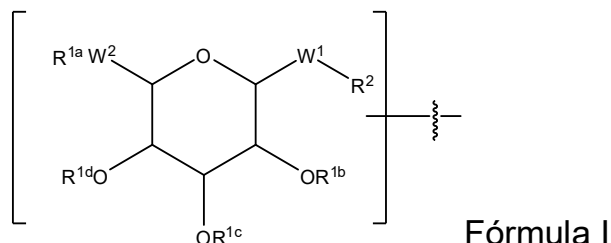
[00072]  $R^{1b}$ ,  $R^{1c}$ , e  $R^{1d}$  são cada qual, independentemente em cada ocorrência, H, um grupo de proteção, ou um grupo  $C_1-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída;

[00073]  $W^1$  é  $-(C=O)-NH-$ ;

[00074]  $W^2$  é  $-O-$ ;

[00075]  $R^2$  é uma ligação.

[00076] Em uma modalidade adicional, compostos de Fórmula I-A são compostos em que X tem a estrutura:



em que:

[00077]  $R^{1a}$  é um grupo  $C_1-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída;

[00078]  $R^{1b}$ ,  $R^{1c}$ , e  $R^{1d}$  são H;

[00079]  $W^1$  é  $-(C=O)-NH-$ ;

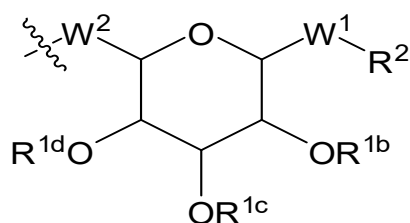
[00080]  $W^2$  é  $-O-$ ; e

[00081]  $R^2$  é uma ligação.

[00082] Em algumas modalidades descritas acima e aqui,  $R^{1a}$  é um grupo  $C_1-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída.

[00083] Em algumas modalidades descritas acima e aqui,  $R^{1a}$  é um grupo  $C_6-C_{20}$  alquila substituída ou não substituída.

[00084] São também contempladas aqui modalidades alternativas em que X na Fórmula I-A tem a estrutura:



[00085] Por exemplo, em uma modalidade exemplar da Estrutura de X descrita acima,  $W^1$  é  $-S-$ ,  $R^2$  é um grupo  $C_1-C_{30}$  alquila,  $W^2$  é S,  $R^{1a}$  é uma ligação entre  $W^2$  e uma porção adequada de um resíduo de aminoácido U dentro do peptídeo (por exemplo, um grupo tiol em um resíduo de cisteína do peptídeo forma um tioéter com X).

[00086] Em outra modalidade exemplar da Estrutura de X descrita acima,  $W^1$  é -O-,  $R^2$  é um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila,  $W^2$  é O,  $R^{1a}$  é uma ligação entre  $W^2$  e uma porção adequada de um resíduo de aminoácido U dentro do peptídeo (por exemplo, um grupo hidroxila em um resíduo serina ou treonina do peptídeo forma um éter com X).

[00087] Em algumas modalidades, U é usado para ligação covalente a X e é um aminoácido natural ou não natural dibásico, um aminoácido natural ou não natural compreendendo um tiol, um aminoácido não natural compreendendo um grupo  $-N_3$ , um aminoácido não natural compreendendo um grupo acetilênico, ou um aminoácido não natural compreendendo um  $-NH-C(=O)-CH_2-Br$  ou uma  $-(CH_2)_m$ -maleimida, em que m é 1-10.

[00088] Em algumas modalidades do produto de peptídeo, o tensoativo é um tensoativo da classe de 1-alkil glicosídeo. Em algumas modalidades do produto de peptídeo, o tensoativo é ligado ao peptídeo por meio de uma ligação de amida.

[00089] Em algumas modalidades do produto de peptídeo, o tensoativo X é compreendido de ácido 1-eicosil beta-D-glucurônico, ácido 1-octadecil beta-D-glucurônico, ácido 1-hexadecil beta-D-glucurônico, ácido 1-tetradecil beta D-glucurônico, ácido 1-dodecil beta D-glucurônico, ácido 1-decil beta-D-glucurônico, ácido 1-octil beta-D-glucurônico, ácido 1-eicosil beta-D-diglucurônico, ácido 1-octadecil beta-D-diglucurônico, ácido 1-hexadecil beta-D-diglucurônico, ácido 1-tetradecil beta-D-diglucurônico, ácido 1-dodecil beta-D-diglucurônico, ácido 1-decil beta-D-diglucurônico, ácido 1-octil beta-D-diglucurônico, ou 1-eicosil beta-D-glicose funcionalizada, 1-octadecil beta-D-glicose, 1-hexadecil beta-D-glicose, 1-tetradecil beta-D-glicose, 1-dodecil beta-D-glicose, 1-decil beta-D-glicose, 1-octil beta-D-glicose, 1-eicosil beta-D-maltosídeo, 1-octadecil beta-D-maltosídeo, 1-hexadecil beta-D-maltosídeo, 1-dodecil beta-D-maltosídeo, 1-decil beta-D-maltosídeo, 1-

octil beta-D-maltosídeo, e similares, e o produto de peptídeo é preparado pela formação de uma ligação entre os grupos anteriormente mencionados e um grupo sobre o peptídeo (por exemplo, um grupo -COOH N<sup>os</sup> grupos anteriormente mencionados e um grupo amino do peptídeo).

[00090] Em algumas modalidades do produto de peptídeo, U é um aminoácido terminal do peptídeo. Em algumas modalidades do produto de peptídeo, U é um aminoácido não terminal do peptídeo. Em algumas modalidades do produto de peptídeo, U é um D- ou L- aminoácido natural. Em algumas modalidades do produto de peptídeo, U é um aminoácido não natural. Em algumas modalidades do produto de peptídeo, U é selecionado de Lys, Cys, Orn, ou um aminoácido não natural que compreende um grupo funcional usado para ligação covalente ao tensoativo X.

[00091] Em algumas modalidades do produto de peptídeo, o grupo funcional usado para ligação covalente do peptídeo ao tensoativo X é –NH<sub>2</sub>, -SH, -OH, -N<sub>3</sub>, haloacetila, uma –(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-maleimida (em que m é 1-10), ou um grupo acetilênico.

[00092] Em algumas modalidades grupos funcionais de cadeia lateral de dois diferentes resíduos de aminoácido são ligados para formar um lactam cíclico. Por exemplo, em algumas modalidades, uma cadeia lateral de Lys forma um lactam cíclico com a cadeia lateral de Glu. Em algumas modalidades tais estruturas de lactam são invertidas e são formadas de um Glu e a Lys. Tais ligações de lactam em alguns casos são conhecidas estabilizarem estruturas alfa helicoidais em peptídeos (Condon, S.M., e outro (2002) Bioorg Med Chem 10: 731-736; Murage, E.N., e outro (2008) Bioorg Med Chem 16: 10106-12; Murage, E.N., e outro (2010) J Med Chem 53: 6412-20). Em algumas modalidades resíduos de cisteína podem ser ligados por meio da formação de dissulfeto a fim de realizar uma forma similar de restrição

conformacional e auxiliar na formação de estruturas helicoidais (Li, Y., e outro (2011) Peptídeos 32: 1400-1407. Em algumas modalidades grupos funcionais de cadeia lateral de dois diferentes resíduos de aminoácido são ligados para formar um heterociclo gerado por meio de uma "reação de clique" entre os grupos funcionais de alcino e azida de cadeia lateral a fim de obter uma forma similar de restrição conformacional e conformações helicoidais estabilizadas (Le Chevalier Isaad A., e outro (2009) J peptídeo Sci 15: 451-4).

[00093] Em algumas modalidades, o produto de peptídeo compreendendo um alquil glicosídeo covalentemente ligado é um glucagon covalentemente modificado ou análogo do mesmo. Em algumas de tais modalidades, o produto de peptídeo contém um ácido 1-O-alkila  $\beta$ -D-glucurônico covalentemente ligado e o peptídeo é um análogo de glucagon.

[00094] Em algumas modalidades, um produto de peptídeo compreendendo um alquil glicosídeo covalentemente ligado é um GLP-1 covalentemente modificado, ou análogo do mesmo. Em algumas de tais modalidades, o produto de peptídeo compreende um ácido 1-O-alkila  $\beta$ -D-glucurônico covalentemente ligado e o peptídeo é um análogo de GLP-1.

[00095] Em algumas modalidades, o produto de peptídeo de Fórmula I-A tem a estrutura de Fórmula III-A

[00096] aa<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-aa<sub>3</sub>-aa<sub>4</sub>-aa<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-aa<sub>7</sub>-aa<sub>8</sub>-aa<sub>9</sub>-aa<sub>10</sub>- aa<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-aa<sub>13</sub>-aa<sub>14</sub>-aa<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-aa<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>- aa<sub>21</sub>-aa<sub>22</sub>-aa<sub>23</sub>-aa<sub>24</sub>-aa<sub>25</sub>-aa<sub>26</sub>-aa<sub>27</sub>-aa<sub>28</sub>-aa<sub>29</sub> -Z Fórmula III-A (**SEQ. ID. Nº. 2**)

em que:

[00097] Z é OH, ou -NH-R<sup>3</sup>, em que R<sup>3</sup> é H, ou C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alkila substituída ou não substituída, ou uma cadeia de PEG de menos do que 10 Da;

[00098] aa<sub>1</sub> é His, N-Ac-His, pGlu-His, ou N-R<sup>3</sup>-His;



- [00099] aa<sub>2</sub> é Ser, Ala, Gly, Aib, Ac4c, ou Ac5c;
- [000100] aa<sub>3</sub> é Gln, ou Cit;
- [000101] aa<sub>4</sub> é Gly, ou D-Ala;
- [000102] aa<sub>5</sub> é Thr, ou Ser;
- [000103] aa<sub>6</sub> é Phe, Trp, F2Phe, Me2Phe, ou Nal2;
- [000104] aa<sub>7</sub> é Thr, ou Ser;
- [000105] aa<sub>8</sub> é Ser, ou Asp;
- [000106] aa<sub>9</sub> é Asp, ou Glu;
- [000107] aa<sub>10</sub> é Tyr, Leu, Met, Nal2, Bip, ou Bip2EtMeO;
- [000108] aa<sub>11</sub> é Ser, Asn, ou U;
- [000109] aa<sub>12</sub> é Lys, Glu, Ser, Arg, ou U(X);
- [000110] aa<sub>13</sub> é ausente ou Tyr, Gln, Cit, ou U(X);
- [000111] aa<sub>14</sub> é ausente ou Leu, Met, Nle, ou U(X);
- [000112] aa<sub>15</sub> é ausente ou Asp, Glu, ou U(X);
- [000113] aa<sub>16</sub> é ausente ou Ser, Gly, Glu, Aib, Ac5c, Lys, Arg, ou U(X);
- [000114] aa<sub>17</sub> é ausente ou Arg, hArg, Gln, Glu, Cit, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000115] aa<sub>18</sub> é ausente ou Arg, hArg, Ala, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);  
aa<sub>19</sub> é ausente ou Ala, Val, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000116] aa<sub>20</sub> é ausente ou Gln, Lys, Arg, Cit, Glu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000117] aa<sub>21</sub> é ausente ou Asp, Glu, Leu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000118] aa<sub>22</sub> é ausente ou Phe, Trp, Nal2, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000119] aa<sub>23</sub> é ausente ou Val, Ile, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000120] aa<sub>24</sub> é ausente ou Gln, Ala, Glu, Cit, ou U(X);
- [000121] aa<sub>25</sub> é ausente ou Trp, Nal2, ou U(X);
- [000122] aa<sub>26</sub> é ausente ou Leu, ou U(X);
- [000123] aa<sub>27</sub> é ausente ou Met, Val, Nle, Lys, ou U(X);
- [000124] aa<sub>28</sub> é ausente ou Asn, Lys, ou U(X);
- [000125] aa<sub>29</sub> é ausente ou Thr, Gly, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

em que quaisquer dois de aa<sub>1</sub>-aa<sub>29</sub> são opcionalmente ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam; e contanto que um, ou pelo menos um de aa<sub>16</sub>, aa<sub>17</sub>, aa<sub>18</sub>, aa<sub>19</sub>, aa<sub>20</sub>, aa<sub>21</sub>, aa<sub>22</sub>, aa<sub>23</sub>, aa<sub>24</sub>, aa<sub>25</sub>, aa<sub>26</sub>, aa<sub>27</sub>, aa<sub>28</sub> ou aa<sub>29</sub> seja o aminoácido natural ou não natural U covalentemente ligado a X.

[000126] Em algumas modalidades, o produto de peptídeo de Fórmula I-A tem a estrutura de Fórmula III-B:

[000127] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-aa<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-aa<sub>10</sub>-aa<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-aa<sub>13</sub>-aa<sub>14</sub>-aa<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-aa<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-aa<sub>21</sub>-aa<sub>22</sub>-aa<sub>23</sub>-Z Fórmula III-B  
**(SEQ. ID. Nº. 3)**

em que:

[000128] Z é OH, ou -NH-R<sup>3</sup>, em que R<sup>3</sup> é H ou substituído ou não substituído C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquila; ou uma cadeia de PEG de menos do que 10Da;

[000129] aa<sub>2</sub> é Ser, Ala, Gly, Aib, Ac4c, ou Ac5c;

[000130] aa<sub>3</sub> é Gln, ou Cit;

[000131] aa<sub>6</sub> é Phe, Trp, F2Phe, Me2Phe, MePhe, ou Nal2;

[000132] aa<sub>10</sub> é Tyr, Leu, Met, Nal2, Bip, ou Bip2EtMeO;

[000133] aa<sub>11</sub> é Ser, Asn, ou U(X);

[000134] aa<sub>12</sub> é Lys, Glu, Ser ou U(X);

[000135] aa<sub>13</sub> é ausente ou Tyr, Gln, Cit, ou U(X);

[000136] aa<sub>14</sub> é ausente ou Leu, Met, Nle, ou U(X);

[000137] aa<sub>15</sub> é ausente ou Asp, Glu, ou U(X);

[000138] aa<sub>16</sub> é ausente ou Ser, Gly, Glu, Aib, Ac4c, Ac5c, Lys, R, ou U(X);

[000139] aa<sub>17</sub> é ausente ou Arg, hArg, Gln, Glu, Cit, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000140] aa<sub>18</sub> é ausente ou Arg, hArg, Ala, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000141] aa<sub>19</sub> é ausente ou Ala, Val, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000142] aa<sub>20</sub> é ausente ou Gln, Lys, Arg, Cit, Glu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou

U(X);

[000143] aa<sub>21</sub> é ausente ou Asp, Glu, Leu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000144] aa<sub>22</sub> é ausente ou Phe, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X)

[000145] aa<sub>23</sub> é ausente ou Val, Ile, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000146] em que quaisquer dois de aa<sub>1</sub>-aa<sub>23</sub> são opcionalmente ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam; e contanto que um, ou pelo menos um de aa<sub>16</sub>, aa<sub>17</sub>, aa<sub>18</sub>, aa<sub>19</sub>, aa<sub>20</sub>, aa<sub>21</sub>, aa<sub>22</sub>, aa<sub>23</sub> ou aa<sub>24</sub> seja o aminoácido natural ou não natural U covalentemente ligado a X.

[000147] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, U é qualquer aminoácido ligante descrito aqui.

[000148] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, aa<sub>12</sub> é lisina. Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, aa<sub>14</sub> é leucina.

[000149] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, aa<sub>18</sub> é um resíduo de lisina ligado a X.

[000150] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, aa<sub>17</sub> é um resíduo de homo Arginina (hArg).

[000151] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, aa<sub>17</sub> é um resíduo de glicina.

[000152] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, aa<sub>2</sub> é um resíduo de Aib ou Ac4c.

[000153] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o peptídeo compreende um ou mais resíduos de Aib.

[000154] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, peptídeo compreende um ou mais resíduos Aib na terminação C.

[000155] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000156] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-

Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>- Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Aib<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 318**) em que

[000157] aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c;

[000158] aa<sub>17</sub> é Arg, hArg ou Gln;

[000159] aa<sub>19</sub> é Aib, Ac4c ou Ac5c; e

[000160] alquila é uma cadeia alquila linear C8 a C20.

[000161] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000162] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Aib<sub>16</sub>- aa<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 319**) em que

[000163] aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c,

[000164] aa<sub>17</sub> é Arg, hArg ou Gln,

[000165] aa<sub>19</sub> e aa<sub>20</sub> são individualmente Aib, Ac4c ou Ac5c; e

[000166] alquila é uma cadeia alquila linear C8 a C20.

[000167] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000168] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- aa<sub>16</sub>- aa<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 320**) em que

[000169] aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c;

[000170] aa<sub>16</sub> é Aib ou Ac4c;

[000171] aa<sub>17</sub> é Arg, hArg ou Gln;

[000172] aa<sub>19</sub> é Aib, Ac4c ou Ac5c; e

[000173] alquila é uma cadeia alquila linear C8 a C20.

[000174] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, aa<sub>16</sub> e aa<sub>20</sub> são ciclizados para formar uma ligação de lactam.

[000175] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000176] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-Ala<sub>18</sub>-Ala<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-Glu<sub>21</sub>-Phe<sub>22</sub>-Ile<sub>23</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>24</sub>-Trp<sub>25</sub>-Leu<sub>26</sub>-aa<sub>27</sub>-Asn<sub>28</sub>-Thr<sub>29</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 321**) em que

[000177] aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c;

[000178] aa<sub>16</sub> e aa<sub>20</sub> são cada qual individualmente ou Lys ou Glu e são ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam;

[000179] aa<sub>17</sub> é Arg, hArg ou Gln;

[000180] aa<sub>27</sub> é Met ou Nle; e

[000181] alquila é uma cadeia alquila linear C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>.

[000182] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000183] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-cíclico (Glu<sub>16</sub>-Gln<sub>17</sub>-Ala<sub>18</sub>-Ala<sub>19</sub>-Lys<sub>20</sub>)-Glu<sub>21</sub>-Phe<sub>22</sub>-Ile<sub>23</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>24</sub>-Trp<sub>25</sub>-Leu<sub>26</sub>-Met<sub>27</sub>-Asn<sub>28</sub>-aa<sub>29</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 322**) em que aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c, aa<sub>29</sub> é Thr, Aib, Ac4c, ou Ac5c, e o grupo 1'-alquila é selecionado de dodecila, tetradecila, hexadecila, ou octadecila; e as cadeias laterais N<sup>os</sup> aminoácidos nas posições 16 e 20 são ciclizados para formar um lactam de cadeia lateral.

[000184] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, aa<sub>12</sub> e aa<sub>16</sub> são ciclizados para formar uma ligação de lactam.

[000185] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000186] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 323**) em que

[000187] aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c;

[000188] aa<sub>12</sub> e aa<sub>16</sub> são cada qual individualmente ou Lys ou Glu e são ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam;

[000189] aa<sub>17</sub> é Arg, hArg;

[000190] aa<sub>19</sub> e aa<sub>20</sub> são individualmente ou Aib, Ac4c ou Ac5c; e

[000191] alquila é uma cadeia alquila linear C8-C20.

[000192] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000193] His<sub>1</sub>-Ac4c<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-ciclo(Glu<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-Lys<sub>16</sub>)-aa<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>18</sub>-Aib<sub>19</sub>-Aib<sub>20</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 324**) em que

[000194] aa<sub>12</sub> e aa<sub>16</sub> são ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam;

[000195] aa<sub>17</sub> é Arg ou hArg; e

[000196] alquila é uma cadeia alquila linear C12, C14, C16, ou C18.

[000197] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000198] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 325**)

em que

[000199] aa<sub>12</sub> e aa<sub>16</sub> são cada qual individualmente ou Lys ou Glu

[000200] e aa<sub>12</sub> e aa<sub>16</sub> são ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam; aa<sub>17</sub> é Arg ou hArg; aa<sub>19</sub> e aa<sub>20</sub> são individualmente ou Aib, Ac4c ou Ac5c; e o grupo 1'-alquila é selecionado de dodecila, tetradecila, hexadecila, ou octadecila.

[000201] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000202] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-Ser<sub>16</sub>-Aib<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-dodecil beta-D-

glucuronila)<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 326**) em que aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c, aa<sub>6</sub> é Me2Phe, MePhe, ou Phe; e aa<sub>19</sub> é Aib, Ac4c, ou Ac5c.

[000203] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000204] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Ser<sub>16</sub>- aa<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-dodecil beta-D-glucuronila)<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 327**) em que aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c, aa<sub>6</sub> é Me2Phe, MePhe, ou Phe; aa<sub>17</sub> é Arg ou hArg, e aa<sub>19</sub> ou aa<sub>20</sub> é Aib, Ac4c, ou Ac5c.

[000205] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000206] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- ciclo(Glu<sub>16</sub>- Arg<sub>17</sub>-Ala<sub>18</sub>- Ala<sub>19</sub>- Lys<sub>20</sub>)-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>21</sub>- Phe<sub>22</sub>- aa<sub>23</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 328**) em que aa<sub>23</sub> é Aib, Ac4c, ou Ac5c e o grupo 1'-alquila é selecionado de dodecila, tetradecila, hexadecila, ou octadecila..

[000207] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000208] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>- Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- aa<sub>16</sub>- aa<sub>17</sub>-aa<sub>18</sub>-Ala<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>21</sub>-Phe<sub>22</sub>-aa<sub>23</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 329**)

em que

[000209] aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c;

[000210] aa<sub>6</sub> é Me2Phe, MePhe, ou Phe;

[000211] aa<sub>12</sub> e aa<sub>16</sub> são cada qual individualmente ou Lys ou Glu;

[000212] e aa<sub>16</sub> e aa<sub>20</sub> são ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam;

[000213] aa<sub>17</sub> é Arg, hArg ou Gln;

[000214] aa<sub>18</sub> é Aib ou Ala;

[000215] aa<sub>23</sub> é Aib, Ac4c, ou Ac5c e o grupo 1'-alquila é selecionado

de dodecila, tetradecila, hexadecila, ou octadecila.

[000216] Em algumas modalidades de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, o produto de peptídeo tem a estrutura:

[000217] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-Lys(N-ômega-1'-alquila beta-D-glucuronila)<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-NH<sub>2</sub>; (**SEQ. ID. Nº. 330**)

em que

[000218] aa<sub>2</sub> é Aib ou Ac4c;

[000219] aa<sub>6</sub> é Phe;

[000220] aa<sub>12</sub> e aa<sub>16</sub> são cada qual individualmente ou Lys ou Glu; e aa<sub>12</sub> e aa<sub>16</sub> são ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam;

[000221] aa<sub>17</sub> é Arg ou hArg;

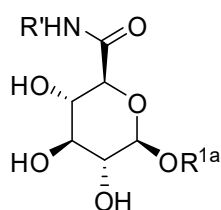
[000222] aa<sub>19</sub> é Aib, Ac4c, ou Ac5c;

[000223] aa<sub>20</sub> é Aib, Ac4c, ou Ac5c e the e o grupo 1'-alquila é selecionado de dodecila, tetradecila, hexadecila, ou octadecila.

[000224] Em algumas modalidades, para qualquer composto de Fórmula I-A, Fórmula III-A, Fórmula III-B ou Fórmula V, X é compreendido de uma cadeia dodecil alquila.

[000225] Em algumas modalidades, o produto de peptídeo é um produto de peptídeo biologicamente ativo que se liga ao GLP1R e/ou ao GLCR.

[000226] Em uma modalidade específica, os produtos de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V, descritos acima e aqui têm a seguinte estrutura:

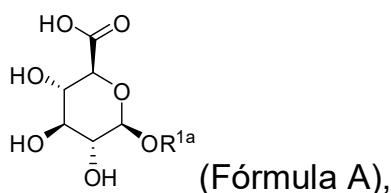


[000227] em que R<sup>1a</sup> é uma cadeia C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquila como descrito na Tabela 1 de Figura 1, R' é um peptídeo como descrito na Tabela 1 de



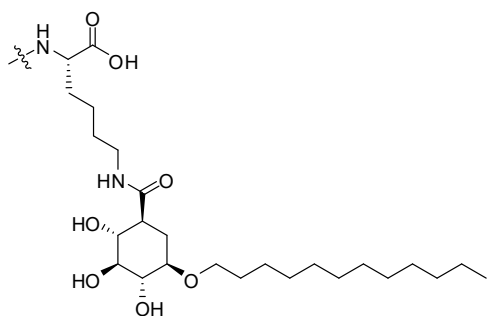
Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2,  $W^2$  de Fórmula I-A é  $-O-$ , e  $W^1$  de Fórmula I-A é  $-(C=O)NH-$  e é parte de uma ligação de amida ao peptídeo  $R'$ . Em algumas de tais modalidades,  $R^{1a}$  é uma cadeia  $C_6-C_{20}$  alquila. Em algumas de tais modalidades,  $R^{1a}$  é uma cadeia  $C_8-C_{20}$  alquila. Em algumas de tais modalidades,  $R^{1a}$  é uma cadeia  $C_{12}-C_{20}$  alquila. Em algumas de tais modalidades,  $R^{1a}$  é uma cadeia  $C_{12}-C_{16}$  alquila.

[000228] Em modalidades descritas acima, uma porção amino de um aminoácido e/ou um peptídeo  $R'$  (por exemplo, um grupo amino de um resíduo de aminoácido tal como a Lisina, ou um resíduo de lisina dentro do peptídeo  $R'$ ) é usada para formar uma ligação covalente com um composto de Estrutura:



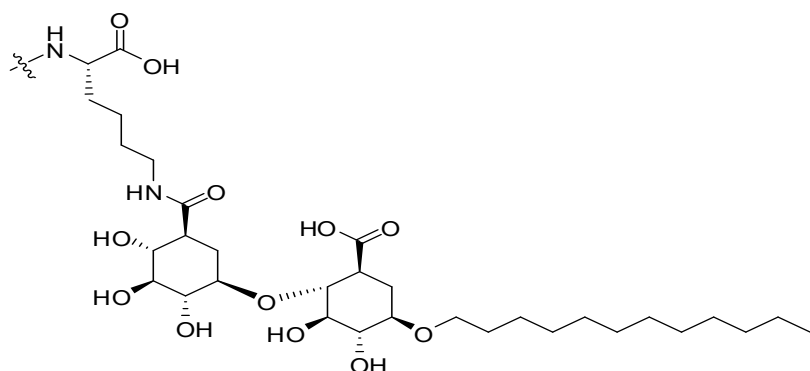
[000229] em que  $R^{1a}$  é uma cadeia  $C_1-C_{20}$  alquila como descrito acima e na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2.

[000230] Em tais casos, o resíduo de aminoácido tendo uma porção amino (por exemplo, uma Lisina dentro do peptídeo  $R'$ ) que é usada para formar uma ligação covalente ao composto A descrito acima, é um aminoácido U ligante que é ligado a um tensoativo X tendo a estrutura de Fórmula A. Consequentemente, como um exemplo, Lys(C12) de Tabela 1 de Figura 1 ou Tabela 2 de Figura 2 tem a seguinte estrutura:



[000231] Também contemplado dentro do escopo das modalidades

apresentadas aqui são os produtos de peptídeo de Fórmula I-A derivados de tensoativos com base em ácido maltourônico através da ligação em qualquer ou ambas as funções de ácido carboxílico. Desse modo, como um exemplo, peptídeos na Tabela 1 de Figura 1 ou Tabela 2 de Figura 2 compreendem um aminoácido ligante de lisina ligado a um tensoativo X com base em ácido maltourônico e tendo a estrutura:



[000232] Será entendido que em uma modalidade, compostos de Fórmula I-A são preparados ligando-se uma lisina a um grupo X, seguido pela ligação de resíduos de aminoácido adicionais e/ou peptídeos são ligados ao composto X-lisina para obter compostos de Fórmula I-A. Será entendido que outros aminoácidos naturais ou não naturais descritos aqui são também adequados para ligação ao tensoativo X e são adequados para ligar adicionais aminoácidos/peptídeos para obter compostos de Fórmula I-A. Será entendido que em outra modalidade, compostos de Fórmula I-A são preparados para ligar um peptídeo de tamanho total ou tamanho parcial a um grupo X, seguido por ligação opcional de resíduos adicionais de aminoácido e/ou peptídeos são ligados para obter compostos de Fórmula I-A.

[000233] Em uma modalidade específica, é fornecido aqui um composto selecionado de compostos de Tabela 1 de Figura 1 ou Tabela 2 de Figura 2.

[000234] São também fornecidas aqui composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um

produto de peptídeo descrito acima, ou sal aceitável do mesmo, e pelo menos um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[000235] Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, o veículo é um veículo com base aquosa. Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, o veículo é um veículo com base não aquosa. Em algumas modalidades das composições farmacêuticas, o veículo com base não aquosa é um solvente semelhante ao hidrofluoroalcano que pode compreender  $\alpha$ -lactose anidrosa submícron ou outros excipientes.

[000236] É contemplada dentro do escopo das modalidades apresentadas aqui a reação de um aminoácido e/ou um peptídeo compreendendo um aminoácido U ligante transportando um nucleófilo, e um grupo X compreendendo um transporte de um grupo de saída ou um grupo funcional que pode ser ativado para conter um grupo de saída, por exemplo, um ácido carboxílico, ou qualquer outro grupo de reação, desse modo provendo ligação covalente do aminoácido e/ou peptídeo a um tensoativo X por meio do aminoácido ligante U para fornecer um produto de peptídeo de Fórmula I-A.

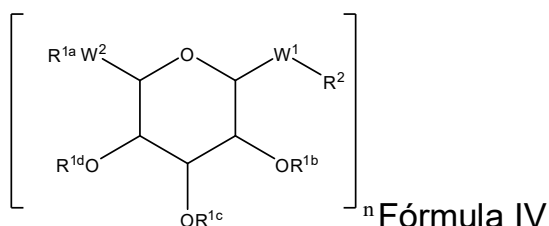
[000237] Também contemplado dentro do escopo de modalidades apresentadas aqui é a reação de um aminoácido e/ou um peptídeo compreendendo um aminoácido U ligante transportando um grupo de saída ou um grupo funcional que pode ser ativado para conter um grupo de saída, por exemplo, um ácido carboxílico, ou qualquer outro grupo de reação, e um grupo X compreendendo um grupo nucleofílico, desse modo provendo ligação covalente do aminoácido e/ou peptídeo a um tensoativo X por meio do aminoácido ligante U para fornecer um produto de peptídeo de Fórmula I-A.

[000238] Será entendido que, em uma modalidade, compostos de Fórmula I-A são preparados por reação de um aminoácido U ligante com X, seguido pela adição de outros resíduos a U para obter o produto de

peptídeo de Fórmula I-A. Será entendido que em uma modalidade alternativa, compostos de Fórmula I-A são preparados por reação de um peptídeo adequado compreendendo um aminoácido U ligante com X, seguido por adição opcional de outros resíduos a U, para obter o produto de peptídeo de Fórmula I-A.

[000239] São também fornecidos aqui métodos para sintetizar produtos de peptídeo descritos acima, compreendendo etapas sequenciais de

(a) Acoplamento de um peptídeo com um intermediário, isto é, um composto de Fórmula IV:



em que:

[000240]  $R^{1a}$  é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo de saída, um grupo de proteção, um aminoácido natural ou não natural, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída;

[000241]  $R^{1b}$ ,  $R^{1c}$ , e  $R^{1d}$  são cada qual independentemente, em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo de saída, um grupo de proteção, um aminoácido natural ou não natural reversivelmente protegido, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída;

[000242]  $W^1$  é  $-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-$ ,  $-(C=O)$ ,  $-(C=O)-O-$ ,  $-(C=O)-NH-$ ,  $-(C=S)-$ ,  $-(C=S)-NH-$ , ou  $-CH_2-S-$ ;

[000243]  $W^2$  é  $-O-$ ,  $-CH_2-$  ou  $-S-$ ;

[000244]  $R^2$  é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação,

H, um grupo de saída, um grupo de proteção, um aminoácido natural ou não natural reversivelmente protegido, um grupo  $C_1-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída,  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $C_2-C_4$ -alceno,  $C_2-C_4$ -alcino,  $-NH(C=O)-CH_2-Br$ ,  $-(CH_2)_m$  - maleimida, ou  $-N_3$ ;

[000245]  $n$  é 1, 2 ou 3;

[000246]  $m$  é 1-10;

e

(b) opcionalmente desproteger o peptídeo acoplado de etapa (a).

[000247] Em algumas modalidades dos métodos, cada aminoácido natural ou não natural é independentemente, em cada ocorrência, um aminoácido ligante reversivelmente protegido. Em algumas modalidades dos métodos, cada aminoácido natural ou não natural é independentemente, em cada ocorrência, uma lisina reversivelmente protegida ou livre.

[000248] Em algumas modalidades dos métodos, o peptídeo é um peptídeo de Fórmula II como descrito acima.

[000249] Em algumas modalidades dos métodos,

[000250]  $n$  é 1;

[000251]  $W^1$  é  $-(C=O)-$ ;

[000252]  $R^{1a}$  é um grupo  $C_1-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo 1-alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo 1-aralquila substituída ou não substituída,

[000253]  $R^2$  é uma lisina reversivelmente protegida de configuração D ou L.

[000254] Em algumas modalidades dos métodos,

[000255]  $n$  é 1;

[000256]  $W^1$  é  $-(C=O)-$ ;

[000257]  $R^{1a}$  é um grupo  $C_8-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo 1-alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo 1-aralquila substituída ou não substituída,

[000258]  $R^2$  é uma lisina reversivelmente protegida de configuração D ou L.

[000259] Em algumas modalidades dos métodos,  $R^{1a}$  é um grupo octila, decila, dodecila, tetradecila, ou hexadecila.

[000260] Em algumas modalidades dos métodos,

[000261]  $n$  é 1;

[000262]  $W^1$  é  $-(C=O)-NH-$  ou  $-(C=O)-O-$ ;

[000263]  $R^2$  é um grupo hidrofóbico  $C_1-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo 1-alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo 1-aralquila substituída ou não substituída,

[000264]  $R^{1a}$  é uma serina ou treonina reversivelmente protegida de configuração D ou L.

[000265] Em algumas modalidades dos métodos,  $R^2$  é um grupo octila, decila, dodecila, tetradecila ou hexadecila.

[000266] Em algumas modalidades dos métodos,

[000267]  $n$  é 1;

[000268]  $m$  é 1-6;

[000269]  $W^1$  é  $-CH_2-$ ;

[000270]  $R^{1a}$  é um grupo hidrofóbico  $C_1-C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo 1-alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo 1-aralquila substituída ou não substituída,

[000271]  $R^2$  é  $-N_3$ ,  $NH_2$ ,  $-C_2$ -alcino,  $-(CH_2)_m$ -maleimida,  $NH-(C=O)-CH_2-Br$ , ou  $NH-(C=O)-CH_2-I$ .

[000272] Em algumas modalidades de Fórmula IV,

[000273]  $n$  é 1;

[000274]  $W^1$  é  $-(C=O)-O-$ ;

[000275]  $R^2$  é H,

[000276]  $R^{1a}$  é um grupo hidrofóbico  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída.

[000277] Em algumas modalidades dos métodos,  $W^1$  é  $-(CH_2)O$ . Em algumas modalidades dos métodos,  $n$  é 1. Em algumas modalidades dos métodos,  $n$  é 2, e um primeiro glicosídeo é ligado a um segundo glicosídeo por meio de ligação entre  $W^2$  do primeiro glicosídeo e qualquer um de  $OR^{1b}$ ,  $OR^{1c}$  ou  $OR^{1d}$  do segundo glicosídeo.

[000278] Em algumas modalidades dos métodos,  $n$  é 3, e um primeiro glicosídeo é ligado a um segundo glicosídeo por meio de ligação entre  $W^2$  do primeiro glicosídeo e qualquer um de  $OR^{1b}$ ,  $OR^{1c}$  ou  $OR^{1d}$  do segundo glicosídeo, e o segundo glicosídeo é ligado a um terceiro glicosídeo por meio de ligação entre  $W^2$  do segundo glicosídeo e qualquer um de  $OR^{1b}$ ,  $OR^{1c}$  ou  $OR^{1d}$  do terceiro glicosídeo.

[000279] Em algumas modalidades dos métodos, o composto de Fórmula IV é uma N- $\epsilon$ -(1'-alquila glucuronila)-lisina reversivelmente protegida da configuração D ou L, em que  $R^{1a}$  é uma cadeia  $C_1$ - $C_{20}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo 1-alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo 1-aralquila substituída ou não substituída.

[000280] Em algumas modalidades dos métodos, o composto de Fórmula IV é N- $\epsilon$ -(1'-dodecil  $\beta$ -D-glucuronila)-lisina uma reversivelmente protegida da configuração D ou L.

[000281] Em algumas modalidades dos métodos, a desproteção compreendendo o uso de tratamentos com ácido suave e ou base suave. Em algumas modalidades dos métodos, a desproteção compreendendo o uso de ácidos fortes.

[000282] Em algumas modalidades, os métodos também compreendem as etapas de cromatografia, dessalinização de intermediários por cromatografia líquida de alto desempenho, de fase reversa ou cromatografia de intermediários por permuta de íon.

[000283] Uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito acima e aqui, ou sal aceitável do mesmo, e pelo menos um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[000284] É fornecido aqui um método para tratar uma condição associada com resistência à insulina compreendendo a administração de qualquer composto descrito aqui a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[000285] São fornecidos aqui métodos para tratar diabetes, retinopatia diabética, neuropatia diabética, nefropatia diabética, cicatrização de ferimento, resistência à insulina, hiperglicemia, hiperinsulinemia, síndrome metabólica, complicações diabéticas, níveis sanguíneos elevados de ácidos graxos livres ou glicerol, hiperlipidemia, obesidade, hipertrigliceridemia, aterosclerose, síndrome cardiovascular aguda, infarto, reperfusão isquêmica ou hipertensão, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito acima e aqui a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[000286] São fornecidos aqui métodos de reduzir o ganho de peso ou induzir a perda de peso compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito acima e aqui a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[000287] São fornecidos aqui métodos para tratar condições mamíferas caracterizadas pela resistência à insulina ligada à obesidade ou a síndrome metabólica compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo, uma quantidade de um produto de peptídeo descrito acima e aqui para indução da perda de peso ou sensibilização de insulina, a um indivíduo em necessidade disso.

[000288] Em algumas modalidades, a condição a ser tratada é a



síndrome metabólica (Síndrome X). Em algumas modalidades, a condição a ser tratada é diabetes. Em algumas modalidades, a condição a ser tratada é hiperlipidemia. Em algumas modalidades, a condição a ser tratada é hipertensão. Em algumas modalidades, a condição a ser tratada é doença vascular incluindo aterosclerose, ou a inflamação sistêmica caracterizada por proteína reativa C elevada.

[000289] Em algumas modalidades dos métodos, a quantidade eficaz do produto de peptídeo para administração é de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 100,0 µg/kg/dia, ou de 0,01 µg/kg/dia a cerca de 1 mg/kg/dia ou de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 50 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o produto de peptídeo é administrado parenteralmente. Em algumas modalidades, o produto de peptídeo é administrado subcutaneamente. Em algumas modalidades, o método de administração do produto de peptídeo é insuflação nasal.

[000290] Será entendido, entretanto, que o nível de dose específico e frequência de dosage para qualquer indivíduo particular em necessidade de tratamento pode ser variado e dependerá de uma variedade de fatores incluindo a atividade do composto específico empregado, a estabilidade metabólica e duração de ação daquele composto, a idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, modo e tempo de administração, taxa de excreção, combinação de fármaco, a severidade da condição particular, e o hospedeiro que está passando por terapia.

[000291] São fornecidos aqui métodos de tratar a síndrome metabólica, ou suas doenças componentes, compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito acima. Em algumas modalidades, a condição de síndrome metabólica tem progredido para diabetes.

[000292] É também fornecido aqui um peptídeo de ligação a GLCR

e/ou GLP1R covalentemente modificado ou análogo do mesmo, compreendendo um grupo hidrofílico como descrito aqui; e um grupo hidrofóbico covalentemente ligado ao grupo hidrofílico. Em modalidades específicas, o produto de proteína e/ou peptídeo covalentemente modificado compreende um grupo hidrofílico que é um sacarídeo e um grupo hidrofóbico que é uma cadeia C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquila ou uma cadeia aralquila.

[000293] Em uma modalidade, é fornecido um método para quimicamente modificar uma molécula por ligação covalente a um tensoativo para aumentar ou manter a biological ação da composição ou molécula, por exemplo, atividade enzimática ou de ligação ao receptor. Em algumas modalidades, a molécula é um peptídeo. O método adicionalmente pode incluir outra modificação compreendendo ligação covalente da molécula na composição a um polímero tal como polietileno glicol.

[000294] Em outra modalidade, é fornecido um método de reduzir ou eliminar imunogenicidade de um fármaco de proteína e/ou peptídeo covalentemente ligando a cadeia de peptídeo a pelo menos um alquil glicosídeo em que a alquila tem de 1 a 30 átomos de carbono.

[000295] É também fornecido um método de tratamento de condições associadas com resistência à insulina incluindo e não limitadas à obesidade, a síndrome metabólica, diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose ou similares, compreendendo administrar uma composição de fármaco compreendendo um peptídeo covalentemente ligado a pelo menos um alquil glicosídeo e liberado para um vertebrado, em que a alquila tem de 1 a 30 átomos de carbono, 1 a 20 carbonos, ou ademais na faixa de 6 a 16 átomos de carbono, ou 6 a 18 carbonos, e em que ligação covalente do alquil glicosídeo ao peptídeo aumenta a estabilidade, biodisponibilidade e/ou duração de ação do fármaco.

[000296] É também fornecido aqui o uso de um produto de peptídeo

descrito aqui (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, Fórmula III-A, Fórmula III-B, ou Fórmula V) para a fabricação de um medicamento para o tratamento de qualquer condição descrita acima e aqui.

### **Breve Descrição das Figuras**

[000297] **Figura 1** A Tabela 1 na Figura 1 representa compostos que foram preparados por métodos descritos aqui. O relatório descritivo fornece sequências para SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 1-3 e SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 318-343. Adicionalmente, a Tabela 1 de Figura 1 fornece SEQ. ID. Números para os compostos EU-A300 a EU-A425 tendo SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 4-129 respectivamente, como mostrado na Tabela 1 de Figura 1. Compostos na Tabela 1 de Figura 1, e suas respectivas SEQ. ID. N<sup>os</sup>. mostradas na Tabela 1 de Figura 1 são pelo presente incorporados no relatório descritivo como depositado.

[000298] **Figura 2** A Tabela 2 na Figura 2 representa compostos que foram preparados por métodos descritos aqui. O relatório descritivo fornece SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 1-3 e SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 318-343. Adicionalmente, Tabela 2 de Figura 2 fornece SEQ. ID. Números para os compostos EU-A426 a EU-599 tendo SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 130-317 respectivamente, como mostrado na Tabela 2 de Figura 2. Compostos na Tabela 2 de Figura 2, e suas respectivas SEQ. ID. N<sup>os</sup>. mostradas na Tabela 2 de Figura 2 são pelo presente incorporados no relatório descritivo como depositado.

[000299] **Figura 3 A** Figura 3 ilustra a estrutura cristal de raio-X (Runge, S., e outro (2008) J Biol Chem 283: 11340-7) do sítio de ligação do domínio extracelular do receptor de GLP-1 e ilustra elementos de ligação hidrofóbica crítica do receptor e a exendina-4 de ligante (Val<sup>19\*</sup>, Phe<sup>22\*</sup>, Trp<sup>25\*</sup>, Leu<sup>26\*</sup>) que são imitados e substituídos pela porção de 1'-alquila hidrofóbica do tensoativo N<sup>os</sup> peptídeos da invenção.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[000300] São descritos aqui certos peptídeos e/ou proteínas

covalentemente modificados com propriedades farmacêuticas melhoradas. São também fornecidos aqui métodos para uso dos peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados para o tratamento de distúrbios relacionados com a obesidade e a síndrome metabólica.

[000301] Em algumas modalidades, as proteínas e/ou peptídeos modificados compreendem um peptídeo e/ou proteína covalentemente ligado a um grupo hidrofílico, um "cabeça" (por exemplo, um poliol, (por exemplo, um sacarídeo)); o grupo hidrofílico é covalentemente ligado a um grupo hidrofóbico, uma "cauda", desse modo gerando um tensoativo. Em algumas modalidades, o uso de porções de tensoativo de glicosídeo ligado a hidrofóbico (por exemplo, alquil glicosídeo) para modificação covalente dos peptídeos ou proteínas (por exemplo, glucagon ou Peptídeos relacionados com GLP-1 ou similares), prolonga a duração de ação dos peptídeos e/ou proteínas por múltiplos mecanismos, incluindo a formação de depósitos do fármaco no sítio de administração no corpo e ligação a proteínas portadoras hidrofóbicas. Em algumas modalidades, a incorporação de impedimento estérico dentro da estrutura de proteína e/ou proteína pode impedir o acesso de proteases ao produto de peptídeo e/ou proteína e desse modo prevenir a proteólise. Em algumas modalidades, modificação de tensoativo (por exemplo, ligação covalente de classe de alquil glicosídeo de tensoativos) de peptídeos e/ou proteínas como descrito aqui, aumenta o transporte através das barreiras mucosais. Consequentemente, as modificações dos peptídeos e/ou proteínas descritos aqui fornecem benefícios desejáveis incluindo e não limitados a, proteção de proteólise, e movimento retardado a partir do sítio de administração, desse modo levando ao comportamento farmacocinético prolongado (por exemplo, prolongação de circulação  $t_{1/2}$ ) e biodisponibilidade transmucosal melhorada.

[000302] Em algumas modalidades, a interação dos peptídeos e/ou proteínas melhorados com seus receptores é modificada de modos benéficos pela truncação da sequência, introdução de restrição e/ou a incorporação de impedimento estérico. São descritos aqui novos reagentes de alquil glicosídeo que proveem a incorporação tanto de rigidez quanto impedimento estérico nas proteínas e/ou peptídeos modificados. Em algumas modalidades, o impedimento estérico confere seletividade de receptor às proteínas e/ou peptídeos modificados descritos aqui. Em algumas modalidades, o impedimento estérico fornece proteção de proteólise.

[000303] Proteínas e peptídeos sofrem numerosas mudanças físicas e químicas que podem afetar a potência e segurança. Entre estas estão a agregação, que inclui dimerização, trimerização, e a formação de agregados de ordem superior, tais como amiloides. Agregação é um resultado chave que acompanha múltiplos efeitos potencialmente deletérios para produtos terapêuticos com base em peptídeo e/ou proteína, incluindo perda de eficácia, farmacocinéticos alterados, estabilidade reduzida ou vida de prateleira do produto, e indução de imunogenicidade indesejável. Biodisponibilidade e farmacocinéticos de um peptídeo de autoassociação podem ser influenciados por tamanho do agregado e a facilidade de rompimento das interações intermoleculares não covalentes no sítio subcutâneo (Maji, S.K., e outro (2008) PLoS Biol 6: e17). Em alguns casos, peptídeos podem agregar-se em depósitos subcutâneos que se desassociam com  $t_{1/2}$  de 30 ou mais dias. Tal dissolução lenta pode levar a efeitos favoráveis, tal como liberação durante um mês de uma única injeção sc causes uma concentração sanguínea tão baixa que o peptídeo aparece inativo in vivo. Desse modo, em alguns casos, a agregação hidrofóbica torna impossível uma biodisponibilidade e eficácia do peptídeo (Clodfelter, D.K., e outro (1998) Pharm Res 15: 254-262). Os produtos de peptídeo

modificados são descritos aqui ligados a tensoativo e são opcionalmente designados para permitir ou a interferência com a agregação, ou agregação realçada, como desejado.

[000304] Frequentemente oligossacarídeos de ocorrência natural que são covalentemente ligados a proteínas não têm caráter tensoativo. Em algumas modalidades, produtos de peptídeo e/ou proteína descritos aqui têm um sacarídeo covalentemente ligado e um grupo hidrofóbico adicional que confere caráter tensoativo aos peptídeos modificados, desse modo provendo a regulação de biodisponibilidade, imunogenicidade, e/ou comportamento farmacocinético dos peptídeos modificados por tensoativo.

[000305] Proteínas e peptídeos modificados com oligossacarídeos são descritos em, por exemplo, Jensen, K.J. e Brask, J. (2005) *Biopolymers* 80: 747-761, através da incorporação de estruturas de sacarídeo ou oligossacarídeo usando métodos enzimáticos (Gijssen, H.J., e outro (1996) *Chem Rev* 96: 443-474; Sears, P. e Wong, C.H. (1998) *Cell Mol Life Sci* 54: 223-252; Guo, Z. e Shao, N. (2005) *Med Res Rev* 25: 655-678) ou químicos (Urge, L., e outro (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 184: 1125-1132; Salvador, L.A., e outro (1995) *Tetrahedron* 51: 5643-5656; Kihlberg, J., e outro (1997) *Methods Enzymol* 289: 221-245; Gregoriadis, G., e outro (2000) *Cell Mol Life Sci* 57: 1964-1969; Chakraborty, T.K., e outro (2005) *Glycoconj J* 22: 83-93; Liu, M., e outro (2005) *Carbohydr Res* 340: 2111-2122; Payne, R.J., e outro (2007) *J Am Chem Soc* 129: 13527-13536; Pedersen, S.L., e outro (2010) *Chembiochem* 11: 366-374). Peptídeos bem como proteínas foram modificados por glicosilação (Filira, F., e outro (2003) *Org Biomol Chem* 1: 3059-3063); (Negri, L., e outro (1999) *J Med Chem* 42: 400-404); (Negri, L., e outro (1998) *Br J Pharmacol* 124: 1516-1522); Rocchi, R., e outro (1987) *Int J Pept Proteína Res* 29: 250-261; Filira, F., e outro (1990) *Int J Biol Macromol* 12: 41-49; Gobbo, M., e outro (1992) *Int J*

Pept Proteína Res 40: 54-61; Urge, L., e outro (1992) Biochem Biophys Res Commun 184: 1125-1132; Djedaini-Pilard, F., e outro (1993) Tetrahedron Lett 34: 2457 - 2460; Drouillat, B., e outro (1997) Bioorg Med Chem Lett 7: 2247-2250; Lohof, E., e outro (2000) Angew Chem Int Ed Engl 39: 2761-2764; Gruner, S.A., e outro (2001) Org Lett 3: 3723-3725; Pean, C., e outro (2001) Biochim Biophys Acta 1541: 150-160; Filira, F., e outro (2003) Org Biomol Chem 1: 3059-3063; Grotenbreg, G.M., e outro (2004) J Org Chem 69: 7851-7859; Biondi, L., e outro (2007) J Pept Sci 13: 179-189; Koda, Y., e outro (2008) Bioorg Med Chem 16: 6286-6296; Yamamoto, T., e outro (2009) J Med Chem 52: 5164-5175).

[000306] Entretanto, as tentativas anteriormente mencionadas não descrevem um grupo hidrofóbico adicional ligado ao oligossacarídeo ligado a peptídeo. Consequentemente, são fornecidos aqui peptídeos e/ou proteínas modificados que incorporam um grupo hidrofóbico ligado a um sacarídeo e/ou oligossacarídeo que é covalentemente ligado ao peptídeo e/ou proteína e que provê a regulação de biodisponibilidade, imunogenicidade e comportamento farmacocinético. Consequentemente, são também fornecidos aqui reagentes tensoativos compreendendo um oligossacarídeo e um grupo hidrofóbico, que provê modificação covalente de peptídeos e/ou proteínas tal como, por exemplo, glucagon e/ou GLP-1 e/ou análogos dos mesmos.

[000307] É fornecido aqui o uso de tensoativos com base em sacarídeo em ligação covalente a um peptídeo para melhora das propriedades de peptídeo e/ou proteína. Em algumas modalidades, a modificação de tensoativo (por exemplo, ligação covalente de classe de alquil glicosídeo de tensoativos) de peptídeos e/ou proteínas como descrito aqui, aumenta o transporte através das barreiras mucosais. Em algumas modalidades, ligação covalente de um tensoativo a um produto de peptídeo e/ou proteína reduz ou impede a agregação do peptídeo

e/ou proteína. Em algumas modalidades, os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados são glucagon covalentemente modificados ou peptídeos GLP-1, ou análogos do mesmo, que são modificados para melhorar suas propriedades farmacêuticas e médicas por modificação covalente com porções tensoativas de alquil glicosídeo. Estes análogos modificados por tensoativo têm impedimento estérico aumentado que impede a proteólise, retarda a captação e retarda a depuração do corpo. [000308] Em certos casos, os efeitos de tensoativos são benéficos com respeito às propriedades físicas ou desempenho de formulações farmacêuticas, porém são irritantes à pele e/ou outros tecidos e em particular são irritantes às membranas mucosais tais como aquelas encontradas nas áreas do nariz, boca, olho, vagina, reto, bucal ou sublingual. Adicionalmente, em alguns casos, tensoativos denaturam proteínas, desse modo destruindo sua função biológica. Visto que os tensoativos exercem seus efeitos acima da concentração de micela crítica (CMC), tensoativos com baixas CMC's são desejáveis, de modo que eles possam ser utilizados com eficácia em baixas concentrações ou em pequenas quantidades em formulações farmacêuticas. Consequentemente, em algumas modalidades, tensoativos (por exemplo, alquil glicosídeos) adequados para modificações de peptídeo descritas aqui têm a CMC menor do que cerca de 1 mM em água pura ou em soluções aquosas. A título de exemplo apenas, certos valores CMC para alquil glicosídeos em água são: Octil maltosida 19,5 mM; Decil maltosida 1,8 mM; Dodecil- $\alpha$ -D-maltosida 0,17 mM; Tridecil maltosida 0,03 mM; Tetradecil maltosida 0,01 mM; dodecanoato de sacarose 0,3 mM. Será apreciado que um tensoativo adequado possa ter uma CMC maior ou menor, dependendo do peptídeo e/ou proteína que é modificado. Como usado aqui, "Concentração de Micela Crítica" ou "CMC" é a concentração de um componente anfifílico (alquil glicosídeo) em solução na qual a formação de micelas (micelas



esféricas, bastões redondos, estruturas lamelares etc.) na solução é iniciada. Em certas modalidades, os alquil glicosídeos dodecila, tridecil e tetradecil maltosida ou glicosídeo, bem como dodecanoato, tridecanoato, e tetradecanoato de sacarose, possuem menores CMC's e são adequados para modificações de peptídeo e/ou proteína descritas aqui.

### **Resistência à Insulina**

[000309] Os riscos associados com hiperglicemia prolongada incluem um risco aumentado de complicações microvasculares, neuropatia sensorial, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, mortalidade macrovascular, e mortalidade de toda e qualquer causa. Diabetes tipo 2 está também ligada causalmente com a obesidade, uma epidemia global adicional. Pelo menos \$232 bilhões foram despendidos com tratamento e prevenção de diabetes mundialmente em 2007, com três quartos daquela quantidade despendida em países industrializados no tratamento de complicações a longo prazo e em cuidados gerais, tais como esforços para prevenir complicações micro e macrovasculares. Em 2007, custos indiretos estimados de diabetes (incapacidade, perda de produtividade, e morte prematura devido à diabetes) para os Estados Unidos foram de \$58 bilhões.

[000310] A obesidade leva à resistência à insulina, uma capacidade diminuída das células no corpo reagirem à estimulação da insulina por meio de números diminuídos de receptores de insulina e um acoplamento diminuído daqueles receptores a sistemas de sinalização intracelular críticos. O estado obeso também leva à "síndrome metabólica", uma constelação de doenças (resistência à insulina, hipertensão, aterosclerose, e outro) com muito grandes consequências de cuidados com a saúde. Se a resistência à insulina for diagnosticada suficientemente cedo, diabetes tipo 2 declarada pode ser prevenida ou retardada, com intervenções de estilo de vida reduzindo a ingestão de

caloria e gordura corporal e por meio de tratamento com fármaco para normalizar o controle glicêmico. Apesar de normas de tratamento que recomendam intervenção precoce, agressiva, muitos pacientes não reagem a alvos para controle glicêmico. Muitos fatores contribuem para a falência do controle da diabetes tipo 2 bem-sucedidamente, incluindo influências psicossociais e econômicas e deficiências na eficácia, conveniência e perfis de tolerabilidade fármacos antidiabéticos disponíveis. Os produtos de peptídeo e/ou proteína são descritos aqui designados para superar estas deficiências.

### **Efeito de Incretina**

[000311] O "efeito de incretina" é usado para descrever o fenômeno por meio do qual a carga de glicose liberada oralmente produz uma secreção de insulina muito maior do que a mesma carga de glicose administrada intravenosamente. Este efeito é mediado por pelo menos dois hormônios de incretina secretados pelas células I intestinais. Polipeptídeo insulínico dependente da glicose (GIP) e peptídeo 1 semelhantes ao glucagon (GLP-1) foram identificados como incretinas e acredita-se que indivíduos saudáveis possam derivar até 70% de sua resposta secretória de insulina prandial do efeito de incretina.

[000312] Normalmente os peptídeos de incretina são secretados quando necessário, em resposta a nutrientes ingeridos, e têm uma meia-vida de plasma curta, devido à degradação pela enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-4). Em pessoas com diabetes tipo 2, sensibilidade pancreática ao GLP-1 é prejudicada, porém a resposta secretória de insulina pode ser restaurada com doses farmacológicas de GLP-1 humano (Kieffer, T.J., e outro (1995) *Endocrinology* 136: 3585-3596). Além disso, GLP-1 promove a neogênese e preservação de célula beta (Aaboe, K., e outro (2008) *Diabetes Obes Metab* 10: 994-1003). O GLP-1 tem efeitos benéficos adicionais, tais como sobre a função cardíaca: por exemplo, ele melhora a função ventricular esquerda (Sokos, G.G., e

outro (2006) J Card Fail 12: 694-699) em indivíduos humanos. O GLP-1 também retarda o esvaziamento gástrico em humanos e reduz o apetite (Toft-Nielsen, M.B., e outro (1999) Diabetes Care 22: 1137-1143).

[000313] Tratamento de pacientes de diabetes com análogos de GLP-1 metabolicamente estáveis e de longa ação é descrito em, por exemplo, Drab, S.R. (2010) Pharmacotherapy 30: 609-624, sofre de questões relacionadas com a conveniência de uso e efeitos colaterais tais como a náusea, risco de pancreatite e carcinoma da tireoide. Análogos de GLP-1 fornecem estimulação da secreção de insulina dependente de glicose e leva a um risco reduzido de hipoglicemia. Além disso, enquanto diversos tratamentos em curso para diabetes causam ganho de peso, como descrito abaixo, os análogos de GLP-1 induzem a saciedade e uma suave perda de peso. Consequentemente, em algumas modalidades, são fornecidos aqui análogos de GLP-1 que são de longa ação e são administrados em baixas doses, desse modo reduzindo os efeitos colaterais associados com os tratamentos em curso.

[000314] Diversos hormônios de intestino de peptídeo são conhecidos modularem o apetite (Sanger, G.J. e Lee, K. (2008) Nat Rev Drug Discov 7: 241-254). Diversos peptídeos são derivados de processamento enzimático, específico de tecido (prohormônio convertases; PCs) do produto de gene de preproglucagon: por exemplo glucagon, GLP-1, peptídeo-2 semelhante ao glucagon (GLP-2), glicentina e oxintomodulina (OXM) (Drucker, D.J. (2005) Nat Clin Pract Endocrinol Metab 1: 22-31; Sinclair, E.M. e Drucker, D.J. (2005) Physiology (Bethesda) 20: 357-365). GLP-1, GLP-2, glicentina e OXM são cossecretados de células L no intestino em resposta à alimentação. O preproglucagon é Alternativamente processado (PC2) para produzir glucagon nas células alfa nas ilhotas pancreáticas. A estrutura de OXM

é essencialmente glucagon com uma extensão de terminal C de 8 resíduos.

[000315] Além da estimulação de biossíntese de insulina e de secreção de insulina dependente de glicose, o GLP-1 e seus miméticos estáveis (por exemplo Byetta) também causam modesta perda de peso em modelos animais (Mack, C.M., e outro (2006) *Int J Obes (Lond)* 30: 1332-1340) e em pacientes diabéticos do tipo 2 (DeFronzo, R.A., e outro (2005) *Diabetes Care* 28: 1092-1100; Buse, J.B., e outro (2010) *Diabetes Care* 33: 1255-1261). A infusão de glucagon reduz a ingestão de alimento em homem (Geary, N., e outro (1992) *Am J Physiol* 262: R975-980), enquanto que o tratamento de glucagon contínuo de tecido de adipose também promove a lipólise (Heckemeyer, C.M., e outro (1983) *Endocrinology* 113: 270-276) e a perda de peso (Salter, J.M., e outro (1960) *Metabolism* 9: 753-768; Chan, E.K., e outro (1984) *Exp Mol Pathol* 40: 320-327). O glucagon tem efeitos de ampla variação sobre o metabolismo de energia (Heppner, K.M., e outro (2010) *Physiol Behav*). O glucagon, ou análogos, pode ser usado de um modo diagnóstico para paralisia temporária do trato intestinal. Desse modo, pelo menos dois dos produtos de processamento de PC da proteína preproglucagon estão ligados à saciedade e efeitos metabólicos.

[000316] Em roedores, administração intraperitoneal repetida de OXM, um terceiro produto de preproglucagon, foi associado com tecido de adipose branco reduzido e a redução em peso, em comparação com os controles (Dakin, C.L., e outro (2004) *Endocrinology* 145: 2687-2695). Oxm reduziu a ingestão de alimento em 19,3% durante uma administração de infusão intravenosa a humanos de peso normal e este efeito persiste durante mais de 12 horas, após a infusão (Cohen, M.A., e outro (2003) *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4696-4701). O tratamento de voluntários durante um período de 4 semanas resultou em um efeito de saciedade prolongado e perda de peso refletindo um decréscimo em

gordura corporal (Wynne, K., e outro (2005) Diabetes 54: 2390-2395).

[000317] OXM é estruturalmente homólogo com GLP-1 e glucagon, e ativa tanto o receptor de glucagon (GCGR) quanto o receptor de GLP-1 (GLP1R), porém com 10 a 100 vezes menos potência do que os ligantes epônimos. Além disso, o estudo de interações de OXM com GLP1R sugere que ele pode ter diferentes efeitos sobre o recrutamento de beta-arrestina em comparação com GLP-1 (Jorgensen, R., e outro (2007) J Pharmacol Exp Ther 322: 148-154), desse modo agindo como um ligante "polarizado". Um único receptor para OXM foi pesquisado durante diversos anos, porém não foi ainda elucidado e é admitido agir por meio das séries de reação de GLP1R e GCGR. Consequentemente, são fornecidos aqui métodos para modificação de tensoativo de peptídeos de intestino que provê a indução de saciedade, perda de peso, alívio de resistência à insulina e/ou retardo na progressão de prediabetes para diabetes.

### **GLP-1**

[000318] Em vista do comportamento complexo e interagente dos produtos da proteína de preproglucagon sobre a saciedade e metabolismo descrito acima, trabalhadores de múltiplos grupos estudaram as ligações da atividade de estrutura sobre a estrutura de GLP-1 e glucagon. Resíduos ao longo das sequências foram mostrados aceitarem a substituição. Por exemplo, a substituição por Ala é bem aceita na região de terminal N de GLP-1, especialmente em 2, 3, 5, 8, 11, e 12 (Adelhorst, K., e outro (1994) J Biol Chem 269: 6275-6278).

[000319] Foi mostrado que análogos quiméricos com a capacidade de se ligar a GLP1R e GLCR podem ser obtidos por enxerto de resíduos de terminal C de GLP-1 sobre a terminação N de glucagon (Hjorth, S.A., e outro (1994) J Biol Chem 269: 30121-30124). O resíduo na posição 3 (Glu ácido em GLP1 ou Gln neutro em Glucagon ou OXM) reduz a afinidade de glucagon (Runge, S., e outro (2003) J Biol Chem 278:

28005-28010) ou OXM (Pocai, A., e outro (2009) Diabetes 58: 2258-2266) para o GIP1R. O efeito sobre o perfil metabólico de animais tratados com análogos estabilizados de GLP-1 ou glucagon ou OXM com Gln nas posições 3 foi estudado (Dia, J.W., e outro (2009) Nat Chem Biol 5: 749-757; Druce, M.R., e outro (2009) Endocrinology 150: 1712-1722; Pocai, A., e outro (2009) Diabetes 58: 2258-2266). Estes análogos foram designados terem ação agonística sobre ambos GLP1R e sobre GCGR (Dia, J.W., e outro US 2010/0190701 A1).

[000320] Análogos quiméricos devem ter os efeitos desejáveis dos hormônios origem agindo sobre seus receptores e, portanto, similares aos efeitos de OXM, que aparentemente age sobre ambos GLP-1R e GLCR: secreção de insulina dependente de glicose e saciedade, acoplada com lipólise e queima aumentada de gordura devido ao glucagon. Os análogos foram mostrados causarem os efeitos desejados de peso diminuído e queima aumentada de gordura. Tal perfil seria atrativo no tratamento de obesidade, porém um maior desafio em tratamento de obesidade é obediência. Embora os atualmente conhecidos análogos totais de glucagon e OXM, respectivamente, com afinidade para ambos GLP-1R e GLCR possam resultar em perda de peso, estes análogos não são otimizados para a alta biodisponibilidade, propriedades farmacêuticas, e conveniente liberação para os pacientes que são necessários para regimes de tratamento com fármaco ideal. Consequentemente, são fornecidos aqui análogos de peptídeos de intestino (por exemplo, GLP, OXM, glucagon ou similares) que provêm alta biodisponibilidade e/ou efeitos de longa duração para resultado terapêutico melhorado em tratamento de condições tais como obesidade e/ou diabetes e/ou a síndrome metabólica.

[000321] Fatores adicionais para tratamento otimizado de uma síndrome metabólica e diabetes com moléculas semelhantes a OXM referem-se à duração de tratamento e à quantidade de ação de

glucagon. Por exemplo, tratamento contínuo com análogos que ativam GLP-1 e receptores de glucagon (o perfil farmacológico de OXM) podem resultar em perda de massa gordurosa muito grande e rápida (Day, J.W., e outro (2009) Nat Chem Biol 5: 749-757), porém pode também causar a perda de massa muscular magra pode também causar a perda de massa muscular magra (Kosinski, J.R., e outro (2012) Obesidade (Silver Spring): doi: 10.1038/oby.2012.67), que é desfavorável para um produto farmacêutico nesta classe. Por exemplo, no artigo de pesquisa por Kosinski, J.R., e outro, o hormônio natural Oxm é administrado continuamente durante 14 dias de uma minibomba Alzet e resulta em um decréscimo de 30% em massa gordurosa, porém também causou um decréscimo de 7% em massa magra (músculo).

[000322] A ação do glucagon é conhecido estimular a glicogenólise, lipólise e a queima aumentada de gordura, porém pode também ter efeitos catabólicos sobre o músculo. Um tratamento bem-sucedido usando um agente que combina a ação de GLP-1 e glucagon (the OXM profile) necessitará idealmente causar a saciedade e secreção potenciada de insulina dependente de glicose de um análogo de GLP-1 com uma quantidade judiciosa de ação de glucagon (queima de gordura). Além disso, uso intermitente de tal agente fornecerá o perfil clínico desejado de perda de peso contínua, moderada, por meio da perda de massa gordurosa, com perda minimizada de massa magra. São fornecidas aqui moléculas com uma combinação desejável de ação de GLP-1 e OXM, bem como um perfil farmacocinético/farmacodinâmico adaptável para permitir uso ideal em terapia (por exemplo, em uma síndrome metabólica, diabetes, obesidade, e similares).

[000323] Em uma modalidade, os compostos de Fórmula I-A, III-A, III-B e Fórmula V são designados para fornecer ou atividade como glucagon ou atividade como GLP-1. Em outra modalidade, os compostos de Fórmula I-A, III-A, III-B e Fórmula V fornecem atividade

adaptável. Por exemplo, em um caso, os produtos de peptídeo descritos aqui (por exemplo, compostos na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2) têm um  $EC_{50}$  de menos do que cerca de 500 nM, preferivelmente menos do que cerca de 50 nM, mais preferivelmente menos do que cerca de 20 nM em receptores para ambos, glucagon e GLP-1. Em outro caso, os produtos de peptídeo descritos aqui (por exemplo, compostos na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2) são mais potentes (por exemplo,  $EC_{50}$  de menos do que 10 nM, preferivelmente menos do que 5 nM, mais preferivelmente cerca de 1 nM) para o receptor de GLP-1 e menos potente para o receptor de glucagon (por exemplo,  $EC_{50}$  de menos do que 50 nM, preferivelmente menos do que cerca de 20 nM, mais preferivelmente cerca de 5 nM) para o receptor de glucagon. Esta regulação de atividade biológica provê alguma retenção de uma quantidade judiciosa de ação de glucagon, desse modo provendo a ocorrência de queima de gordura, enquanto também mantendo os efeitos benéficos de secreção potenciada de insulina dependente de glicose. OXM é estruturalmente homólogo ao GLP-1 e glucagon, e ativa tanto o receptor de glucagon (GCGR) quanto o receptor de GLP-1 (GLP1R). Consequentemente, em algumas modalidades, os compostos de Fórmula I-A, Fórmula III-A, Fórmula III-B e Fórmula V fornecem uma atividade como OXM adaptável. Em algumas modalidades específicas, os produtos de peptídeo descritos aqui compreendem um peptídeo tendo resíduos de aminoácido 1-17 de GLP-1 e/ou análogos do mesmo (por exemplo, análogos compreendendo substituições de aminoácido não natural modificado, como descrito aqui, ligações de lactam ciclizadas, como descrito aqui, modificação de tensoativos como descrito aqui, ou uma combinação do mesmo). Em algumas outras modalidades, os produtos de peptídeo descritos aqui compreendem um peptídeo tendo resíduos de aminoácido 1-16 de GLP-1 e/ou análogos do mesmo (por exemplo,



análogos compreendendo substituições de aminoácido não natural modificado como descrito aqui, ligações de lactam ciclizadas como descrito aqui, modificação de tensoativos como descrito aqui, ou uma combinação das mesmas). Em modalidades adicionais, os produtos de peptídeo descritos aqui compreendem um peptídeo tendo resíduos de aminoácido 1-18 de GLP-1 e/ou análogos do mesmo (por exemplo, análogos compreendendo substituições de aminoácido não natural modificado como descrito aqui, ligações de lactam ciclizadas como descrito aqui, modificação de tensoativos como descrito aqui, ou uma combinação das mesmas). Adicionalmente os produtos de peptídeo descritos aqui compreendem um ou mais resíduos (por exemplo, Aib, Ac4C) que fornecem estabilização de hélice dos compostos designados de Fórmula I-A, Fórmula III-A, Fórmula III-B, Fórmula V, e compostos na Tabela 1 de Figura 1, e Tabela 2 de Figura 2.

[000324] Acredita-se que a subfamília de glucagon de ligantes ligue-se a seus receptores de um modo comum de dois domínios para diversas receptores de classe B (classe de secretina, receptores acoplados à proteína G (GPCR)). Para GLP-1 é percebido que existe uma região de terminal N de resíduo 1 a cerca de resíduo 16 que se liga aos topos das hélices de transmembrana (região de justamembrana) e uma região de terminal C helicoidal de 17 a 31 que se liga à extensão de terminal N, extracelular, grande (ECD) do receptor. A ligação destes ligantes foca no fato de que análogos N-terminalmente truncados destes ligantes de peptídeo podem também manter a afinidade e seletividade de ligação substancial para justamente a região de ECD isolada do receptor. Portanto, foi sugerido que a região de terminal N é responsável pela ativação do receptor enquanto que a região de terminal C é responsável pela ligação. Foi recentemente mostrado que análogos de GLP-1 de terminal N, curtos podem ser ambos potentes aglutinantes, bem como ativadores de receptor (Mapelli, C., e outro

(2009) J Med Chem 52: 7788-7799; Haque, T.S., e outro (2010) Peptídeos 31: 950-955; Haque, T.S., e outro (2010) Peptídeos 31: 1353-1360).

[000325] Além disso, o estudo de uma estrutura de cristal de raio-x (Runge, S., e outro (2008) J Biol Chem 283: 11340-7) da região de terminal N do GLP1R com análogos antagonistas truncados da mímica de GLP-1, exendina-4 (Byetta), ligada nesta região mostra que uma região de ligação a ligante crítica no ECD é de alta hidrofobicidade (Figura 3). A sequência de exendina-4 além de Glu15 interage como uma hélice anfifílica com esta região muito hidrofóbica (Val<sup>19\*</sup>, Phe<sup>22\*</sup>, Trp<sup>25\*</sup>, Leu<sup>26\*</sup>). Em uma modalidade, fragmentos de terminal N truncados de GLP-1 ou glucagon são modificados para ligação a GLCR e são covalentemente ligados a um tensoativo. A porção hidrofóbica 1'-alquila do tensoativo imita e substitui a região de terminal C do ligante de hormônio nativo e aumenta a potência, eficácia, e duração de ação dos peptídeos. Além disso, tais análogos têm maiores vantagens devido a seu menor tamanho, que reduz sua complexidade, custos de síntese, e suscetibilidade à proteólise. Além disso, peptídeos menores são mais facilmente absorvidos através da mucosa nasal ou barreira de enterócito do intestino.

[000326] A hipoglicemia é uma condição de baixo açúcar sanguíneo que pode ser desafiadora da vida e é cada vez mais observada como tratamento mais agressivo de elevado açúcar sanguíneo por tratamento de insulina intensivo que está sendo usado em mais pacientes. A hipoglicemia é observada quando os níveis de glicose sanguínea observada quando os níveis de glicose sanguínea caem muito baixo para fornecer energia suficiente para o cérebro e músculos para as atividades do corpo. Glucagon pode ser usado para tratar esta condição e funciona assim estimulando o fígado para romper o glicogênio para gerar glicose e causar os níveis de glicose sanguínea elevarem-se para

o valor normal. Análogos de glucagon que mantêm a capacidade de ativar o GLCR podem ser usados para obter este efeito desejável sobre os níveis de glicose sanguínea.

[000327] Análogos de GLP-1 que ativam o GLP1R estimulam a produção e, na presença de níveis elevados de glicose sanguínea, liberação de insulina do pâncreas. Esta ação resulta em controle eficiente e normalização dos níveis de glicose sanguínea, como observado com os produtos em circulação, tal como a exenatida (Byetta®). Além disso, tais produtos parecem produzir um apetite reduzido e retardar o movimento de alimento do estômago. Desse modo, eles são eficazes no tratamento de diabetes por meio de múltiplos mecanismos. Análogos que combinam os efeitos de glucagon e GLP-1 que ativam tanto o GLCR quanto o GLP1R podem oferecer um benefício no tratamento de diabetes por meio de uma ação combinada para suprimir o apetite, liberar insulina de um modo dependente de glicose, auxiliar na proteção de hipoglicemia e acelerar a queima de gordura.

[000328] Tais métodos para tratar a hiperglicemia, incluindo diabetes, diabetes melito tipo I, diabetes melito tipo II, ou diabetes gestacional, ou dependente de insulina ou não dependente de insulina, são acreditados serem úteis na redução de complicações de diabetes incluindo nefropatia, retinopatia e doença vascular. Aplicações em doença cardiovascular abrangem doença microvascular, bem como macrovascular (Davidson, M.H., (2011) Am J Cardiol 108[suppl]:33B-41B; Gejl, M., e outro (2012) J Clin Endocrinol Metab 97:doi:10.1210/jc.2011-3456), e incluem tratamento para infarto do miocárdio. Tais métodos para reduzir o apetite ou promover a perda de peso corporal são acreditados serem úteis na redução de peso corporal, prevenindo o ganho de peso, ou tratando a obesidade de várias causas, incluindo obesidade induzida por fármaco, e reduzindo complicações

associadas com obesidade, incluindo doença vascular (doença de artéria coronária, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, isquemia reperfusão, etc.), hipertensão, início de diabetes tipo II, hiperlipidemia e doenças musculoesqueléticas.

[000329] Como usado aqui, o termo glucagon ou análogos de GLP-1 inclui todos os sais farmaceuticamente aceitáveis ou ésteres dos mesmos.

### **Peptídeos e Análogos dos Mesmos**

[000330] Em um aspecto, os peptídeos que são covalentemente modificados e são adequados para métodos descritos aqui são análogos de glucagon truncados e/ou o GLP-1 relacionado ao hormônio, incluindo e não limitado a:

Glucagon:

[000331] His<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub>- Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub> Phe<sub>6</sub>- Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>- Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-Ser<sub>16</sub>-Arg<sub>17</sub>-Arg<sub>18</sub>-Ala<sub>19</sub>-Gln<sub>20</sub>-Asp<sub>21</sub>-Phe<sub>22</sub>-Val<sub>23</sub>-Gln<sub>24</sub>-Trp<sub>25</sub>-Leu<sub>26</sub>-Met<sub>27</sub>-Asn<sub>28</sub>-Thr<sub>29</sub> (**SEQ. ID. Nº. 331**)

Oxintomodulina:

[000332] His<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub>- Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub> Phe<sub>6</sub>- Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>- Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-Ser<sub>16</sub>-Arg<sub>17</sub>-Arg<sub>18</sub>-Ala<sub>19</sub>-Gln<sub>20</sub>-Asp<sub>21</sub>-Phe<sub>22</sub>-Val<sub>23</sub>-Gln<sub>24</sub>-Trp<sub>25</sub>-Leu<sub>26</sub>-Met<sub>27</sub>-Asn<sub>28</sub>-Thr<sub>29</sub>-Lys<sub>30</sub>-Arg<sub>31</sub>-Asn<sub>32</sub>-Arg<sub>33</sub>-Asn<sub>34</sub>-Asn<sub>35</sub>-Ile<sub>36</sub>-Ala<sub>37</sub> (**SEQ. ID. Nº. 332**)

GLP-1 (usando numeração de glucagon):

[000333] His<sub>1</sub>-Ala<sub>2</sub>- Glu<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub> Phe<sub>6</sub>- Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>- Asp<sub>9</sub>-Val<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Ser<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Glu<sub>15</sub>-Gly<sub>16</sub>-Gln<sub>17</sub>-Ala<sub>18</sub>-Ala<sub>19</sub>-Lys<sub>20</sub>-Glu<sub>21</sub>-Phe<sub>22</sub>-Ile<sub>23</sub>-Ala<sub>24</sub>-Trp<sub>25</sub>-Leu<sub>26</sub>-Val<sub>27</sub>-Lys<sub>28</sub>-Gly<sub>29</sub>-Arg<sub>30</sub> (**SEQ. ID. Nº. 333**)

[000334] Em algumas modalidades, um produto de peptídeo descrito aqui tem a estrutura de Fórmula V:

[000335] aa<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-aa<sub>3</sub>-aa<sub>4</sub>-aa<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-aa<sub>7</sub>-aa<sub>8</sub>-aa<sub>9</sub>-aa<sub>10</sub>- aa<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-aa<sub>13</sub>-aa<sub>14</sub>-aa<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-aa<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>- aa<sub>21</sub>-aa<sub>22</sub>-aa<sub>23</sub>-aa<sub>24</sub>-aa<sub>25</sub>-aa<sub>26</sub>-aa<sub>27</sub>-aa<sub>28</sub>-aa<sub>29</sub>-aa<sub>30</sub>-aa<sub>31</sub>-aa<sub>32</sub>-aa<sub>33</sub>-aa<sub>34</sub>-aa<sub>35</sub>-aa<sub>36</sub>-aa<sub>37</sub>-Z Fórmula V (**SEQ. ID.**

**Nº. 334)**

[000336] em que:

[000337] U é um aminoácido de ligação;

[000338] X é um tensoativo ligado à cadeia lateral de U;

[000339] Z é OH, ou  $\text{-NH-R}^3$ , em que  $\text{R}^3$  é H ou  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  alquila substituída ou não substituída;

[000340]  $\text{aa}_1$  é His, N-Ac-His, pGlu-His ou  $\text{N-R}^3\text{-His}$ ;

[000341]  $\text{aa}_2$  é Ser, Ala, Gly, Aib, Ac4c ou Ac5c;

[000342]  $\text{aa}_3$  é Gln, ou Cit;

[000343]  $\text{aa}_4$  é Gly, ou D-Ala;

[000344]  $\text{aa}_5$  é Thr, ou Ser;

[000345]  $\text{aa}_6$  é Phe, Trp, F2Phe, Me2Phe, ou Nal(2);

[000346]  $\text{aa}_7$  é Thr, ou Ser;

[000347]  $\text{aa}_8$  é Ser, ou Asp;

[000348]  $\text{aa}_9$  é Asp, ou Glu;

[000349]  $\text{aa}_{10}$  é Tyr, Leu, Met, Nal(2), Bip, ou Bip2EtMeO;

[000350]  $\text{aa}_{11}$  é Ser, Asn, ou U(X);

[000351]  $\text{aa}_{12}$  é Lys, Glu, Ser, Arg, ou U(X);

[000352]  $\text{aa}_{13}$  é ausente, Tyr, Gln, Cit, ou U(X);

[000353]  $\text{aa}_{14}$  é ausente, Leu, Met, Nle, ou U(X);

[000354]  $\text{aa}_{15}$  é ausente, Asp, Glu, ou U(X);

[000355]  $\text{aa}_{16}$  é ausente, Ser, Gly, Glu, Aib, Ac5c, Lys, Arg, ou U(X);

[000356]  $\text{aa}_{17}$  é ausente, Arg, hArg, Gln, Glu, Cit, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000357]  $\text{aa}_{18}$  é ausente, Arg, hArg, Ala, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000358]  $\text{aa}_{19}$  é ausente, Ala, Val, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

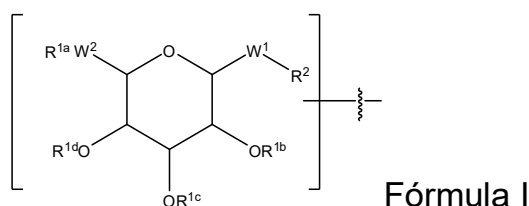
[000359]  $\text{aa}_{20}$  é ausente, Gln, Lys, Arg, Cit, Glu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000360]  $\text{aa}_{21}$  é ausente, Asp, Glu, Leu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

[000361]  $\text{aa}_{22}$  é ausente, Phe, Trp, Nal(2), Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

- [000362] aa<sub>23</sub> é ausente, Val, Ile, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000363] aa<sub>24</sub> é ausente, Gln, Ala, Glu, Cit, ou U(X);
- [000364] aa<sub>25</sub> é ausente, Trp, Nal(2), ou U(X);
- [000365] aa<sub>26</sub> é ausente, Leu, U(X);
- [000366] aa<sub>27</sub> é ausente, Met, Val, Nle, Lys, ou U(X);
- [000367] aa<sub>28</sub> é ausente, Asn, Lys, ou U(X);
- [000368] aa<sub>29</sub> é ausente, Thr, Gly, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000369] aa<sub>30</sub> é ausente, Lys, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000370] aa<sub>31</sub> é ausente, Arg, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000371] aa<sub>32</sub> é ausente, Asn, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000372] aa<sub>33</sub> é ausente, Arg, Aib, Ac5c, ou U(X);
- [000373] aa<sub>34</sub> é ausente, Asn, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000374] aa<sub>35</sub> é ausente, Asn, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000375] aa<sub>36</sub> é ausente, Ile, Aib, Ac4c, Ac5C, ou U(X);
- [000376] aa<sub>36</sub> é ausente, Ala, Aib, Ac4c, Ac5C, ou U(X);
- [000377] aa<sub>37</sub> ausente ou U(X);
- [000378] contanto que um, ou pelo menos um de aa<sub>11</sub> – aa<sub>37</sub> seja U(X).
- [000379] Em modalidades específicas, o aminoácido de ligação U, é um diaminoácido como Lys ou Orn, X é um tensoativo modificado da classe 1 de alquil glicosídeo ligado a U, e Z é OH, ou –NH-R<sub>2</sub>, em que R<sup>3</sup> é H ou C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; ou uma cadeia de PEG de menos do que 10Da.
- [000380] Em algumas modalidades, um produto de peptídeo descrito aqui tem a estrutura de Fórmula III-B:
- [000381] His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-aa<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-aa<sub>10</sub>-aa<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-aa<sub>13</sub>-aa<sub>14</sub>-aa<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-aa<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-aa<sub>21</sub>-aa<sub>22</sub>-aa<sub>23</sub>-Z
- [000382] FÓRMULA III-B (**SEQ. ID. Nº. 3**)
- em que:
- [000383] Z é OH, ou –NH-R<sup>3</sup>, em que R<sup>3</sup> é H ou substituído ou não substituído C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquila; ou uma cadeia de PEG de menos do que 10Da;

- [000384] aa<sub>2</sub> é Ser, Ala, Gly, Aib, Ac4c, ou Ac5c;
- [000385] aa<sub>3</sub> é Gln, ou Cit;
- [000386] aa<sub>6</sub> é Phe, Trp, F2Phe, Me2Phe, MePhe, ou Nal2;
- [000387] aa<sub>10</sub> é Tyr, Leu, Met, Nal2, Bip, ou Bip2EtMeO;
- [000388] aa<sub>11</sub> é Ser, Asn, ou U;
- [000389] aa<sub>12</sub> é Lys, Glu, Ser ou U(X);
- [000390] aa<sub>13</sub> é ausente ou Tyr, Gln, Cit, ou U(X);
- aa<sub>14</sub> é ausente ou Leu, Met, Nle, ou U(X);
- [000391] aa<sub>15</sub> é ausente ou Asp, Glu, ou U(X);
- [000392] aa<sub>16</sub> é ausente ou Ser, Gly, Glu, Aib, Ac4c, Ac5c, Lys, R, ou U(X);
- [000393] aa<sub>17</sub> é ausente ou Arg, hArg, Gln, Glu, Cit, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000394] aa<sub>18</sub> é ausente ou Arg, hArg, Ala, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000395] aa<sub>19</sub> é ausente ou Ala, Val, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000396] aa<sub>20</sub> é ausente ou Gln, Lys, Arg, Cit, Glu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000397] aa<sub>21</sub> é ausente ou Asp, Glu, Leu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000398] aa<sub>22</sub> é ausente ou Phe, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000399] aa<sub>23</sub> é ausente ou Val, Ile, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);
- [000400] em que quaisquer dois de aa<sub>1</sub>-aa<sub>23</sub> são opcionalmente ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam; e
- [000401] contanto que um, ou pelo menos um de aa<sub>16</sub>, aa<sub>17</sub>, aa<sub>18</sub>, aa<sub>19</sub>, aa<sub>20</sub>, aa<sub>21</sub>, aa<sub>22</sub>, aa<sub>23</sub> ou aa<sub>24</sub> seja o aminoácido natural ou não natural U covalentemente ligado a X.
- [000402] Em algumas modalidades específicas de Fórmula III-A, Fórmula III-B e Fórmula V, X tem a estrutura:



em que:

[000403] R<sup>1a</sup> é um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída;

[000404] R<sup>1b</sup>, R<sup>1c</sup>, e R<sup>1d</sup> são H;

[000405] W<sup>1</sup> é -(C=O)-NH-;

[000406] W<sup>2</sup> é -O-; e

[000407] R<sup>2</sup> é uma ligação.

[000408] Em algumas das modalidades descritas acima, R<sup>1a</sup> é um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquila, um grupo C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> alquila, grupo C<sub>12</sub>-18 alquila ou grupo C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> alquila.

[000409] Em algumas modalidades de Fórmula III-B, U é qualquer aminoácido ligante descrito aqui. A Tabela 1 na Figura 1 e Tabela 2 na Figura 2 ilustram certos exemplos de peptídeos que são covalentemente ligado com tensoativos como descrito aqui.

[000410] São contemplados dentro do escopo de modalidades apresentadas aqui produtos de peptídeo de Fórmula I-A, Fórmula III-A, Fórmula III-B ou Fórmula V, em que o produto de peptídeo compreende um, ou mais de um grupo tensoativo (por exemplo, o grupo X tendo a estrutura de Fórmula I). Em uma modalidade, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, Fórmula III-A, Fórmula III-B ou Fórmula V, compreende um grupo tensoativo. Em outra modalidade, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, Fórmula III-A, Fórmula III-B ou Fórmula V, compreende dois grupos tensoativos. Em ainda outra modalidade, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, Fórmula III-A, Fórmula III-B ou Fórmula V, compreende três grupos tensoativos.

[000411] É reconhecida aqui a importância de certas porções de **SEQ. ID. Nº. 331** para o tratamento de condições associadas com resistência à insulina e/ou condições cardiovasculares. Consequentemente, é



fornecido aqui um método de tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>17</sub> de **SEQ. ID. Nº. 331** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000412] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>18</sub> de **SEQ. ID. Nº. 331** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000413] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>19</sub> de **SEQ. ID. Nº. 331** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000414] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>20</sub> de **SEQ. ID. Nº. 331** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000415] Em uma modalidade adicional, a administração do referido análogo de glucagon descrito acima causa perda de peso.

[000416] É reconhecida aqui a importância de certas porções de **SEQ. ID. Nº. 1** para o tratamento de condições associadas com resistência à insulina e/ou condições cardiovasculares. Consequentemente, é fornecido aqui um método de tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma

quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>17</sub> de **SEQ. ID. Nº. 1** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

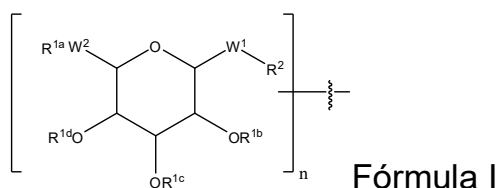
[000417] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>18</sub> de **SEQ. ID. Nº. 1** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000418] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>19</sub> de **SEQ. ID. Nº. 1** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000419] Em outra modalidade, é fornecido aqui um método de tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>20</sub> de **SEQ. ID. Nº. 1** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000420] Em uma modalidade adicional, a administração do referido análogo de glucagon descrita acima causa perda de peso.

[000421] Em qualquer das modalidades descritas acima, o referido análogo de glucagon é modificado com um tensoativo X de Fórmula I:



em que:

[000422] R<sup>1a</sup> é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação,

H, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, um grupo aralkila substituída ou não substituída, ou uma porção contendo núcleo esteroide;

[000423] R<sup>1b</sup>, R<sup>1c</sup>, e R<sup>1d</sup> são cada qual, independentemente em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralkila substituída ou não substituída;

[000424] W<sup>1</sup> é independentemente, em cada ocorrência, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-, -(C=O), -(C=O)-O-, -(C=O)-NH-, -(C=S)-, -(C=S)-NH-, ou -CH<sub>2</sub>-S-;

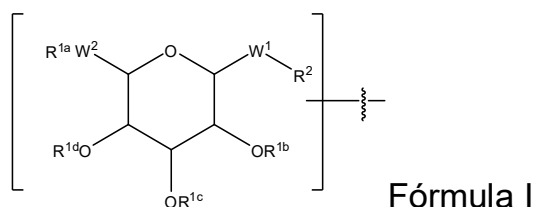
[000425] W<sup>2</sup> é -O-, -CH<sub>2</sub>- ou -S-;

[000426] R<sup>2</sup> é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação a U, H, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralkila substituída ou não substituída, -NH<sub>2</sub>, -SH, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-alceno, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-alcino, -NH(C=O)-CH<sub>2</sub>-Br, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> -maleimida, ou -N<sub>3</sub>;

[000427] n é 1, 2 ou 3; e

[000428] m é 1-10.

[000429] Em uma modalidade específica, o referido análogo de glucagon é modificado com um tensoativo, X tendo a estrutura:



em que:

[000430] R<sup>1a</sup> é um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída;

[000431] R<sup>1b</sup>, R<sup>1c</sup>, e R<sup>1d</sup> são H;

[000432] W<sup>1</sup> é -(C=O)-NH-;

[000433] W<sup>2</sup> é -O-; e

[000434] R<sup>2</sup> é uma ligação.

[000435] Em algumas das modalidades descritas acima, R<sup>1a</sup> é um

grupo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquila, um grupo C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> alquila, grupo C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> alquila ou grupo C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> alquila.

[000436] Como usado aqui, o termo diabetes inclui tanto a diabetes tipo 1 quanto tipo 2. Consequentemente, em algumas modalidades os métodos descrito aqui compreendem a administração de qualquer composto descrito aqui incluindo compostos de Fórmula II, III-A, III-B e/ou Fórmula V, e/ou compostos descritos na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2 a um indivíduo sofrendo de diabetes tipo 1. Em algumas outras modalidades, os métodos descrito aqui compreendem administração de qualquer composto descrito aqui, incluindo compostos de Fórmula II, III-A, III-B e/ou Fórmula V, e/ou compostos descritos na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2 a um indivíduo sofrendo de Diabetes tipo 2.

[000437] É também descrito aqui um método de tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>17</sub> de **SEQ. ID. Nº. 331** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000438] É também descrito aqui um método de tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>18</sub> de **SEQ. ID. Nº. 331** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000439] É também descrito aqui um método de tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>19</sub> de **SEQ. ID. Nº. 331** ao indivíduo em necessidade

do mesmo.

[000440] É também descrito aqui um método de tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>20</sub> de **SEQ. ID. Nº. 331** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000441] Em alguns casos para as modalidades descritas acima, o referido análogo de glucagon é administrado quando a doença cardiovascular está associada com um evento isquêmico.

[000442] É também descrito aqui um método de tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>17</sub> de **SEQ. ID. Nº. 1** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000443] É também descrito aqui um método de tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>18</sub> de **SEQ. ID. Nº. 1** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

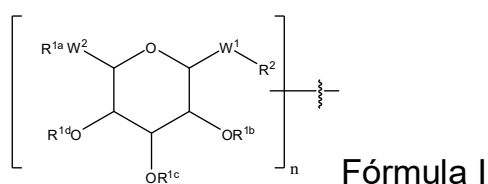
[000444] É também descrito aqui um método de tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>19</sub> de **SEQ. ID. Nº. 1** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000445] É também descrito aqui um método de tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo

compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo de glucagon compreendendo resíduos de aminoácido aa<sub>1</sub>-aa<sub>20</sub> de **SEQ. ID. Nº. 1** ao indivíduo em necessidade do mesmo.

[000446] Em alguns casos para as modalidades descritas acima, o referido análogo de glucagon é administrado quando a doença cardiovascular está associada com um evento isquêmico.

[000447] Em qualquer das modalidades descritas acima, o referido análogo de glucagon é modificado com um tensoativo X de Fórmula I:



em que:

[000448] R<sup>1a</sup> é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, um grupo aralquila substituída ou não substituída, ou uma porção contendo núcleo esteroide;

[000449] R<sup>1b</sup>, R<sup>1c</sup>, e R<sup>1d</sup> são cada qual, independentemente em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída;

[000450] W<sup>1</sup> é independentemente, em cada ocorrência, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-, -(C=O), -(C=O)-O-, -(C=O)-NH-, -(C=S)-, -(C=S)-NH-, ou -CH<sub>2</sub>-S-;

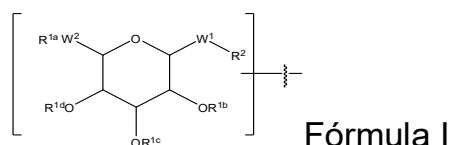
[000451] W<sup>2</sup> é -O-, -CH<sub>2</sub>- ou -S-;

[000452] R<sup>2</sup> é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação a U, H, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída, -NH<sub>2</sub>, -SH, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-alceno, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-alcino, -NH(C=O)-CH<sub>2</sub>-Br, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> -maleimida, ou -N<sub>3</sub>;

[000453] n é 1, 2 ou 3; e

m é 1-10.

[000454] Em uma modalidade específica, o referido análogo de glucagon é modificado com um tensoativo, X tendo a estrutura:



em que:

[000455] R<sup>1a</sup> é um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída;

[000456] R<sup>1b</sup>, R<sup>1c</sup>, e R<sup>1d</sup> são H;

[000457] W<sup>1</sup> é -(C=O)-NH-;

[000458] W<sup>2</sup> é -O-; e

[000459] R<sup>2</sup> é uma ligação.

[000460] Em algumas das modalidades descritas acima, R<sup>1a</sup> é um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquila, um grupo C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> alquila, grupo C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> alquila ou grupo C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> alquila.

[000461] Modificações nas terminações amino ou carboxila podem opcionalmente ser introduzidas N<sup>os</sup> peptídeos (por exemplo, glucagon ou GLP-1) (Nestor, J.J., Jr. (2009) Current Medicinal Chemistry 16: 4399 - 4418). Por exemplo, os peptídeos podem ser truncados ou acilados na terminação N para produzir análogos de peptídeos exibindo baixa eficiência, parcial atividade agonista e antagonista, como foi observado para alguns peptídeos (Gourlet, P., e outro (1998) Eur J Pharmacol 354: 105-111, Gozes, I. e Furman, S. (2003) Curr Pharm Des 9: 483-494), o teor dos quais é incorporado aqui por referência). Por exemplo, a deleção dos primeiros 6 resíduos de bPTH produz análogos antagonísticos (Mahaffey, J.E., e outro (1979) J Biol Chem 254: 6496-6498; Goldman, M.E., e outro (1988) Endocrinology 123: 2597-2599) e uma operação similar sobre os peptídeos descrita aqui gera potentes análogos antagonísticos. Outras modificações à terminação N de peptídeos, tais como deleções ou incorporação de D-aminoácidos tal como D-Phe também podem fornecer agonistas ou antagonistas

potentes e de longa ação, quando substituídos com as modificações descritas aqui tais como alquil glicosídeos de cadeia longa. Tais agonistas e antagonistas também têm utilidade comercial e incluem-se no escopo de modalidades contempladas descritas aqui.

[000462] Também contemplado dentro do escopo de modalidades descritas aqui são tensoativos covalentemente ligados a análogos de peptídeo, em que o peptídeo nativo é modificado por acetilação, acilação, PEGilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de um lipídeo ou derivado de lipídeo, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação de dissulfeto, desmetilação, formação de reticulação covalente de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação âncora de GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, glicosilação, ligação lipídeo, sulfação, gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico, hidroxilação e ADP-ribosilação, selenoilação, sulfação, adição de aminoácidos a proteínas mediada por RNA de transferência, tal como arginilação, e ubiquitinação. Veja, por exemplo, (Nestor, J.J., Jr. (2007) Comprehensive Medicinal Chemistry II 2: 573-601, Nestor, J.J., Jr. (2009) Current Medicinal Chemistry 16: 4399 - 4418, Creighton, T.E. (1993), Wold, F. (1983) Posttranslational Covalent Modification of Proteins 1-12, Seifter, S. e England, S. (1990) Methods Enzymol 182: 626-646, Rattan, S.I., e outro (1992) Ann N Y Acad Sci 663: 48-62). Também contemplado dentro do escopo de modalidades são descritos aqui peptídeos que são ramificados ou cíclicos, com ou sem ramificação. Peptídeos cíclicos, ramificados e circulares ramificados resultam de processos naturais pós-translacionais e são também feitos por métodos sintéticos adequados. Em algumas modalidades, qualquer produto de peptídeo descrito aqui compreende um análogo de peptídeo descrito acima que é então



covalentemente ligado a uma porção tensoativa de alquil-glicosídeo.

[000463] Também contemplado dentro do escopo de modalidades apresentadas aqui são cadeias de peptídeo substituídas em uma porção adequada pela substituição dos análogos reivindicados aqui por acilação sobre um aminoácido ligante em, por exemplo, a posição-ε de Lys, com ácidos graxos tais como ácidos octanóicos decanóicos dodecanóicos tetradecanóicos hexadecanóicos octadecanóicos 3-fenilpropanóicos e similares, com cadeias alquila saturadas ou não saturadas (Zhang, L. e Bulaj, G. (2012) Curr Med Chem 19: 1602-1618). Exemplos ilustrativos não limitantes de tais análogos são:

[000464] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Ser<sub>16</sub>- Arg<sub>17</sub>-Lys(N-épsilon-dodecanoil)<sub>18</sub>-Aib<sub>19</sub>-NH<sub>2</sub>, **(SEQ. ID. Nº. 335)**

[000465] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Ser<sub>16</sub>- Arg<sub>17</sub>-Lys(N-épsilon-tetradecanoil)<sub>18</sub>-Ac<sub>4</sub>C<sub>19</sub>-NH<sub>2</sub>, **(SEQ. ID. Nº. 336)**

[000466] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Ser<sub>16</sub>- Arg<sub>17</sub>-Lys(N-épsilon-hexadecanoil)<sub>18</sub>-Aib<sub>19</sub>-NH<sub>2</sub>, **(SEQ. ID. Nº. 337)**

[000467] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Aib<sub>16</sub>- Arg<sub>17</sub>-Lys(N-épsilon-dodecanoil)<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>, **(SEQ. ID. Nº. 338)**

[000468] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Aib<sub>16</sub>- Arg<sub>17</sub>-Lys(N-épsilon-tetradecanoil)<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>, **(SEQ. ID. Nº. 339)**

[000469] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>- Aib<sub>16</sub>- Arg<sub>17</sub>-Lys(N-épsilon-hexadecanoil)<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>, **(SEQ. ID. Nº. 340)**

[000470] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-Ser<sub>16</sub>-Arg<sub>17</sub>-Lys(N-épsilon-(gama-glutamil)-N-

alfa-tetradecanoil))<sub>18</sub>-Aib<sub>19</sub>-NH<sub>2</sub>, (**SEQ. ID. Nº. 341**) e similares.

[000471] Em outras modalidades, uma cadeia de peptídeo é opcionalmente substituída em uma posição adequada por reação sobre um aminoácido ligante, por exemplo, a sulfidril de Cys, com um espaçador e uma porção hidrofóbica, tal como um núcleo esteroide, por exemplo, uma porção de colesterol. Em algumas de tais modalidades, o peptídeo modificado também compreende uma ou mais cadeias de PEG. Exemplos não limitantes de tais moléculas são:

[000472] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-Aib<sub>16</sub>-Arg<sub>17</sub>-Cys(S-(3-(PEG4-aminoetilacetamida-colesterol)))<sub>18</sub>-Aib<sub>19</sub>-NH<sub>2</sub>, (**SEQ. ID. Nº. 342**)

[000473] His<sub>1</sub>-Aib<sub>2</sub>-Gln<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-Phe<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-Tyr<sub>10</sub>-Ser<sub>11</sub>-ciclo(Glu<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Asp<sub>15</sub>-Lys<sub>16</sub>)-Arg<sub>17</sub>-Cys(S-(3-(PEG4-aminoetilacetamida-colesterol)))<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>. (**SEQ. ID. Nº. 343**)

[000474] Com exceção dos vinte aminoácidos padrões, existe um vasto número de "aminoácidos não padrões" ou aminoácidos não naturais, que são conhecidos para a técnica e que podem ser incorporados N<sup>os</sup> compostos descritos aqui, como descrito acima. Outros aminoácidos não padrões são modificados com cadeias laterais reativas para conjugação (Gauthier, M.A. e Klok, H.A. (2008) Chem Commun (Camb) 2591-2611; de Graaf, A.J., e outro (2009) Bioconjug Chem 20: 1281-1295). Em um método, um par de sintetase de tRNA/ tRNA evoluído é codificado no plasmídeo de expressão pelo códon supressor âmbar (Deiters, A, e outro (2004). Bio-org. Med. Chem. Lett. 14, 5743-5). Por exemplo, p-azidofenilalanina foi incorporada em peptídeos e em seguida reagida com um tensoativo funcionalizado, ou um polímero de PEG tendo uma porção de acetileno na presença de um agente de redução e íons de cobre para facilitar uma reação orgânica conhecida como "Cicloadição Huisgen [3+2]". Uma sequência de reação similar usando os reagentes descritos aqui contendo um alquil

glicosídeo modificado por acetileno ou glicosídeo modificado por PEG resultará em peptídeos PEGilados ou modificados por alquil glicosídeo. For peptídeos de menos do que cerca de 50 resíduos, síntese de fase sólida padrão é usada para incorporação dos referidos resíduos reativos de aminoácido na posição desejada na cadeia. Tais peptídeos e/ou proteínas modificados por tensoativo oferecem um diferente espectro de propriedades farmacológicas e medicinais do que os peptídeos modificados pela incorporação de PEG apenas.

[000475] O técnico versado apreciará que numerosas permutações dos análogos de peptídeo sejam possíveis e, contanto que uma sequência de aminoácido tenha uma porção tensoativa incorporada, possuirá os atributos desejáveis de produtos de peptídeo modificados por tensoativo descritos aqui.

### **Certas Definições**

[000476] Como usado no relatório descritivo, "um, uma" ou "um, uma" significa um ou mais. Como usado na(s) reivindicação(ões), quando usado em conjunto com a palavra "compreendendo", as palavras "um, uma" ou "um, uma" significam um ou mais. Como usado aqui, "outro" significa pelo menos um segundo ou mais.

[000477] Como usado aqui, as abreviações de uma e três letras para os vários aminoácidos comuns são como recomendado em Pure Appl. Chem. 31, 639-645 (1972) e 40, 277-290 (1974) e aquiescem com 37 CFR § 1.822 (55 FR 18245, 1 de maio de 1990). As abreviações representam L-aminoácidos, a menos que de outro modo designadas as D- ou DL. Certos aminoácidos, tanto natural e não natural, são aqui, por exemplo, glicina,  $\alpha$ -dietilglicina (Deg), ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib), ácido 1-aminociclobutano-1-carboxílico (Ac4c), ácido 1-aminociclopentano-1-carboxílico (Ac5c), ácido 1-aminocicloexano-1-carboxílico (Ac6c). Análogos de glutamina incluem citrulina (Cit). Todas sequências de peptídeo são apresentadas com o aminoácido de

terminal N à esquerda e o aminoácido de terminal C à direita.

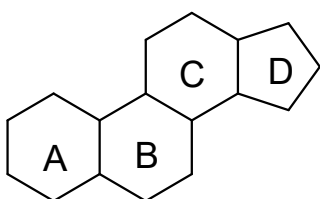
[000478] Um grupo "alquila" refere-se a um grupo hidrocarboneto alifático. Referência a um grupo alquila inclui "alquila saturada" e/ou "alquila insaturada". Um grupo alquila, se saturado ou insaturado, inclui grupos ramificados, de cadeia linear, ou cíclicos. Um grupo alquila "substituído" é substituído com um ou mais grupo(s) adicional(is). Em certas modalidades, um ou mais grupo(s) adicional(is) são individualmente e independentemente selecionados de amida, éster, alquila, cicloalquila, heteroalquila, arila, heteroarila, heteroalíclico, hidróxi, alcóxi, arilóxi, alquiltio, ariltio, alquilsulfóxido, arilsulfóxido, éster, alquilsulfona, arilsulfona, ciano, halogênio, alcoíla, alcoilo, isocianato, tiocianato, isotiocianato, nitro, haloalquila, haloalcóxi, fluoroalquila, amino, alquil-amino, dialquil-amino, amido, oxo, produto natural hidrofóbico tal como um esteroide, uma cadeia aralquila (incluindo alcoxiarila), cadeia alquila contendo uma porção acila, ou similares. Em algumas modalidades, um grupo alquila é ligado à posição  $N\alpha$  de um resíduo (por exemplo, Tyr ou Dmt) em um peptídeo. Esta classe é referida como N-alquila e compreende grupos alquila lineares ou ramificados de  $C_1$ - $C_{10}$ , ou um grupo alquila substituída por arila tal como benzila, feniletila e similares. Em algumas modalidades, uma porção alquila é um grupo 1-alquila que está em ligação glicosídica (tipicamente na posição 1 de, por exemplo, glicose) à porção sacarídeo. Tal grupo 1-alquila é um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila.

[000479] Um grupo "arila" refere-se a um anel aromático em que cada dos átomos que formam o anel é um átomo de carbono. Anéis arila descritos aqui incluem anéis tendo cinco, seis, sete, oito, nove, ou mais do que nove átomos de carbono. Grupos arila são opcionalmente substituídos com substituintes selecionados de halogênio, alquila, acila, alcóxi, alquiltio, sulfonila, dialquil-amino, carboxila ésteres, ciano ou similares. Exemplos de grupos arila incluem, porém não estão limitados

à fenila, e naftalenila.

[000480] O termo "acila" refere-se a uma cadeia  $C_1-C_{20}$  acila. Esta cadeia pode compreender uma cadeia alifática linear, uma cadeia alifática ramificada, uma cadeia contendo uma porção alquila cíclica, um produto natural hidrofóbico, tal como um esteroide, uma cadeia aralquila, ou uma cadeia alquila contendo uma porção acila.

[000481] O termo "núcleo esteroide" refere-se ao núcleo de esteroides compreendendo uma combinação de quatro anéis fundidos designados A, B, C e D como mostrado abaixo:



. Exemplos de porções contendo núcleo de esteroide incluem, e não são limitados a, colesterol e similares.

[000482] Como usado aqui, uma "composição terapêutica" pode compreender uma mistura com um veículo ou excipiente aquoso ou orgânico, e pode ser composto, por exemplo, com os veículos farmacologicamente aceitáveis não tóxicos usuais para comprimidos, péletes, cápsulas, liofilizados, supositórios, soluções, emulsões, suspensões, ou outra forma adequada para uso. Os veículos, além daqueles descritos acima, podem incluir alginato, colágeno, glicose, lactose, manose, goma acácia, gelatina, manitol, pasta de amido, trissilicato de magnésio, talco, amido de milho, ceratina, sílica coloidal, amido de batata, ureia, triglicerídeos de cadeia média, dextranas, e outros veículos adequados para uso na fabricação de preparações, em forma sólida, semissólida, ou líquida. Além disso, agentes estabilizantes auxiliares, espessantes ou colorantes, podem ser usados, por exemplo, um agente seco estabilizante, tal como triulose.

[000483] Como usado aqui, um "veículo farmacologicamente aceitável" ou "veículo eficaz terapêutico" é aquoso ou não aquoso (sólido), por exemplo, alcoólico ou oleaginoso, ou uma mistura dos mesmos, e pode

conter um tensoativo, emoliente, lubrificante, estabilizante, pigmento, perfume, preservativo, ácido ou base para ajuste do pH, um solvente, emulsificante, agente gelificante, umidificante, estabilizante, agente umectante, agente de liberação com o tempo, umectante, ou outro componente comumente incluído de uma forma particular de composição farmacêutica. Veículos farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, soluções aquosas, tais como água ou salina fisiologicamente tamponada ou outros solventes ou veículos, tais como glicóis, gliceróis, e óleos, tal como óleo de oliva ou ésteres orgânicos injetáveis. Um veículo farmacêuticamente aceitável pode conter compostos fisiologicamente aceitáveis que agem, por exemplo, para estabilizar ou aumentar a absorção de inibidor específico, por exemplo, carboidratos, tais como glicose, sacarose ou dextranas, antioxidantes, tais como ácido ascórbico ou glutathione, agentes quelantes, proteínas de baixo peso molecular ou outros estabilizantes ou excipientes.

[000484] Como usado aqui, uma quantidade "ressensibilizante à insulina" de um produto de peptídeo é uma quantidade que aumenta a resposta do corpo à insulina endógena ou exogenamente administrada, tipicamente ao mesmo tempo em que reduzindo o peso corporal, em um indivíduo em necessidade disso, como evidenciado, por exemplo, por um teste de desafio de glicose oral ou teste de grampo euglicêmico.

[000485] As composições farmacêuticas podem também conter outras substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis como requerido para condições fisiológicas aproximadas, tais "substâncias" incluem, porém não estão limitadas a, agentes de ajuste de pH e de tamponamento, agentes de ajuste de tonicidade e similares, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, etc. Adicionalmente, o peptídeo, ou variante do mesmo, suspensão pode incluir agentes protetores de lipídeo que

protegem lipídeos contra danos de radical livre e peroxidativos de lipídeo em armazenagem. Saciadores de radical livre lipofílicos, tal como quelantes de alfa-tocoferol e específicos de ferro solúveis em água, tal como ferrioxamina, são adequados.

[000486] Como usado aqui, um "tensoativo" é um agente tensoativo que modifica a tensão interfacial de água. Tipicamente, tensoativos têm um grupo ou região lipofílica e um hidrofílico na molécula. Amplamente, o grupo inclui sabões, agentes detergentes, emulsificantes, dispersantes e umectantes, e diversos grupos de antissépticos. Mais especificamente, os tensoativos incluem esteariltrietaolamina, sódio lauril sulfato, taurocolato de sódio, ácido laurilaminopropiônico, lecitina, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio e monoestearato de glicerina; e polímeros hidrofílicos, tais como álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol (PEG), carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, hidroximetilcelulose, hidroxietilcelulose e hidroxipropilcelulose ou alquil glicosídeos. Em algumas modalidades, um tensoativo é um tensoativo não iônico (por exemplo, um tensoativo de alquil glicosídeo). Em algumas modalidades, um tensoativo é um tensoativo iônico.

[000487] Como usado aqui, "alquil glicosídeo" refere-se a qualquer açúcar ligado por uma ligação a qualquer alquila hidrofóbica, como é conhecido na técnica. A alquila hidrofóbica pode ser escolhida de qualquer tamanho desejado, dependendo da hidrofobicidade desejada e a hidrofiliabilidade da porção de sacarídeo. Em um aspecto, a faixa de cadeias alquila é de 1 a 30 átomos de carbono; ou de 6 a 16 átomos de carbono.

[000488] Como usado aqui, "sacarídeo" é inclusivo de monossacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos em formas de cadeia linear ou anel. Oligossacarídeos são sacarídeos tendo dois ou mais resíduos monossacarídeos. Alguns exemplos dos muitos

sacarídeos possíveis para uso em forma funcionalizada incluem glicose, galactose, maltose, maltotriose, maltotetraose, sacarose, trealose ou similares.

[000489] Como usado aqui, "ésteres de sacarose" são ésteres de sacarose de ácidos graxos. Ésteres de sacarose podem tomar muitas formas por causa dos oito grupos hidroxila em sacarose disponível para reação e os muitos grupos de ácido graxo, de acetato em até gorduras maiores, mais maciças que podem ser reagidas com sacarose. Esta flexibilidade significa que muitos produtos e funcionalidades podem ser adaptadas, com base na porção de ácido graxo usada. Ésteres de sacarose têm usos de alimento e não alimento, especialmente como tensoativos e emulsificantes, com aplicações de desenvolvimento em produtos farmacêuticos, cosméticos, detergentes e aditivos alimentares. Eles são biodegradáveis, não tóxicos e suáveis para a pele.

[000490] Como usado aqui, um alquil glicosídeo "adequado" significa aquele que é não tóxico e não iônico. Em alguns casos, um alquil glicosídeo adequado reduz a imunogenicidade ou agregação e aumenta a biodisponibilidade de um composto quando ele é administrado com o composto por meio das rotinas ocular, nasal, nasolacrimal, sublingual, bucal, inalação ou por rotinas de injeção, tais como as rotinas subcutânea, intramuscular, ou intravenosa.

[000491] Um "aminoácido ligante" é qual aminoácido natural ou não natural que compreende um grupo funcional reativo (de Graaf, A.J., e outro (2009) Bioconjug Chem 20: 1281-1295) que é usado para ligação covalente com um tensoativo funcionalizado. A título de exemplo, em algumas modalidades, um aminoácido ligante é Lys, ou Orn tendo um grupo funcional reativo  $-NH_2$ ; ou Cys, tendo um grupo funcional reativo  $-SH$ ; ou Asp ou Glu, tendo um grupo funcional reativo  $-C(=O)-OH$ . A título de exemplo, em algumas outras modalidades, um aminoácido ligante é qualquer aminoácido tendo um grupo funcional reativo tal como



-OH, -N<sub>3</sub>, haloacetila ou um grupo acetilênico que é usado para formação de uma ligação covalente com um tensoativo adequadamente funcionalizado.

[000492] Como usado aqui, um "tensoativo funcionalizado" é um tensoativo compreendendo um grupo reativo adequado para ligação covalente com um aminoácido ligante. A título de exemplo, em algumas modalidades, um tensoativo funcionalizado compreende um grupo carboxílico (por exemplo, na posição 6 de um monossacarídeo) como o grupo reativo adequado para ligação covalente com um aminoácido ligante. A título de exemplo, em algumas modalidades, um tensoativo funcionalizado compreende um grupo -NH<sub>2</sub>, um grupo -N<sub>3</sub>, um grupo acetilênico, um grupo haloacetila, um grupo -O-NH<sub>2</sub>, ou um grupo - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-maleimida, por exemplo, na posição 6 de um monossacarídeo (como mostrado no Esquema 6), que provê a ligação covalente com um adequado aminoácido ligante. Em algumas modalidades, um tensoativo funcionalizado é um composto de Fórmula II como descrito aqui. Opcionalmente, em algumas modalidades específicas, um tensoativo funcionalizado compreende um aminoácido ligante covalentemente ligado; o peptídeo modificado por tensoativo é então formado por adição sequencial de um ou mais aminoácidos ao aminoácido ligante.

[000493] Como usado aqui, o termo "peptídeo" é qualquer peptídeo compreendendo dois ou mais aminoácidos. O termo peptídeo inclui polipeptídeos, peptídeos curtos (por exemplo, peptídeos compreendendo entre 2 a 14 aminoácidos), peptídeos de comprimento médio (15-50) ou peptídeos de cadeia longa (por exemplo, proteínas). Os termos peptídeo, polipeptídeo, peptídeo e proteína de comprimento médio podem ser usados alternadamente aqui. Como usado aqui, o termo "peptídeo" é interpretado para significar um polímero composto de resíduos de aminoácido, variantes estruturais de ocorrência natural relacionadas, e análogos do mesmo de ocorrência não natural sintéticos

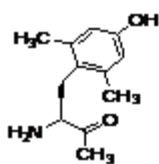
ligados por meio de ligações de peptídeo, variantes estruturais de ocorrência natural relacionadas, e análogos do mesmo de ocorrência não natural sintéticos. Peptídeos sintéticos podem ser sintetizados, por exemplo, usando um sintetizador de peptídeo automatizado.

[000494] Peptídeos podem conter aminoácidos exceto os aminoácidos codificados pelo gene. "Peptídeo(s)" incluem aqueles modificados ou por processos naturais, tal como processamento e outras modificações postranslacionais, porém também por técnicas de modificação química. Tais modificações são bem descritas em textos básicos e em monografias mais detalhadas, e são bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Será apreciado que em algumas modalidades, o mesmo tipo de modificação esteja presente no mesmo ou graus variáveis em diversos sítios em um determinado peptídeo. Além disso, um determinado peptídeo, em algumas modalidades, contém mais do que um tipo de modificações. Modificações ocorrem em qualquer lugar em um peptídeo, incluindo o esqueleto do peptídeo, as cadeias laterais de aminoácido, e as terminações amino ou carboxila.

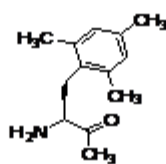
[000495] O termo peptídeo inclui peptídeos ou proteínas que compreendem aminoácidos naturais e não naturais ou análogos de aminoácidos naturais. Como usado aqui, "análogos" de peptídeo e/ou proteína compreendem aminoácidos não naturais com base N<sup>os</sup> aminoácidos naturais, tais como análogos de tirosina, que incluem tirosinas *para*-substituídas, tirosinas *orto*-substituídas, e tirosinas meta-substituídas, em que o substituinte na tirosina compreende um grupo acetila, um grupo benzoíla, um grupo amino, uma hidrazina, uma hidroxiamina, um grupo tiol, um grupo carbóxi, um grupo metila, um grupo isopropila, um C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificado, um hidrocarboneto saturado ou insaturado, um grupo O-metila, um grupo poliéter, um halogênio, um grupo nitro, ou similares. Exemplos de análogos de Tyr incluem 2,4-dimetil-tirosina (Dmt), 2,4-

dietil-tirosina, O-4-alil-tirosina, 4-propil-tirosina, C $\alpha$ -metil-tirosina e similares. Exemplos de análogos de lisina incluem ornitina (Orn), homolisina, C $\alpha$ -metil-lisina (CMeLys), e similares. Exemplos de fenilalanina análogos incluem, porém não estão limitados a, fenilalaninas *meta*-substituídas, em que o substituinte compreende um grupo metóxi, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquila, por exemplo, um grupo metila, um grupo alila, um grupo acetila, ou similares. Exemplos específicos incluem, porém não estão limitados a, 2,4,6-trimetil-L-fenilalanina (Tmt), O-metil-tirosina, 3-(2-naftil)alanina (Nal(2)), 3-(1-naftil)alanina (Nal(1)), ácido 3-metil-fenilalanina, 1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic), fenilalaninas fluoradas, isopropil-fenilalanina, p-azido-fenilalanina, p-acil-fenilalanina, p-benzoil-fenilalanina, p-iodo-fenilalanina, p-bromofenilalanina, p-amino-fenilalanina, e isopropil-fenilalanina e similares. Outros aminoácidos não padrões ou não naturais usados em projeto de análogo de peptídeo incluem e não estão limitados a aminoácidos C-alfa-dissubstituídos tal como Aib, C $\alpha$ -dietilglicina (Deg), ácido aminociclopentano-1-carboxílico (Ac5c), e similares. Tais aminoácidos frequentemente levam a uma estrutura reprimida, frequentemente oblíqua a uma estrutura alfa helicoidal (Kaul, R. e Balaram, P. (1999) Bioorg Med Chem 7: 105-117). Exemplos adicionais de tais aminoácidos não naturais úteis em projeto análogo são Homo-arginina (Har), e similares. A substituição de ligações de amida reduzidas em certos casos leva à proteção de destruição enzimática ou altera a ligação ao receptor. A título de exemplo, a incorporação de uma unidade de dipeptídeo Tic-Phe com uma ligação de amida reduzida entre os resíduos (designados como Tic- $\Psi$ [CH<sub>2</sub>-NH]- $\Psi$ -Phe) reduz a degradação enzimática. Consequentemente, também contemplado dentro do escopo de modalidades são descritos aqui tensoativos covalentemente ligados a peptídeos que compreendem análogos de aminoácidos e/ou peptídeo modificados descritos acima. Certos

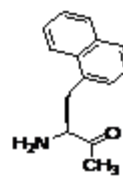
aminoácidos não naturais são mostrados abaixo.



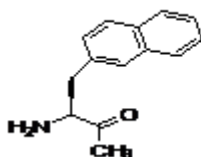
2,6-dimetil-L-tirosina  
(Dmt)



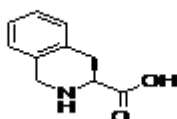
2,4,6-trimetil-L-fenilalanina  
(Tmp)



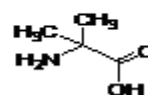
2-(1-naftil-L-alanina)  
(Nal(1))



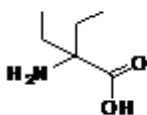
2-(2-naftil-L-alanina)  
(Nal(2))



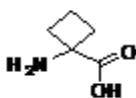
ácido 1,2,3,4-tetraidroisoquino-  
lina-3-carboxílico (Tic)



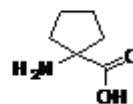
ácido  
alfa-amino  
(Aib)



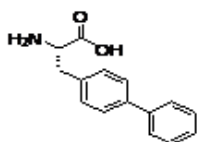
2,2-dietilglicina  
(Deg)



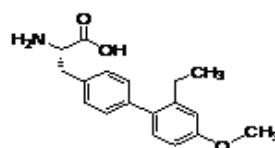
ácido 2-aminociclobutano-  
1-carboxílico (Ac4c)



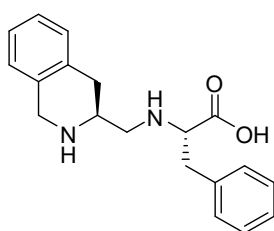
ácido aminociclopentano-1-  
carboxílico (Ac5c)



2-L-bifenil-alanina (Bip)  
(Bip2EtMeO)



2-L-(2'-etil,4'-metóxi)-bifenil-alanina



(Tic-Ψ[CH<sub>2</sub>-NH]-Ψ-Phe).

[000496] Como usado aqui, o termo "variante" é interpretado significar um peptídeo que seja diferente de um peptídeo de referência, porém

mantém propriedades essenciais. Uma variante típica de um peptídeo difere em sequência de aminoácido de outro peptídeo de referência. Geralmente, as diferenças são limitadas de modo que as sequências do peptídeo de referência e a variante sejam intimamente similares totalmente e, em muitas regiões, idênticos. Uma variante e peptídeo de referência podem diferir em sequência de aminoácido por uma ou mais substituições, adições, deleções em qualquer combinação. Um resíduo de aminoácido substituído ou inserido pode ou não ser um codificado pelo código genético. Variantes de ocorrência não natural de peptídeos podem ser feitas por técnicas de mutagênese, por síntese direta, e por outros métodos recombinantes adequados.

### **Métodos**

[000497] São fornecidos aqui, em algumas modalidades, métodos para prevenção e/ou tratamento de condições associadas com decréscimos em sensibilidade de insulina, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo descrito aqui (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) a indivíduos em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, as condições caracterizadas por decréscimos em sensibilidade de insulina incluem, e não estão limitadas a, a síndrome metabólica, resistência à insulina relacionada com a obesidade, hipertensão, inflamação sistêmica associada com proteína reativa C elevada, diabetes, ou similares.

[000498] Também são fornecidos aqui métodos para tratamento de resistência à insulina compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo descrito aqui (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) a indivíduos em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, a

resistência à insulina está associada com a síndrome metabólica (Síndrome X) e/ou diabetes.

[000499] São também fornecidos aqui métodos para estimular a ressensibilização do corpo à insulina, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo descrito aqui (por exemplo um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) a indivíduos em necessidade do mesmo.

[000500] Em ainda outras modalidades, são fornecidos aqui métodos para aumentar a sensibilidade à insulina através da perda de peso, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo descrito aqui (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V e na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2) a indivíduos em necessidade do mesmo.

[000501] São também fornecidos aqui métodos de tratar diabetes ou prediabetes compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito acima e aqui e na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2 a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[000502] São fornecidos aqui métodos para tratar ou retardar a progressão ou início de condições selecionadas de diabetes, retinopatia diabética, neuropatia diabética, nefropatia diabética, resistência à insulina, hiperglicemia, hiperinsulinemia, síndrome metabólica, complicações diabéticas, níveis sanguíneos elevados de ácidos graxos livres ou glicerol, hiperlipidemia, obesidade, hipertrigliceridemia, aterosclerose, síndrome cardiovascular aguda, infarto, reperfusão isquêmica a hipertensão, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito aqui e na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2 a um indivíduo em

necessidade do mesmo. Em uma modalidade adicional, são fornecidos aqui métodos para tratar retardos em cicatrização de ferimento, compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito aqui e na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2 a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[000503] Em uma modalidade, a referida condição a ser tratada é a diabetes. Em uma modalidade a referida condição a ser tratada é a resistência à insulina. Em uma modalidade a referida condição a ser tratada é a síndrome metabólica. Em uma modalidade a referidda quantidade eficaz do referido peptídeo é de cerca de 0,1 µg/kg/dia a cerca de 100,0 µg/kg/dia.

[000504] Em uma modalidade o método de administração é parenteral. Em uma modalidade o método de administração é per oral. Em uma modalidade o método de administração é subcutâneo. Em uma modalidade o método de administração é insuflação nasal.

[000505] É também fornecido aqui um método de reduzir o ganho de peso ou induzir a perda de peso compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito aqui e na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2 a um indivíduo em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, o ganho de peso está associada com a síndrome metabólica.

[000506] É fornecido aqui um método de tratamento de hipoglicemia compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito aqui e na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2 a um indivíduo em necessidade do mesmo.

[000507] Também são fornecidos aqui métodos para tratamento de diabetes compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo descrito aqui e na Tabela 1 de Figura 1 e Tabela 2 de Figura 2 a um indivíduo em necessidade do mesmo e pelo menos um agente terapêutico adicional; em que o referido agente

terapêutico é selecionado de um agente antidiabético, um agente antiobesidade, um agente de saciedade, um agente anti-inflamatório, um agente anti-hipertensivo, um agente antiaterosclerótico e um agente redutor de lipídeo.

[000508] Em algumas modalidades dos métodos descritos acima, o peptídeo e/ou proteína que é covalentemente ligado a um tensoativo é um glucagon ou peptídeo GLP-1, ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado profilaticamente e retarda a ocorrência de qualquer condição associada com a resistência à insulina, incluindo e não limitada à síndrome metabólica, hipertensão, diabetes, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, hiperlipidemia, aterosclerose, inflamação sistêmica ou similares. Em algumas modalidades, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado terapeuticamente e retarda a progressão de qualquer condição associada com a síndrome metabólica, hipertensão, diabetes, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, hiperlipidemia, aterosclerose, inflamação sistêmica ou similares. Em algumas modalidades, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado profilaticamente e/ou terapeuticamente e retarda a progressão de resistência à insulina para diabetes. Em algumas modalidades, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado profilaticamente e/ou terapeuticamente e reduz ou detém perda adicional de resistência à insulina, desse modo estabilizando a doença.

[000509] Em algumas modalidades, o peptídeo e/ou proteína



modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado parenteralmente. Em algumas modalidades, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado subcutaneamente. Em algumas modalidades, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado por insuflação nasal.

[000510] Em algumas modalidades dos métodos descritos acima, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) tem uma maior duração de ação em comparação a um produto farmacêutico compreendendo produtos terapêuticos atualmente conhecidos (por exemplo, exenatida, metformina ou similares).

### **Terapia de Combinação**

[000511] Em algumas modalidades dos métodos descritos acima, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado em combinação com outros métodos de tratamento da síndrome metabólica selecionado do grupo compreendendo um agente antidiabético, um agente antiobesidade, um agente anti-hipertensivo, um agente antiaterosclerótico e um agente redutor de lipídeo. A título de exemplo, agentes antidiabéticos eficazes adequados para a administração em combinação com um produto de peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo descrito aqui incluem uma biguanida, uma sulfonilureia, um inibidor de glicosidase, um agonista de PPAR $\gamma$ , um agonista dual de PPAR $\alpha/\gamma$ , um inibidor de  $\alpha$ P2, um inibidor de DPP4, um sensibilizante à insulina, um análogo de GLP-1, insulina e uma meglitinida. Exemplos adicionais incluem metformina, gliburida, glimepirida, glipirida, glipizida, clorpropamida, gliclazida, acarbose,

migliitol, pioglitazona, troglitazona, rosiglitazona, muraglitazar, insulina, GI-262570, isaglitazona, JTT-501, NN-2344, L895 645, YM-440, R-119702, A19677, repaglinida, nateglinida, KAD 1129, AR-HO 39242, GW-40 I 5 44, KRP2 I 7, AC2993, LY3 I 5902, NVP-DPP-728A e saxagliptina.

[000512] Em algumas modalidades dos métodos descritos acima, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado em combinação com outros métodos de tratamento da síndrome metabólica selecionado do grupo de agentes antiobesidade eficazes. A título de exemplo, agentes antiobesidade eficazes adequados para administração com os produtos de peptídeo descritos aqui incluem agonista beta 3 adrenérgico, um inibidor de lipase, um inibidor de recaptação de serotonina (e dopamina), um composto receptor beta de tireoide, um antagonista de CB-I, um NPY-Y2 e um agonista de receptor de NPY-Y4 e um agente anorético. Membros específicos destas classes compreendem orlistat, AfL-962, A1967I,L750355, CP331648, sibutramina, topiramato, axocina, dexanfetamina, fentermina, fenilpropanolamina, rimonabante (SR1 4I7164), e mazindol.

[000513] Em algumas modalidades dos métodos descritos acima, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado em combinação com outros métodos de tratamento da síndrome metabólica selecionado do grupo de agentes redutores de lipídeo eficazes. A título de exemplo, agentes redutores de lipídeo eficazes adequado para administração com os produtos de peptídeo descritos aqui incluem agentes selecionados do grupo que consiste em um inibidor de MTP, proteína de transferência de éster de colesterol, um inibidor de HMG CoA redutase, um inibidor de esqualeno sintetase, um

derivado de ácido fibríco, um super regulador de atividade de receptor de LDL, um inibidor de lipoxigenase, e um inibidor de ACAT. Exemplos específicos destas classes compreendem pravastatina, lovastatina, sinvastatina, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, nisvastatina, visastatina, fenofibrato, genfibrozil, clofibrato, avasimibe, TS-962, MD-700, CP -52941 4, e LY295 427.

[000514] Em algumas modalidades dos métodos descritos acima, o peptídeo e/ou proteína modificado por tensoativo (por exemplo, um produto de peptídeo de Fórmula I-A, III-A, III-B ou Fórmula V) é administrado em combinação com hormônios de peptídeo, e análogos dos mesmos, que são conhecidos apresentarem efeitos prossaciedade em modelos animais e em homem. É contemplada dentro do escopo de modalidades apresentadas aqui uma combinação do produtos de peptídeo descritos aqui e agentes de saciedade de longa ação para o tratamento de obesidade. Exemplos de tais agentes de saciedade de peptídeo incluem GLP-1, polipeptídeo pancreático (PP), colecistocinina (CCK), peptídeo YY (PYY), amilina, calcitonina, OXM, neuropeptídeo Y (NPY), e análogos dos mesmos (Bloom, S.R., e outro (2008) Mol Interv 8: 82-98; Field, B.C., e outro (2009) Br J Clin Pharmacol 68: 830-843).

[000515] São também contemplados dentro do escopo das modalidades apresentadas aqui, métodos para o tratamento de obesidade compreendendo a administração de produtos de peptídeo descritos aqui em combinação com hormônios de peptídeo incluindo e não limitados a análogos e antagonistas de leptina, grelina e CART (transcrição regulada por cocaína e anfetamina).

[000516] Produtos de peptídeo adicionais no corpo estão associados com células de gordura ou o estado obeso (adipocinas) e são conhecidos terem efeitos proinflamatórios (Gonzalez-Periz, A. e Claria, J. (2010) ScientificWorldJournal 10: 832-856). Tais agentes terão ações favoráveis adicionais quando usados em combinação com os produtos

de peptídeo descritos aqui. Exemplos de agentes que oferecem um efeito benéfico quando usados em combinação com os produtos de peptídeo descritos aqui incluem análogos e antagonistas de adiponectina, quemerina, visfatina, nesfatina, omentina, resistina, TNF $\alpha$ , IL-6 e obestatina.

### **Intermediários**

[000517] Em uma modalidade fornecida aqui são intermediários e/ou reagentes compreendendo uma porção tensoativa e um grupo funcional reativo capaz de formar uma ligação com um grupo funcional reativo em um aminoácido natural ou não natural. Estes intermediários e/ou reagentes provêm melhora na biodisponibilidade e comportamento farmacêutico, farmacocinético e/ou farmacodinâmico de peptídeos e/ou proteínas de uso em doença humana e animal. Ligação covalente de tais intermediários e/ou reagentes por meio de grupo funcional em uma cadeia lateral de um aminoácido, por exemplo, em uma função de épsilon-amino de Lys, uma sulfidril de Cys, ou na terminação amino ou carbóxi do alvo de peptídeo e/ou proteína provê a síntese dos produtos de peptídeo descritos aqui. Em modalidades específicas, porções tensoativas não iônicas são mono ou dissacarídeos com uma substituição O-alkil glicosídica, a referida ligação glicosídica sendo da configuração alfa ou beta. Em modalidades específicas, cadeias O-alkila são de cadeias C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> ou de C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub> alkila.

[000518] Em outra modalidade fornecida aqui estão intermediários e/ou reagentes compreendendo uma porção tensoativa não iônica, com certa ligação alkil glicosídica que imita ligações O-alkil glicosídica e um grupo funcional reativo capaz de formar uma ligação com um grupo funcional reativo em um aminoácido natural ou não natural. Tais intermediários e/ou reagentes contêm cadeias alkila ligadas a S ou cadeias alkila ligadas a N e têm estabilidade química e/ou enzimática alterada, em comparação com os produtos ligados a alkil glicosídeo

ligado a O.

[000519] Em algumas modalidades, um intermediário e/ou reagente é fornecido aqui um composto em que o grupo hidrofílico é uma glicose modificada, galactose, maltose, ácido glucurônico, ácido diglucurônico ou similares. Em algumas modalidades, o grupo hidrofílico é glicose, maltose, ácido glucurônico, ou ácido diglucurônico e o grupo hidrofóbico é uma cadeia C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquila ou uma cadeia aralquila. Em algumas modalidades a ligação glicosídica ao grupo hidrofóbico é de uma configuração alfa e em algumas das ligações é beta no centro anomérico no sacarídeo.

[000520] Em algumas modalidades, o grupo hidrofílico é glicose, maltose, ácido glucurônico, ou ácido diglucurônico e o grupo hidrofóbico é uma cadeia C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alquila ou aralquila.

[000521] Em algumas modalidades, um intermediário e/ou reagente fornecido aqui compreende um tensoativo contendo um grupo funcional reativo que é um grupo de ácido carboxílico, um grupo amino, uma azida, um aldeído, uma maleimida, uma sulfidril, um grupo hidroxilamino, uma alcino ou similares.

[000522] Em algumas modalidades, o intermediário e/ou reagente é um alquil glicosídeo ligado a O com uma das funções hidroxila modificadas para ser um grupo de ácido carboxílico ou funcional de amino. Em algumas modalidades, o reagente é um ácido 1-O-alquil glucurônico de configuração alfa ou beta e a cadeia alquila é de C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub> de comprimento. Em algumas de tais modalidades, o grupo alquila é de C<sub>6</sub> a C<sub>16</sub> de comprimento.

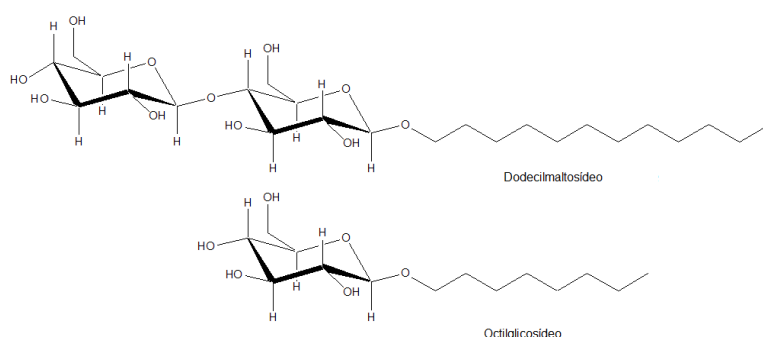
[000523] Em algumas modalidades, o reagente compreende um ácido 1-O-alquil diglucurônico de configuração alfa ou beta e a cadeia alquila é de C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub> de comprimento. Em algumas de tais modalidades, o grupo alquila é de C<sub>6</sub> a C<sub>16</sub> de comprimento.

[000524] Em algumas modalidades, o reagente é um alquil glicosídeo

ligado a S de configuração alfa ou beta com uma das funções hidroxila modificado para ser um ácido carboxílico ou grupo funcional de amino.

[000525] Em algumas modalidades, o reagente é um alquil glicosídeo ligado a N de configuração alfa ou beta com uma das funções hidroxila modificado para ser um ácido carboxílico ou grupo funcional de amino.

[000526] Em ainda outra modalidade fornecida aqui estão produtos de peptídeo e/ou proteína contendo um alquil glicosídeo covalentemente ligado com propriedades aceitáveis para uso em doença humana e animal. O Esquema 1 lista tensoativos não iônicos exemplares que podem ser modificados para produzir os reagentes e/ou intermediários que são úteis para a síntese de produtos de peptídeo modificados por tensoativo descritos aqui.

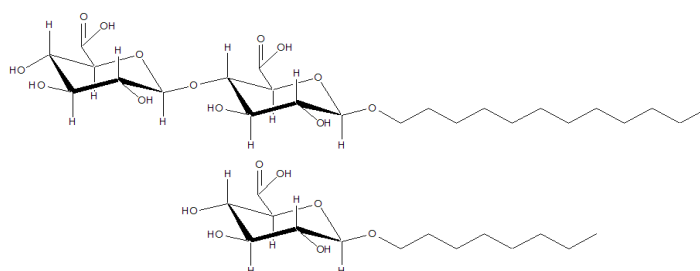


### **Esquema 1. Exemplos de tensoativos não iônicos comercialmente disponíveis da classe de alquil glicosídeo**

[000527] Em algumas modalidades, os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui incorporam uma porção tensoativa na estrutura de peptídeo. Em modalidades específicas, os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui incorporam um tensoativo não iônico da classe de alquil, alcoxiaril, ou aralquil glicosídeo. Os alquil glicosídeos são importantes mercadorias e são amplamente usados nas indústrias alimentícias, de serviço e limpeza. Desse modo, sua produção em escala comercialmente significativa foi o objeto de estudo extensivo. Processos tanto enzimáticos quanto químicos estão disponíveis para sua produção em

custo muito baixo (Park, D.W., e outro (2000) *Biotechnology Letters* 22: 951-956). Estes alquil glicosídeos podem ser modificados também para gerar os intermediários para a síntese dos peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui. Desse modo, sabe-se que 1-dodecil  $\beta$ -D-glicosídeo é preferencialmente oxidado na posição para produzir o correspondente análogo de ácido glucurônico em produção elevada quando usando o material desprotegido e catalisador negro de platina na presença de oxigênio (van Bekkum, H. (1990) *Carbohydrates as Organic Raw Materials* 289-310). Métodos quimiosseletivos adicionais para oxidação do álcool primário na posição 6 de alquil glicosídeos estão disponíveis. Por exemplo, o uso de quantidades catalíticas de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxila (TEMPO) com quantidades estequiométricas do oxidante orgânico [bis(acetóxi)iodo]benzeno (BAIB) (De Mico, A., e outro (1997) *J Org Chem* 1997: 6974-6977) forneceu produções importantes de ácidos nucleosídeo-5'-carboxílico (Epp, J.B. e Widlanski, T.S. (1999) *J Org Chem* 64: 293-295) por oxidação da hidroxila primária. Esta oxidação é quimiosseletiva para a hidroxila primária, mesmo quando as outras hidroxilas secundárias sejam desprotegidas (Codee, J.D., e outro (2005) *J Am Chem Soc* 127: 3767-3773). De uma maneira similar, 1-dodecil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 1-tetradecil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 1-hexadecil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo, 1-octadecil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo e 1-eicosil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo foram oxidados para os correspondentes ácidos urônicos (ácido 1-dodecil  $\beta$ -D-glucurônico, ácido 1-tetradecil  $\beta$ -D-glucurônico, ácido 1-hexadecil  $\beta$ -D-glucurônico, 1- ácido octadecil  $\beta$ -D-glucurônico, ácido 1-eicosil  $\beta$ -D-glucurônico) por oxidação com TEMPO usando KBr e hipoclorito de sódio como oxidante estequiométrico (Milkereit, G., e outro (2004) *Chem Phys Lipids* 127: 47-63) em água. Um procedimento de suave oxidação usando (diacetoxiiodo)benzeno (DAIB aka BAIB) é dado N<sup>os</sup> exemplos. Certos destes intermediários de

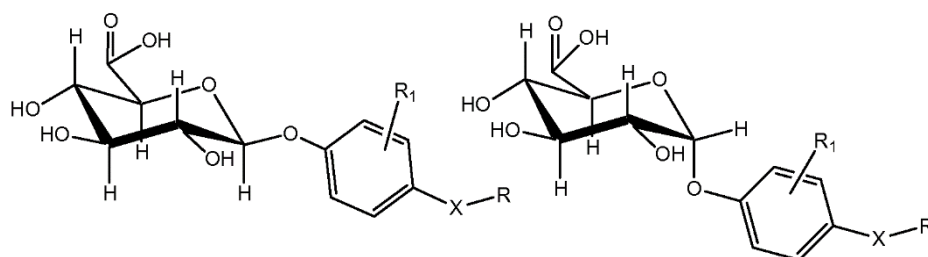
ácido glucurônico são comercialmente disponíveis (for Exemplo ácido octil b-D-glucurônico; Carbosynth, MO 07928) e, como indicado, uma ampla faixa são submetidos à preparação por métodos de rotina (Schamann, M. e Schafer, H.J. (2003) Eur J Org Chem 351-358; Van den Bos, L.J., e outro (2007) Eur J Org Chem 3963-3976) ou, sob solicitação, de fontes comerciais. O esquema 2 ilustra, como exemplos, certos intermediários funcionalizados tensoativos compreendendo um grupo –COOH como um grupo funcional reativo que são usados para preparar os intermediários e/ou reagentes descritos aqui.



**Esquema 2. Exemplos de reagentes de classe de ácido alquil diglucurônico e glucurônico.**

[000528] Similarmente, aralquil glicosídeos (incluindo alcoxiarila) podem formar a base para tensoativos reagentes não iônicos intimamente relacionados. Por exemplo, 4-alcóxifenil β-D-glucopiranosídeos são facilmente sintetizados pela reação de 4-alkiloxifenóis com penta-O-acetila β-D-glicose na presença de eterato de trifluoreto de boro. Subsequente desacetilação usando trimetilamina em metanol/água e oxidação seletiva, como descrito acima e N<sup>os</sup> exemplos, produz os reagentes de ácido alcóxiaril glucurônico adequados para formar os reagentes e peptídeos descritos aqui ((Smits, E., e outro (1996) J Chem Soc, Perkin Trans I 2873-2877; Smits, E., e outro (1997) Liquid Crystals 23: 481-488).

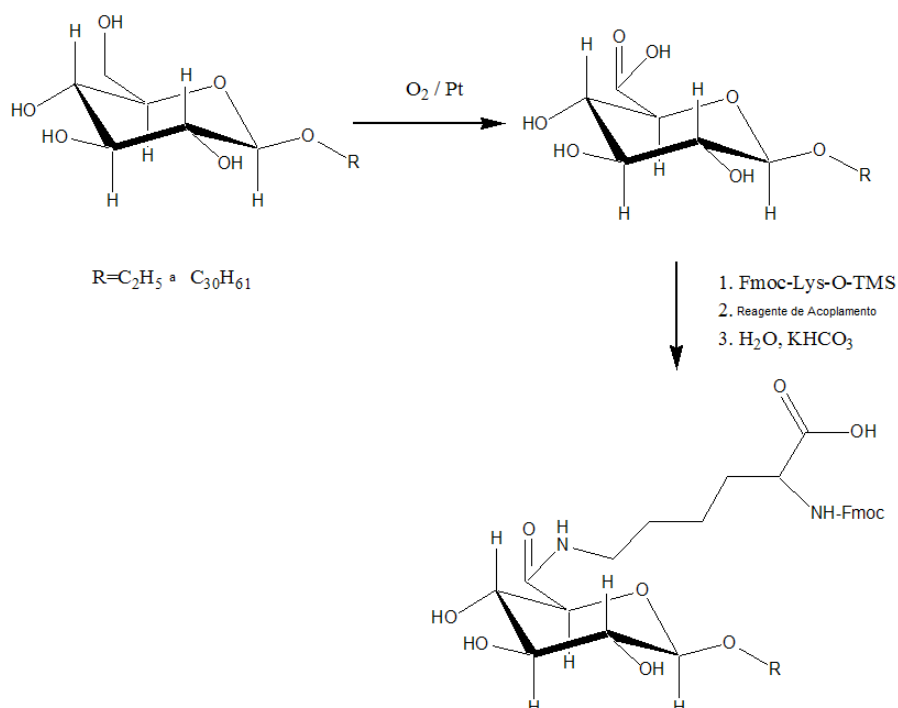




X = O, S, N, CH<sub>2</sub>, NHCO e similares

**Esquema 3. Membros ilustrativos de porção tensoativa de aralquila ou alcoxiarila.**

[000529] A classe de ácido glucurônico de intermediário é facilmente ativada por agentes de acoplamento padrão para ligação a uma cadeia lateral de aminoácido, por exemplo, aquela de Lys. Desse modo Fmoc-Lys-O-TMS (trimetilsilila = TMS) pode ser reagido com ácido octil beta-D-glucurônico na presença de um agente de acoplamento e o grupo de proteção de O-TMS pode então ser hidrolizado em preparação aquosa para produzir Fmoc-Lys (1-octil beta-D-glucuronamida) como mostrado no Esquema 4. Este reagente pode ser usado para incorporação na síntese de fase sólida de peptídeos, usando protocolos de acoplamento padrão, quando é desejado incorporar a porção tensoativa próxima da região de terminal N da molécula. Os grupos hidroxila secundários podem ser deixados desprotegidos, devido à reatividade muitíssimo maior do Grupo funcional de amino Lys ou eles podem ser protegidos por peracetilação. Se uma forma protegida de acetila é usada, os grupos de proteção de acetila podem ser removidos em alta produção por tratamento com ou MeOH/NaOMe ou por MeOH/Et<sub>3</sub>N. O esquema 4 ilustra a preparação dos reagentes descritos aqui.



#### Esquema 4. Exemplo de uma preparação de um reagente.

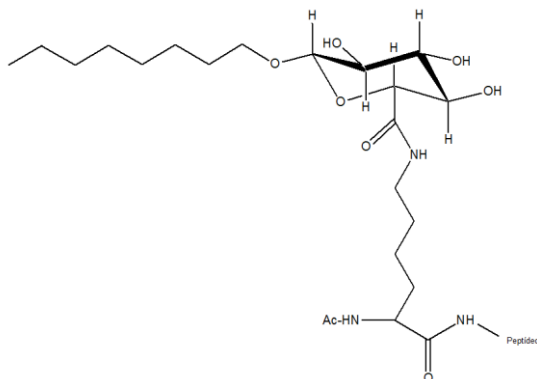
[000530] Em algumas modalidades, reagentes e/ou intermediários para a preparação dos produtos de peptídeo biologicamente ativos descritos aqui compreendem uma família de aminoácidos ligantes modificados por tensoativo para incorporação em produtos de peptídeo sintéticos. Desse modo em uma modalidade, são descritos aqui produtos de peptídeo sintetizados de um modo linear em que um tensoativo funcionalizado é ligado a um aminoácido ligante reversivelmente protegido por meio de grupo funcional em uma cadeia lateral de um aminoácido ligante (por exemplo, um grupo amino de um resíduo de lisina) para produzir um reagente proprietário (como mostrado no Esquema 4.) que pode ser incorporado na cadeia de peptídeo em desenvolvimento e em seguida o peptídeo restante é sintetizado por ligação de outros aminoácidos ao resíduo de cisteína. O grupo de proteção adequado para a síntese de peptídeos e/ou proteína modificados descritos aqui são descritos em, por exemplo, T. W. Green, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1999, 503-507, 736-739, cuja descrição é

incorporada aqui por referência.

[000531] Em outra modalidade, produtos de peptídeo descritos aqui são sintetizados por ligação covalente de um tensoativo funcionalizado a um peptídeo longo por meio de grupo funcional adequado em um aminoácido ligante que está em uma cadeia de peptídeo.

[000532] Alternativamente um tensoativo funcionalizado pode ser adicionado a uma cadeia lateral de aminoácido ligante que foi desprotegido durante o curso da síntese de fase sólida do peptídeo. Como um exemplo, um grupo alquil glucuronila pode ser adicionado diretamente a uma cadeia lateral de aminoácido ligante (por exemplo, uma cadeia lateral de Lys desprotegida) durante a síntese de fase sólida do peptídeo. Por exemplo, uso de Fmoc-Lys(Alloc)-OH como uma subunidade fornece proteção ortogonal que pode ser removida enquanto o peptídeo está ainda sobre a resina. Desse modo a desproteção da Cadeia lateral de Lys usando Pd/tiobarbital ou outra receita de desproteção de Alloc permite a exposição do grupo amino para acoplamento com a unidade de ácido 1-octil beta-D-glucurônico protegido ou desprotegido por acila. A desproteção final com um coquetel de clivagem de baixo % de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  (TFA) então liberará o produto desejado. Embora a ligação glicosídica seja lábil ao ácido forte, a experiência aqui e por outros é que é relativamente estável a condições de clivagem de baixo % de TFA. Alternativamente, a proteção de acila (por exemplo, acetila, Ac; benzoíla, Bz) ou proteção de trialkylsilyl  $\text{N}^\circ$  grupos funcionais de OH de sacarídeo pode ser usada para fornecer proteção aumentada à ligação glicosídica. Subsequente desproteção por base ( $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{MeOH}$ ;  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ ,  $\text{NaOMe}/\text{MeOH}$ ) produz o produto desprotegido desejado. O esquema 4 ilustra reagentes descritos aqui. O esquema 5 ilustra um exemplo não limitante de um intermediário de peptídeo descrito aqui. Embora este exemplo illustre um peptídeo com a ligação de tensoativo na terminação N do

peptídeo, os métodos descritos aqui são adequados para a síntese de intermediários de peptídeo tendo a ligação a um tensoativo na região mediana, a região de terminal C ou qualquer posição dentro do peptídeo.



#### **Esquema 5. Exemplo Ilustrativo de um intermediário de peptídeo.**

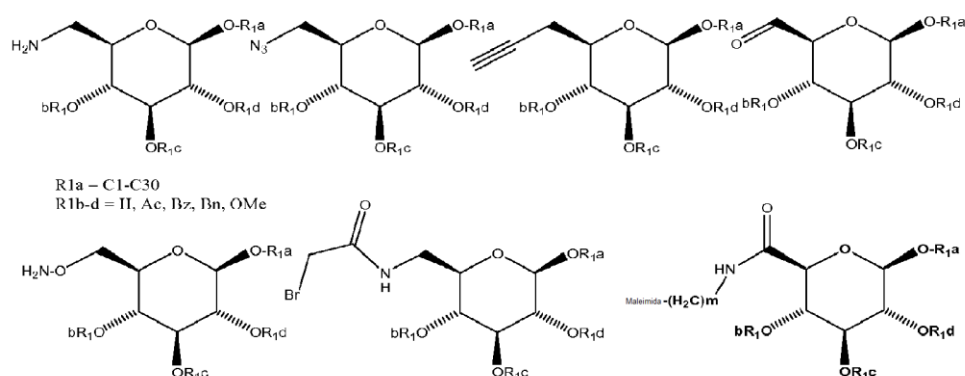
[000533] Reagentes adicionais são gerados por modificação do grupo funcional de posição 6 para fornecer métodos variados de ligação a grupos funcionais de cadeia lateral de aminoácido, como mostrado abaixo no esquema 6. Desse modo, a substituição de amino pode ser usada para ligação a cadeias laterais de Asp ou Glu. A substituição de azido ou alcino pode ser usada para ligação a aminoácidos não naturais contendo o acceptor complementar para cicloadição de Huisgen 3+2 (Gauthier, M.A. e Klok, H.A. (2008) Chem Commun (Camb) 2591-2611). Grupos funcionais de aminóxi ou aldeído podem ser usados para ligação a aldeído (isto é, ligação de oxima) ou para funções de amino (isto é, alquilação reductiva), respectivamente. O grupo funcional de maleimida ou  $\text{-NH-(C=O)-CH}_2\text{-Br}$  pode ligar-se quimiosseletivamente com um Cys ou outro grupo funcional de SH. Estes tipos de estratégias de ligação são vantajosos quando usados em conjunto com os reagentes descritos aqui. Interconversão de grupos funcionais é amplamente praticada em síntese orgânica e lista completa de múltiplas rotinas para cada das modificações de grupo funcionais listadas aqui estão disponíveis (Larock, R.C. (1999)) "Comprehensive Organic Transformações", VCH Publishers, Nova Iorque.

[000534] Desse modo, por exemplo, a hidroxila primária na posição 6 de octil 1- $\beta$ -D-glicosídeo é convertida na azida por ativação e remoção com um ânion de azida, reações tais como reações usadas em química de carboidrato (por exemplo, por tosilção seguido por  $\text{NaN}_3$ ). A azida correspondente é reduzida para a função de amino por redução com ácido tiolacético em piridina (Elofsson, M., e outro (1997) *Tetrahedron* 53: 369-390) ou por métodos similares de geração de grupo amino (Stangier, P., e outro (1994) *Liquid Crystals* 17: 589-595). Métodos para porções de acetileno, aminóxi, e aldeído são melhor realizados na forma de triacetóxi, disponível do glicosídeo comercialmente disponível por tratamento com  $\text{Ac}_2\text{O}$ , seguido por branda hidrólise da amina primária. Esta forma de 6-hidróxi pode ser seletivamente oxidada para o aldeído, ou ativada como um tosilato ou triflato e removida por  $\text{NH}_2\text{OH}$  ou por acetilida de sódio. A ligação de maleimida pode ser através de uma ligação de carbono como mostrado ou, preferivelmente através de uma ligação de O ou amida, novamente por remoção da hidroxila ativada ou acoplamento do derivado de ácido glucurônico a um reagente de maleimida ligado a amino, bem conhecido na técnica. Interconversões de grupo funcional adicionais são bem conhecidas por aqueles de média experiência na técnica de química medicinal e incluem-se no escopo das modalidades descritas aqui.

[000535] Também contemplado dentro do escopo de métodos sintéticos descritos aqui são os tensoativos em que o sacarídeo e cadeia hidrofóbica são covalentemente ligados por meio de uma ligação alfa glicosídica. Rotinas sintéticas para glicosídeos predominantemente  $\alpha$ -ligados são bem conhecidas na técnica e tipicamente originam-se com o açúcar de peracetila e uso de catálise acídica (por exemplo,  $\text{SnCl}_4$ ,  $\text{BF}_3$  ou  $\text{HCl}$ ) para realizar a  $\alpha$ -glicosilação (Cudic, M. e Burstein, G.D. (2008) *Methods Mol Biol* 494: 187-208; Vill, V., e outro (2000) *Chem Phys Lipids* 104: 75-91, incorporados aqui por referência para tal

descrição). Rotinas sintéticas similares existem para glicosídeos de dissacarídeo (von Minden, H.M., e outro (2000) *Chem Phys Lipids* 106: 157-179, incorporado aqui por referência para tal descrição). Interconversões de grupo funcional então prosseguem como acima para levar ao ácido 6-carboxílico ácido, e outro para geração dos correspondentes reagentes  $\alpha$ -ligados.

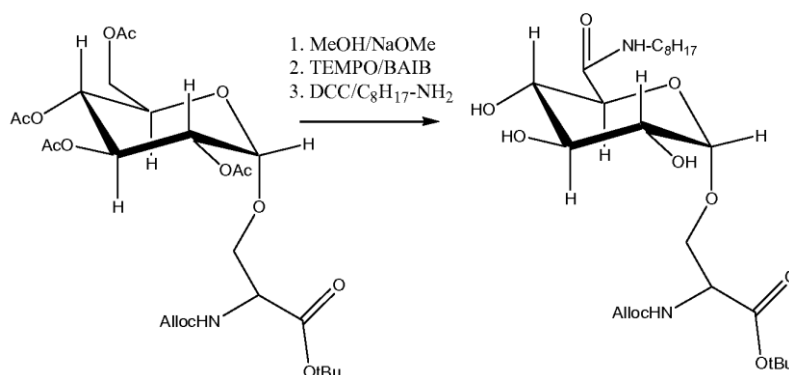
[000536] O esquema 6 lista certos compostos e reagentes úteis na síntese dos peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui. Nomenclatura padrão usando abreviações de única letra para aminoácidos é usada.



### Esquema 6. Exemplos de reagente adicionais.

[000537] Muitos alquil glicosídeos podem ser sintetizados por procedimentos conhecidos, como descrito, por exemplo, em (Rosevear, P., e outro (1980) *Biochemistry* 19: 4108-4115, Li, Y.T., e outro (1991) *J Biol Chem* 266: 10723-10726) ou Koeltzow e Urfer, J. *Am. Oil Chem. Soc.*, 61:1651-1655 (1984), Patente dos Estados Unidos No. 3.219.656 e Patente dos Estados Unidos No. 3.839.318 ou enzimaticamente, como descrito, por exemplo, em (Li, Y.T., e outro (1991) *J Biol Chem* 266: 10723-10726, Gopalan, V., e outro (1992) *J Biol Chem* 267: 9629-9638). Ligações O-alkila a aminoácidos naturais, tal como Ser, podem ser realizadas no Fmoc-Ser-OH usando peracetilglicose para produzir N $\alpha$ -Fmoc-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-L-serina. Este material é seletivamente desprotegido no átomo de carbono primário

(posição 6) e seletivamente oxidado usando TEMPO/BAIB como descrito acima para produzir a correspondente função de 6-carboxila que pode ser acoplada a aminas lipofílicas para gerar uma nova classe de tensoativo e reagentes não iônicos (Esquema 7).



**Esquema 7. Exemplo alternativo de reagente de tensoativo não iônico.**

[000538] A ligação entre a alquila hidrofóbica e o sacarídeo hidrofílico pode incluir, entre outras possibilidades, um glicosídico, tioglicosídico, amida (Carbohydrates as Organic Raw Materials, F. W. Lichtenthaler ed., VCH Publishers, Nova Iorque, 1991), ureído (Austrian Pat. 386,414 (1988); Chem. Abstr. 110:137536p (1989); veja Gruber, H. e Greber, G., "Reactive Sucrose Derivatives" in Carbohydrates as Organic Raw Materials, pp. 95-116) ou ligação de éster (Sugar Esters: Preparation and Application, J. C. Colbert ed., (Noyes Data Corp., New Jersey), (1974)).

[000539] Exemplos dos quais úteis alquil glicosídeos podem ser escolhidos para modificação para os reagentes ou para a formulação dos produtos descritos aqui, incluem: alquil glicosídeos, tal como octil-, nonil-, decil-, undecil-, dodecil-, tridecil-, tetradecila, pentadecil-, hexadecil-, heptadecil-, e octadecil-D-maltosídeo, -glicosídeo ou -sacarosídeo (isto é, éster de sacarose) (sintetizados de acordo com Koeltzow e Urfer; Anatrache Inc., Maumee, Ohio; Calbiochem, San Diego, Calif.; Fluka Chemie, Switzerland); alquila tiomaltosídeos, tal

como heptila, octila, dodecil-, tridecil-, e tetradecil- $\alpha$ -D-tiomaltosídeo (sintetizados de acordo com Defaye, J. e Pederson, C., "Hydrogen Fluoride, Solvent and reagent for Carbohydrate Conversion Technology" in *Carbohydrates as Organic Raw Materials*, 247-265 (F. W. Lichtenthaler, ed.) VCH Publishers, Nova Iorque (1991); Ferenci, T., J. Bacteriol, 144:7-11 (1980)); alquil tioglicosídeos, tal como 1-dodecil- ou 1-octil-tio  $\alpha$ -ou  $\beta$ -D-glucopiranosídeo (Anatrace, Inc., Maumee, Ohio; see Saito, S. e Tsuchiya, T. Chem. Pharm. Bull. 33:503-508 (1985)); alquil tiosacaroses (sintetizados de acordo com, por exemplo, Binder, T. P. e Robyt, J. F., Carbohydr. Res. 140:9-20 (1985)); alquil maltotriosídeos (sintetizados de acordo com Koeltzow e Urfer); amidas de ácido carbônico alifático de cadeia longa de amino-alquila éteres de sacarose; (sintetizados de acordo com Austrian Patent 382,381 (1987); Chem. Abstr., 108:114719 (1988) e Gruber e Greber pp. 95-116); derivados de palatinose e isomaltamina ligados por ligação de amida a uma cadeia alquila (sintetizados de acordo com Kunz, M., "Sucrose-based Hydrophilic Building Blocks as Intermediates for the Synthesis of Surfactants and Polimers" in *Carbohydrates as Organic Raw Materials*, 127-153); derivados de isomaltamina ligados por ureia a uma cadeia alquila (sintetizados de acordo com Kunz); ureídeos de ácido carbônico alifático de cadeia longa de amino-alquila éteres de sacarose (sintetizados de acordo com Gruber e Greber, pp. 95-116); e amidas de ácido carbônico alifático de cadeia longa de amino-alquila éteres de sacarose (sintetizados de acordo com Austrian Patent 382,381 (1987), Chem. Abstr., 108:114719 (1988) e Gruber e Greber, pp. 95-116).

[000540] Alguns glicosídeos preferidos que podem ser também modificados para incorporar funcionalidade reativa para ligação ao peptídeo incluem os sacarídeos maltose, sacarose, glicose e galactose ligados por glicosídico ou ligação de éster a uma cadeia alquila de 6, 8, 10, 12, 14, ou 16 átomos de carbono, por exemplo, hexil-, octil-, decil-,



dodecil-, tetradecil-, e hexadecil-maltosídeo, sacarosídeo, glicosídeo e galactosídeo. No corpo estes glicosídeos são degradados para álcool não tóxico ou ácido graxo e um oligossacarídeo ou sacarídeo. Os exemplos acima são ilustrativos dos tipos de alquil glicosídeos a serem usados N<sup>os</sup> métodos reivindicados aqui, entretanto a lista não se destina a ser exaustiva.

[000541] Geralmente, estes tensoativos (por exemplo, alquil glicosídeos) são opcionalmente designados ou selecionados para modificar as propriedades biológicas do peptídeo, tal como para modular a biodisponibilidade, meia-vida, seletividade de receptor, toxicidade, biodistribuição, solubilidade, estabilidade, por exemplo, térmica, hidrolítica, oxidativa, resistência à degradação enzimática, e similares, facilidade para purificação e processamento, propriedades estruturais, propriedades espectroscópicas, propriedades químicas e/ou fotoquímicas, atividade catalítica, potencial redox, capacidade de reagir com outras moléculas, por exemplo, covalentemente ou não covalentemente, e similares.

### **Tensoativos**

[000542] O termo "tensoativo" descende de encurtamento da frase "agente tensoativo". Em aplicações farmacêuticas, tensoativos são úteis em formulações farmacêuticas líquidas nas quaiseles servem para diversos propósitos, agindo como agentes emulsificantes, solubilizantes, e umectantes. Emulsificantes estabilizam as soluções aquosas de substâncias lipofílicas ou parcialmente lipofílicas. Solubilizantes aumentam a solubilidade de componentes de composições farmacêuticas aumentando a concentração que pode ser obtida. Um agente umectante é um aditivo químico que reduz a tensão de superfície de um fluido, induzindo-o a espalhar-se facilmente sobre uma superfície na qual ele é aplicado, desse modo causando "umectação" uniforme da superfície com os fluidos. Agentes

umectantes fornecem um meio para a formulação líquida obter contato íntimo com a membrana mucosa ou outras áreas de superfície com as quais a formulação farmacêutica vem em contato. Desse modo, os tensoativos podem ser aditivos úteis para estabilização da formulação dos produtos de peptídeo descritos aqui, bem como para a modificação das propriedades do próprio peptídeo.

[000543] Em modalidades específicas, alquil glicosídeos que são sinteticamente acessíveis, por exemplo, os alquil glicosídeos, dodecil, tridecil e tetradecil maltosídeo ou glicosídeo, bem como dodecanoato, tridecanoato, e tetradecanoato de sacarose são adequados para ligação covalente a peptídeos como descrito aqui. Similarmente, os correspondentes alquiltioglicosídeos são tensoativos sinteticamente acessíveis, estáveis, que são aceitáveis para desenvolvimento de formulação.

[000544] Uma ampla faixa de propriedades físicas e tensoativas pode ser obtida por modificação apropriada das regiões hidrofóbicas ou hidrofílicas do tensoativo (por exemplo, um alquil glicosídeo). Por exemplo, um estudo comparando a atividade de bicamada de dodecil maltosídeo (DM) com aquela de dodecil glicosídeo (DG) descobriu aquela de DM ser mais do que três vezes maior do que aquela de DG, a despeito de ter o mesmo comprimento de cauda hidrofóbica (Lopez, O., e outro (2002) *Colloid Polim Sci* 280: 352-357). Neste caso particular a identidade da região polar (disacarídeo vs. monosacarídeo) influencia o comportamento tensoativo. No caso de um tensoativo ligado a um peptídeo, por exemplo, os produtos de peptídeo descritos aqui, a região de peptídeo também pode contribuir caráter hidrofóbico ou hidrofílico para toda a molécula. Desse modo, a adaptação das propriedades físicas e tensoativas pode ser usada para obter as propriedades físicas e farmacêuticas particulares adequadas para os alvos de peptídeo individual.

### **Modificação de PEG**

[000545] Em algumas modalidades, os produtos de peptídeo modificados por tensoativo são descritos aqui também modificados para incorporar uma ou mais porções de PEG (Veronese, F.M. e Mero, A. (2008) *BioDrugs* 22: 315-329). Em alguns casos, a incorporação de cadeias de PEG grandes impedem a filtração do peptídeo N<sup>os</sup> glomérulos N<sup>os</sup> rins na formação de urina diluída ali (Nestor, J.J., Jr. (2009) *Current Medicinal Chemistry* 16: 4399 - 4418, Caliceti, P. e Veronese, F.M. (2003) *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1261-1277). Em algumas modalidades, uma cadeia hidrofílica de PEG opcional provê equilibrar a solubilidade e propriedades físicas dos peptídeos ou proteínas que foram tornados hidrofóbicos pela incorporação da porção de alquil glicosídeo de cadeia mais longa.

[000546] PEGilação de uma proteína pode ter efeitos potencialmente negativos também. Desse modo, a PEGilação pode causar uma perda substancial de atividade biológica para algumas proteínas e isto pode relacionar-se a ligantes para classes específicas de receptores. Em tais casos pode existir um benefício para PEGilação reversível (Peleg-Shulman, T., e outro (2004) *J Med Chem* 47: 4897-4904, Greenwald, R.B., e outro (2003) *Adv Drug Deliv Rev* 55: 217-250, Roberts, M.J. e Harris, J.M. (1998) *J Pharm Sci* 87: 1440-1445).

[000547] Além disso, a massa molecular aumentada pode impedir a penetração de barreiras fisiológicas exceto a barreira de membrana glomerular. Por exemplo, foi sugerido que formas de alto peso molecular de PEGilação podem impedir a penetração em alguns tecidos e, desse modo, reduzir a eficácia terapêutica. Além disso, o peso molecular pode impedir a captação através de barreiras da membrana mucosal (liberação nasal, bucal, vaginal, oral, retal, pulmonar). Entretanto, a captação retardada pode ser altamente vantajosa para administração de moléculas estáveis ao pulmão, substancialmente prolongando a

duração de ação. Os produtos de peptídeo e/ou proteína descritos aqui têm biodisponibilidade transmucosal aumentada e isto permitirá modificações de PEG de cadeia maior a serem usadas em conjunto com a modificação de tensoativo com a obtenção de biodisponibilidade comercialmente significativa seguindo rotina intranasal ou outra transmucosal.

[000548] Em algumas modalidades, polímeros de PEG de cadeia longa, e polímeros de PEG de cadeia curta são adequados para modificação das proteínas e peptídeos descritos aqui. A administração de tratamentos para diabetes por inalação é um novo método para liberação de fármaco e o pulmão tem uma barreira altamente penetrável (por exemplo, Exubera). Para esta aplicação, penetração retardada da barreira do pulmão, formas preferidas de PEGilação são na faixa de menor peso molecular de  $C_{10}$  a  $C_{400}$  (aproximadamente 250 a 10,000Da). Desse modo, enquanto uma rotina primária para prolongamento por PEG é a obtenção de um "peso molecular efetivo" acima, a interrupção da filtração glomerular (maior do que 68kDa), uso de cadeias mais curtas pode ser uma rotina para o prolongamento de residência no pulmão para o tratamento de doenças de pulmão e outras condições respiratórias. Desse modo, cadeias de PEG de cerca de 500 a 3000 Da são de tamanho suficiente para reduzir a entrada na circulação periférica, porém insuficiente para fazer com que elas tenham um tempo de circulação muito prolongado. Em algumas modalidades, PEGilação é aplicada para fornecer eficácia local aumentada para o tecido pulmonar, com potencial reduzido para efeitos colaterais sistêmicos para os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui. Em algumas de tais modalidades, cadeias PEG na faixa de cerca de 750 a cerca de 1500 Da são referidas coletivamente como "PEG1K."

[000549] Além disso, outros polímeros podem ser usados em conjunto

com os compostos descritos aqui, a fim de otimizar suas propriedades físicas. Por exemplo, conjugados de poli(2-etil 2-oxazolina) têm hidrofobicidade variável e tamanho suficiente para realçar a duração de ação (Mero, A., e outro (2008) J Control Release 125: 87-95). Ligação de tal polímero a um sacarídeo produz uma classe de tensoativo adequada para uso em modificação de peptídeos e/ou proteínas descritos aqui.

[000550] Cadeias de polietileno glicol são funcionalizadas para permitir sua conjugação a grupos reativos na cadeia de peptídeo e/ou proteína. Grupos funcionais típicos permitem a reação com grupos amino, carboxila ou sulfidril no peptídeo através dos correspondentes grupos carboxila, amino ou maleimido (e similares) na cadeia de polietileno glicol. Em uma modalidade, PEG compreende uma cadeia C<sub>10</sub>-C<sub>3000</sub>. Em outra modalidade, PEG tem um peso molecular acima de 40,000 Daltons. Em ainda outra modalidade, PEG tem um peso molecular abaixo de 10,000 Daltons. PEG como uma modificação de proteína é bem conhecido na técnica e seu uso é descrito, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos N<sup>os</sup>. 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192, e 4.179.337.

[000551] Um tipo não tradicional de cadeia PEG é modificado para ser de natureza anfifílica. Isto é, ele tem ambos a estrutura de PEG hidrofílica, porém é modificado para conter regiões hidrofóbicas, tal como ésteres de ácido graxo, e outros componentes hidrofóbicos. Veja, por exemplo, (Miller, M.A., e outro (2006) Bioconjug Chem 17: 267-274); Ekwuribe, e outro US 6,309,633; Ekwuribe, e outro US 6,815,530; Ekwuribe, e outro US 6,835,802). Embora estes conjugados de PEG anfifílicos a proteínas tenham sido originalmente desenvolvidos para aumentar a biodisponibilidade oral, eles foram relativamente ineficazes neste papel. Entretanto, o uso de tais conjugados de PEG anfifílicos com peptídeos anfipáticos fornecerá residência significativamente

prolongada no pulmão para estender a atividade biológica útil destes produtos farmacêuticos. As cadeias de PEG preferidas são na faixa de peso molecular de 500 a 3000Da. Descrições detalhadas dos métodos de síntese destes conjugates é dada nas referências acima, a íntegra das quais é incorporada aqui.

[000552] Uma entidade de PEG em si não tem um grupo funcional a ser ligado a um alvo molecular, tal como um peptídeo. Portanto, para criar ligação de PEG, uma entidade de PEG deve ser funcionalizada primeiro, em seguida uma ligação funcionalizada é usada para ligar a entidade de PEG a uma molécula alvo, tal como um peptídeo (Greenwald, R.B., e outro (2003) *Adv Drug Deliv Rev* 55: 217-250, Veronese, F.M. e Pasut, G. (2005) *Drug Discov Today* 10: 1451-1458, Roberts, M.J., e outro (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54: 459-476). Em uma modalidade, PEGilação específica do sítio pode ser obtida através de substituição de Cys em uma molécula de peptídeo. O peptide alvo pode ser sintetizado por síntese de fase sólida, métodos recombinantes, ou outros métodos, como descrito aqui.

[000553] Desse modo, em algumas modalidades, um produto de peptídeo descrito aqui compreende um Lys ou outro resíduo reativo modificado com um alquil glicosídeo e PEGilação específica pelo menos um resíduo de Cys, um resíduo de Lys ou outro resíduo de aminoácido reativo em outro lugar na molécula.

[000554] Em outra modalidade, um Lys ou outro resíduo com uma cadeia lateral nucleofílica pode ser usado para incorporação do resíduo de PEG. Isto pode ser realizado por meio do uso de uma ligação de amida ou carbamato a uma cadeia de PEG-carboxila ou PEG-carbonato. Veja, por exemplo, como descrito (Veronese, F.M. e Pasut, G. (2005) *Drug Discov Today* 10: 1451-1458). Um método alternativo é modificar a cadeia lateral de função de amino de Lys por meio da ligação de um resíduo contendo SH, tal como mercaptoacetila,

mercaptopropionila ( $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ ), e similares. Alternativamente, a cadeia de PEG pode ser incorporada na terminação C como uma amida durante o curso da síntese. Métodos adicionais para ligação de cadeias de PEG utilizam a reação com as cadeias laterais de His e Trp. Outros métodos similares de modificar a cadeia de peptídeo para permitir a ligação de uma cadeia de PEG são conhecidos na técnica e são incorporados aqui por referência (Roberts, M.J., e outro (2002) Adv Drug Deliv Rev 54: 459-476).

### **Formulações**

[000555] Em uma modalidade, os peptídeos ou proteínas covalentemente modificados como descrito aqui são fornecidos em uma formulação que também reduz, previne, ou diminui a associação ou agregação de peptídeo e/ou proteína na composição, por exemplo, reduz a autoassociação ou autoagregação de peptídeo e/ou proteína, ou reduz a associação ou agregação com outros peptídeos ou proteínas quando administrada ao indivíduo.

[000556] A autoassociação em alta concentração de proteína é problemática em formulações terapêuticas. Por exemplo, a autoassociação aumenta a viscosidade de um anticorpo monoclonal concentrado em solução aquosa. Preparações concentradas de insulina são inativadas por autoagregação. Estas interações de proteína de autoassociação, particularmente em alta concentração de proteína, reduzem, modulam ou obliteram a atividade biológica de muitas terapêuticas (Clodfelter, D.K., e outro (1998) Pharm Res 15: 254-262). Proteínas terapêuticas formuladas em altas concentrações para liberação por injeção ou outros métodos podem ser fisicamente instáveis ou tornam-se insolúveis como um resultado destas interações de proteína.

[000557] Um significativo desafio na preparação de formulações de peptídeo e proteína é desenvolver formas de dosagem fabricáveis e

estáveis. Propriedades de estabilidade física, críticas para processamento e manipulação, são frequentemente pobremente caracterizadas e difíceis de prever. Uma variedade de fenômenos de instabilidade física é encontrada, tal como associação, agregação, cristalização e precipitação, como determinado pelas propriedades de interação e solubilidade da proteína. Isto resulta em significantes desafios de fabricação, estabilidade, analíticos, e de liberação. O desenvolvimento de formulações para fármacos de peptídeo e proteína que requeiram alta dosagem (na ordem de mg/kg) é requerido em muitas situações clínicas. Por exemplo, usando a rotina SC, aproximadamente <1,5 mL é o volume de administração permitido. Isto pode requerer concentrações de proteína >100 mg/mL para obter dosagem adequada. Existem considerações similares em desenvolver uma formulação liofilizada de alta concentração para anticorpos monoclonais. Em geral, maiores concentrações de proteína permitem menor volume de injeção a ser usado, o que é muito importante para conforto, conveniência, e aceitação do paciente. Os compostos modificados por tensoativo são descritos aqui designados para minimizar tais eventos de agregação e podem ser também facilitados por meio do uso de pequenas quantidades de tensoativos como aqui descrito.

[000558] Por que a injeção é um modo desconfortável de administração para muitas pessoas, outros métodos de administração de produtos terapêuticos de peptídeo foram pesquisados. Certos produtos terapêuticos de peptídeo e proteína podem ser administrados, por exemplo, por administração intranasal, bucal, oral, vaginal, inalação, ou outra transmucosal. Exemplos são nafarelina (Synarel®) e calcitonina que são administrados como formulações de *spray* nasal comercial. Os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui são designados para facilitar tal administração transmucosal e tais



formulações podem ser também facilitadas por meio do uso de pequenas quantidades de tensoativos como descrito aqui.

[000559] Parâmetros de formulação típicos incluem a seleção de pH de solução ideal, tampão, e excipientes estabilizantes. Adicionalmente, a reconstituição de massa liofilizada é importante para formulações liofilizadas ou em pó. Um outro e significativo problema compreende mudanças em viscosidade da formulação de proteína em autoassociação. Mudanças em viscosidade pode significativamente alterar as propriedades de liberação, por exemplo, em liberação por *spray* (aerossol) para *sprays* intranasal, pulmonar, ou de cavidade oral. Além disso, a viscosidade aumentada pode tornar a liberação de injeção por seringa ou linha mais difícil ou impossível.

[000560] Muitas tentativas de estabilizar e manter a integridade e atividade fisiológica de peptídeos foram reportadas. Muitas tentativas produziram estabilização contra a desnaturação térmica e agregação, particularmente para sistemas de bomba de insulina. Tensoativos poliméricos são descritos (Thurrow, H. e Geisen, K. (1984) *Diabetologia* 27: 212-218; Chawla, A.S., e outro (1985) *Diabetes* 34: 420-424). A estabilização de insulina por estes compostos foi acreditada ser de uma natureza estérica. Entre outros sistemas usados estão os sacarídeos (Arakawa, T. e Timasheff, S.N. (1982) *Biochemistry* 21: 6536-6544), osmólitos, tais como aminoácidos (Arakawa, T. e Timasheff, S.N. (1985) *Biophys J* 47: 411-414), e rompedores de estrutura de água, tal como ureia (Sato, S., e outro (1983) *J Pharm Sci* 72: 228-232). Estes compostos exercem sua ação por modulação da interação hidrofóbica intramolecular da proteína ou peptídeo.

[000561] Vários peptídeos ou proteínas são descritos aqui e podem ser modificados com qualquer dos reagentes tensoativos covalentemente ligados descritos aqui. Vantajosamente, as modificações de peptídeo descritas aqui compreendem ligação

covalente de um tensoativo que compreende grupos tanto hidrofílicos (por exemplo, sacarídeo) quanto hidrofóbicos (por exemplo, cadeia alquila), desse modo provendo estabilização do peptídeo em condições fisiológicas. Em algumas modalidades, ligação covalente de uma porção compreendendo um grupo hidrofílico e grupo hidrofóbico (por exemplo, um tensoativo de glicosídeo) a um peptídeo, e/ou proteína descrita aqui elimina a necessidade de modificação da sequência de aminoácido do peptídeo, e/ou proteína para realçar a estabilidade (por exemplo, reduzir a agregação).

[000562] Em algumas modalidades, as formulações compreendem pelo menos um fármaco compreendendo um peptídeo modificado com um reagente derivado de tensoativo descrito aqui e em formulação adicionalmente pode ser associado com um tensoativo, em que o tensoativo é também compreendido de, por exemplo, um sacarídeo, um alquil glicosídeo, ou outro excipiente e pode ser administrado em um formato selecionado do grupo consistindo em uma gota, um *spray*, um aerossol, um liofilizado, um produto secado por *spray*, um formato de liberação injetável, e um prolongado. O *spray* e o aerossol podem ser obtidos através do uso do dispensador apropriado e pode ser administrado por rotina intranasal, transbucal, inalação ou outra transmucosal. O liofilizado pode conter outros compostos tais como manitol, sacarídeos,  $\alpha$ -lactose anidrosa submícron, gelatina, géis ou polímeros biocompatíveis. O formato de liberação prolongada pode ser uma inserção ocular, microparticulados desgastáveis, polímeros hidrolisáveis, particulados mucoadesivos de dilatação, microparticulados sensíveis ao pH, sistemas de nanopartículas/látex, resinas de permuta de íon e outros géis poliméricos e implantes (Ocusert, Alza Corp., California; Joshi, A., S. Ping e K. J. Himmelstein, Pedido de Patente WO 91/19481). Biodisponibilidade oral significativa é também obtenível.

[000563] As modificações de peptídeo e proteína descritas aqui mitigam e, em alguns casos, podem eliminar a necessidade de solventes orgânicos. Trealose, lactose, e manitol e outros sacarídeos foram usados para prevenir a agregação. A agregação de um anticorpo monoclonal humanizado anti-IgE foi minimizada por formulação com trealose em ou acima de uma relação molar na faixa de 300:1 a 500:1 (excipiente:proteína). Entretanto, os pós foram excessivamente coesivos e inadequados para administração aerossol ou apresentaram glicação de proteína indesejada durante armazenagem (Andya, J.D., e outro (1999) Pharm Res 16: 350-358). Cada dos aditivos descobriu-se ter limitações como aditivo para produtos terapêuticos, incluindo metabolismo xenobiótico, irritação ou toxicidade, ou alto custo. Contemplados para uso com os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados são descritos aqui excipientes que são eficazes, não irritantes e não tóxicos, não requerem metabolismoxenobiótico, visto que eles são compreendidos dos açúcares naturais, ácidos graxos, ou álcoois de cadeia longa, e que podem também ser usados para minimizar a agregação em soluções aquosas ou em reconstituição aquosa de formulações de peptídeo e/ou proteína secas *in situ* por reconstituição aquosa fisiológica por fluidos corporais aquosos, tal como plasma ou saliva.

[000564] Outros componentes de formulação podem incluir tampões e sais fisiológicos, inibidores de protease não tóxicos, tal como inibidor de aprotinina e tripsina de soja, alfa-1-antitripsina, e anticorpos monoclonais inativadores de protease, entre outros. Tampões podem incluir orgânicos, tais como acetato, citrato, gluconato, fumarato, malato, polilisina, poliglutamato, quitosana, sulfato de dextrana, etc. ou inorgânicos, tais como fosfato e sulfato. Tais formulações podem adicionalmente conter pequenas concentrações de agentes bacteriostáticos, como álcool benzílico, e similares.

[000565] Formulações adequadas para administração intranasal também compreendem soluções ou suspensões dos produtos de peptídeos e/ou proteína modificados descritos aqui em um solvente de evaporação aceitável, tal como hidrofluoroalcanos. Tais formulações são adequadas para administração de inaladores dosificados (MDI) e têm vantagens de ausência de movimento a partir do sítio de administração, baixa irritação e ausência de necessidade de esterilização. Tais formulações podem também conter excipientes aceitáveis ou agentes de volume, tal como  $\alpha$ -lactose anidrosa submícron.

[000566] Em ainda outro aspecto, os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui exibem meia vida aumentada. Como usado aqui, a frase "vida de prateleira" é amplamente descrita como a duração do tempo em que um produto pode ser armazenado, sem que se torne inadequado para o uso ou consumo. A "vida de prateleira" da composição descrita aqui, pode também indicar a duração do tempo que corresponde a uma perda tolerável na qualidade da composição. A vida de prateleira composicional como usada aqui é distinguida da data de expiração; "vida de prateleira" refere-se à qualidade da composição descrito aqui, ao passo que "data de expiração" refere-se mais aos requisitos de fabricação e teste da composição. Por exemplo, a composição passou de sua "data de expiração" pode também ser segura e eficaz, porém a qualidade ideal não é mais garantida pelo fabricante.

### **Dosagem**

[000567] Os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui podem ser administrados em qualquer quantidade para conferir efeito terapêutico benéfico em diversos estados de doença. Em algumas modalidades, peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados são descritos aqui úteis no tratamento de inflamação. Em

uma modalidade, compostos apresentados aqui conferem atividade benéfica na modulação de dor pós-operatória ou crônica. Em uma modalidade, os peptídeos são administrados a um paciente em concentrações maiores ou menores do que aquela de outras formas de tratamento que modulam a dor. Em ainda outra modalidade, os peptídeos são administrados com outros compostos para produzir efeitos terapêuticos sinérgicos.

[000568] Regimes de liberação representativos incluem administração oral, transmucosal, modos de administração parenteral (incluindo injeção subcutânea, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa), retal, bucal (incluindo sublingual), transdérmica, inalação, ocular e transmucosal (incluindo intranasal). Um método atrativo e amplamente usado para liberação de peptídeos vincula a injeção subcutânea de uma formulação injetável de liberação controlada. Em algumas modalidades, peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados são descritos aqui úteis para administração subcutânea, intranasal e inalação. Além disso, dependendo da condição que está sendo tratada, estas composições terapêuticas são administradas sistemicamente ou localmente. Técnicas para formulação e administração podem ser encontradas na última edição de "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.).

[000569] A seleção da dose exata e composição e o regime de liberação mais apropriado serão influenciados, entre outras coisas, pelas propriedades farmacológicas do peptídeo selecionado, a natureza e severidade da condição que está sendo tratada, e a condição física e acuidade mental do receptor. Adicionalmente, a rotina de administração resultará em quantidades diferenciais de material absorvido. Biodisponibilidades para administração de peptídeos através de diferentes rotinas são particularmente variáveis, com quantidades de menos do que 1% até aproximadamente 100% sendo observadas.

Tipicamente, a biodisponibilidade de rotinas exceto injeção intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea é de 50% ou menos.

[000570] Em geral, peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui, ou sais dos mesmos, são administrados em quantidades entre cerca de 0,1 e 1000 µg/kg peso corporal por dia, ou entre cerca de 0,1 a cerca de 100 µg/kg peso corporal por dia, por injeção subcutânea. Para um indivíduo feminino humano de 50 kg, a dose diária de ingrediente ativo é de cerca de 5 a cerca de 5000 µg, ou de cerca de 5 a cerca de 5000 µg por injeção subcutânea. Diferentes doses serão necessárias, dependendo da rotina de administração, a potência do composto, o perfil farmacocinético e a biodisponibilidade aplicável observada. Por inalação, a dose diária é de 1000 a cerca de 20,000 µg, duas vezes ao dia. Em outros mamíferos, tais como cavalos, cães, e gado vacum, doses maiores podem ser requeridas. Esta dosage pode ser liberada em uma composição farmacêutica convencional por uma única administração, por aplicações múltiplas, ou por meio de liberação controlada, quando necessário para obter os resultados mais eficazes.

[000571] Sais farmacêuticamente aceitáveis mantêm a atividade biológica desejada do peptídeo origem, sem efeitos colaterais tóxicos. Exemplos de tais sais são (a) sais de adição de ácido formados com ácidos inorgânicos, por exemplo, ácido hidrolórico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico e similares; e sais formados com ácidos orgânicos tais como, por exemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucônico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tânico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglutâmico, ácidos naftalenossulfônico, ácidos naftaleno dissulfônicos, ácido poligalacturônico e similares; (b) sais de adição de base ou complexos formados com cátions de metal polivalente tais

como zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio, e similares; ou com um cátion orgânico formado de N,N'-dibenziletilenodiamina ou etilenodiamina; ou (c) combinações de (a) e (b), por exemplo, um sal de tanato de zinco e similares.

[000572] São também contempladas, em algumas modalidades, composições farmacêuticas compreendendo como um ingrediente ativo, peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui, ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em mistura com um veículo não tóxico, farmaceuticamente aceitável. Como mencionado acima, tais composições podem ser preparadas por administração parenteral (subcutânea, intramuscular ou intravenosa), particularmente na forma de soluções ou suspensões líquidas; para administração oral ou bucal, particularmente na forma de comprimidos ou cápsulas; para administração intranasal, particularmente na forma de pós, gotas nasais, soluções de evaporação ou aerossóis; para inalação, particularmente na forma de soluções líquidas ou pós secos com excipientes, definidos amplamente; e para administração retal ou transdérmica.

[000573] As composições podem Convenientemente ser administradas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer dos métodos bem conhecidos na técnica farmacêutica, por exemplo, como descrito in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup>. ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985), incorporado aqui por referência. Formulações para administração parenteral podem conter como excipientes água estéril ou salina, alquileno glicóis tal como propileno glicol, polialquileno glicóis tal como polietileno glicol, sacarídeos, óleos de origem vegetal, naftalenos hidrogenados, nanopartículas de albumina de soro (como usado em Abraxane™, American Pharmaceutical Partners, Inc. Schaumburg IL), e similares. Para administração oral, a formulação pode ser realçada pela adição de

sais biliares ou acilcarnitinas. Formulações para administração nasal podem ser sólidas ou soluções em solventes de evaporação tal como hidrofluorocarbonetos, e podem conter excipientes para estabilização, por exemplo, sacarídeos, tensoativos,  $\alpha$ -lactose anidrosa submícron ou dextrana, ou podem ser soluções aquosas ou oleosas para uso na forma de gotas nasais ou *spray* dosificado. Para administração bucal excipientes típicos incluem açúcares, estearato de cálcio, estearato de magnésio, amido pregelatinado, e similares.

[000574] Quando formuladas para administração nasal, a absorção através da membrana da mucosa nasal pode ser também realçada por tensoativos, tal como, por exemplo, ácido glicocólico, ácido cólico, ácido taurocólico, ácido etocólico, ácido deoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desidrocólico, ácido glicodesoxicólico, ciclodextrinas e similares em uma quantidade na faixa entre cerca de 0,1 e 15% em peso, entre cerca de 0,5 e 4% em peso, ou cerca de 2% em peso. Uma classe adicional de realçadores de absorção reportada exibir maior eficácia com irritação diminuída é a classe de alquil maltosídeos, tal como tetradecil maltosídeo (Arnold, J.J., e outro (2004) J Pharm Sci 93: 2205-2213, Ahsan, F., e outro (2001) Pharm Res 18: 1742-1746) e referências aqui, todas as quais são pelo presente incorporadas por referência.

[000575] Quando formuladas para liberação por inalação, diversas formulações oferecem vantagens. A adsorção do peptídeo ativo aos sólidos facilmente dispersos, tais como as dicetopiperazinas (por exemplo, Technosphere particles; (Pfutzner, A. e Forst, T. (2005) Expert Opin fármaco Deliv 2: 1097-1106) ou estruturas similares fornece uma formulação que resulta em uma rápida captação inicial do agente terapêutico. Pós liofilizados, especialmente partículas vítreas, contendo o peptídeo ativo e um excipiente são úteis para liberação para o pulmão com boa biodisponibilidade, por exemplo, see Exubera<sup>®</sup> (insulina inalada de Pfizer and Aventis Pharmaceuticals Inc.). Sistemas



adicionais para liberação de peptídeos por inalação são descritos (Mandal, T.K., Am. J. Health Syst. Pharm. 62: 1359-64 (2005)).

[000576] Liberação de peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui para um indivíduo durante períodos de tempo prolongado, por exemplo, durante períodos de uma semana a um ano, pode ser realizada por uma única administração de um sistema de liberação controlada, contendo suficiente ingrediente ativo durante o período de liberação desejado. Vários sistemas de liberação controlada, tais como microcápsulas tipo reservatório ou monolíticas, implantes de depósito, hidrogéis poliméricos, bombas osmóticas, vesículas, micelas, lipossomas, emplastros transdérmicos, dispositivos iontoforéticos e formas de dosagem injetáveis alternativas podem ser utilizados para este propósito. Excipientes de liberação controlada foram também desenvolvidos para administrações duas vezes por semana ou semanais, por exemplo, um sistema de copolímero de enxerto protegido (Castillo, G.M., e outro (2012) Pharm Res 29: 306-18) pode ser usado para peptídeos hidrofóbicos ou hidrofobicamente modificados, tais como aqueles da invenção. A localização no sítio para o qual a liberação do ingrediente ativo é desejada é um aspecto adicional de alguns dispositivos de liberação controlada, que podem revelar-se benéficos no tratamento de certos distúrbios.

[000577] Uma forma de formulação de liberação controlada contém o peptídeo ou seu sal disperso ou encapsulado em um polímero não antigênico, não tóxico, lentamente degradante, tal como ácido copoli(lático/glicólico), como descrito no trabalho pioneiro de Kent, Lewis, Sanders, e Tice, Patente dos Estados Unidos Nº. 4.675.189, incorporado por referência aqui. Os compostos, ou seus sais, podem também ser formulados em colesterol ou outras péletes de matriz de lipídeo, ou implantes de matriz de silastômero. Liberação lenta adicional, implante de depósito ou formulações injetáveis serão evidentes para o técnico

versado. Veja, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978, e R. W. Baker, Controlled Release of Biologically Active Agents, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1987.

[000578] Uma forma adicional de formulação de liberação controlada compreende uma solução de um polímero biodegradável, tal como ácido copoli(lático/glicólico) ou copolímeros de bloco de ácido lático e PEG, é solvente bioaceitável, que é injetado subcutaneamente ou intramuscularmente para obter uma formulação de depósito. Mistura dos peptídeos descritos aqui com tal formulação polimérica é adequada para obter formulações de duração de ação muito longa.

[000579] Como usado aqui, "quantidade terapeuticamente eficaz" é alternável com "quantidade eficaz" para os propósitos aqui, e é determinada por tais considerações como são conhecidas na técnica. A quantidade deve ser eficaz para obter um efeito mediado pelo fármaco desejado N<sup>os</sup> indivíduos tratados sofrendo da doença do mesmo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também inclui, porém não está limitada a, medidas apropriadas selecionadas por aqueles versados na técnica, por exemplo, taxa de sobrevivência melhorada, recuperação mais rápida, ou melhora, melhora ou eliminação de sintomas, ou outros biomarcadores aceitáveis ou marcadores substitutos.

[000580] Será entendido, entretanto, que o nível de dose específico e frequência de dosage para qualquer indivíduo particular em necessidade de tratamento pode ser variado e dependerá de uma variedade de fatores incluindo a atividade do composto específico empregado, a estabilidade metabólica e duração de ação daquele composto, a idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, modo e tempo de administração, taxa de excreção, combinação de fármaco, a severidade da condição particular, e o hospedeiro que está passando por terapia.

[000581] O(s) método(s) de dosagem incluem todos os aspectos das composições descritas aqui incluindo, porém não limitados às composições que reduzem ou eliminam a imunogenicidade de fármacos de peptídeo e/ou proteína, são não irritantes, têm atividade antibacteriana ou antifúngica, têm estabilidade aumentada ou biodisponibilidade de um fármaco, diminuem a variação de biodisponibilidade daquele fármaco, evitam a depuração do fígado de primeira passagem e reduzem ou eliminam quaisquer efeitos adversos. Como usado aqui, o termo "imunogenicidade" é a capacidade de uma substância particular ou composição ou agente para provocar uma resposta imunológica. A imunogenicidade dos peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui é confirmada por métodos conhecidos na técnica.

[000582] Todas as publicações e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência na mesma extensão, como se cada publicação independente ou pedido de patente é especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

[000583] Os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui e os reagentes para a síntese dos mesmos são mais particularmente descritos N<sup>os</sup> seguintes exemplos que são destinados como ilustrativos apenas, visto que numerosas modificações e variações inclusas serão evidentes para aqueles versados na técnica.

## **EXEMPLOS**

### **Exemplo 1: Reagentes - N- $\alpha$ -Fmoc, N- $\epsilon$ -(1-octil $\beta$ -D-glucuronídeo-6-il)-L-lisina**

[000584] Em um frasco Erlenmeyer de 250 mL secado em forno é colocado ácido 1-octil  $\beta$ -D-glucurônico (Carbosynth Ltd., 3.06 g, 10 mmol), 50 mL de DMF anidro, e 1-hidroxibenzotriazol anidro (1,62 g, 12 mmol). Uma solução gelada (4°C) de N,N'-dicicloexilcarbodiimida

(2,48g, 12 mmol) em 50 mL de DMF é adicionado, com agitação, e a reação é deixada prosseguir durante 5 minutos. O precipitado branco abundante de N, N'-dicioexilurea é filtrado em um funil de vidro fritado e o filtrado é adicionado a uma solução de N- $\alpha$ -Fmoc-L-lisina (3,68 g, 10 mmols) em 25 ml de DMF anidro. A reação é deixada prosseguir durante 25 minutos, com aquecimento para a temperatura ambiente ou até a cor de ninidrina estar muito fraca. A mistura de reação é filtrada, separada para secar e cristalizada de MeOH/Et<sub>2</sub>O por dissolução em MeOH e lenta diluição para o ponto de turvação com Et<sub>2</sub>O, seguido por refrigeração. Outra purificação pode ser obtida por cromatografia de sílica-gel usando um gradiente de solvente de EtOAc para EtOAc/EtOH/AcOH.

[000585] De uma maneira similar, porém substituindo N- $\alpha$ -Boc-L-lisina é obtido N- $\alpha$ -Boc,N- $\epsilon$ -(1-octil  $\beta$ -D-glucuronídeo-6-il)-L-lisina, adequado para incorporação de terminal N e clivagem para uma terminação N livre. De uma maneira similar, porém substituindo N- $\alpha$ -Ac-L-lisina é obtido N- $\alpha$ -Ac,N- $\epsilon$ -(1-octil  $\beta$ -D-glucuronídeo-6-il)-L-lisina, adequado para incorporação na terminação N de um peptídeo com uma terminal N bloqueada. De uma maneira similar, porém substituindo a quantidade apropriada de N- $\alpha$ -Fmoc-L-ornitina é obtido N- $\alpha$ -Fmoc,N- $\delta$ -(1-octil  $\beta$ -D-glucuronídeo-6-il)-L-ornitina. De uma maneira similar, porém substituindo outros diaminoácidos N-mono-protetidos alguém obtém os correspondentes reagentes. Alternativamente, o uso de um grupo de proteção de éster de Me<sub>3</sub>Si transitório durante o acoplamento e sem preativação do ácido 1-octil  $\beta$ -D-glucurônico fornece uma fácil rotina para a formação dos reagentes. O éster de Me<sub>3</sub>Si transitório é produzido por reação do Fmoc-Lys-OH com uma quantidade equimolar de N,O-bis(trimetilsilil)acetamida em diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). A camada orgânica contém o reagente desejado como uma solução em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pronto para acoplamento com o 1-alkil glucuronídeo como acima. A

mistura de reação filtrada é lavada com  $\text{NaHSO}_4$  aquoso para hidrolisar o éster de  $\text{Me}_3\text{Si}$ , secada sobre  $\text{MgSO}_4$  e o solvente é removido.

[000586] Similarmente, porém usando peracetila ou ácido perbenzoil 1-octil  $\beta$ -D-glucurônico alguém obtém a forma protegida de Ac, ou Bz dos reagentes (por exemplo, ácido 2,3,4-trisacetil 1-octil  $\beta$ -D-glucurônico, e similares, formados por tratamento com  $\text{Ac}_2\text{O}$ ). Tais reagentes têm estabilidade aumentada durante a clivagem de ácido da resina e são usados quando a instabilidade durante a desproteção é detectada, veja (Kihlberg, J., e outro (1997) *Methods Enzymol* 289: 221-245) e referências inclusas. A desproteção final de tais produtos é realizada por transesterificação catalisada na base após a clivagem, pelo uso de  $\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ,  $\text{MeOH}/\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}/\text{NH}_2\text{NH}_2$ , como descrito acima.

### **Exemplo 2: Análogos de peptídeo sintético**

[000587] Em geral, métodos de síntese de peptídeo envolvem a adição sequencial de aminoácidos protegidos a uma cadeia de peptídeo em crescimento. Normalmente, o grupo amino ou carboxila do primeiro aminoácido e qualquer grupo de cadeia lateral reativa são protegidos. Este aminoácido protegido é então ou ligado a um suporte sólido inerte, ou utilizado em solução, e o aminoácido seguinte na sequência, também adequadamente protegido, é adicionado sob condições receptivas à formação da ligação de amida. Após todos os aminoácidos desejados terem sido ligados na sequência apropriada, grupos de proteção e qualquer suporte sólido são removidos para produzir o peptídeo cru. O peptídeo é dessalinizado e cromatograficamente purificado.

[000588] Um método preferido de preparação dos análogos dos peptídeos truncados fisiologicamente ativos, tendo menos do que cerca de cinquenta aminoácidos, envolve a síntese de peptídeo de fase sólida. Neste método as funções de  $\alpha$ -amino ( $\text{N}\alpha$ ) e quaisquer cadeias laterais reativas são protegidas por grupos sensíveis ao ácido ou à base.

O grupo de proteção deve ser estável às condições de formação de ligação de peptídeo, ao mesmo tempo em que sendo facilmente removível sem afetar a cadeia de peptídeo existente. Grupos de proteção de  $\alpha$ -amino adequados incluem, porém não estão limitados a t-butiloxicarbonila (Boc), benziloxicarbonila (Cbz), o-clorobenziloxicarbonila, bifenilisopropiloxicarbonila, t-amiloxicarbonila (Amoc), isoborniloxicarbonila,  $\alpha,\alpha$ -dimetil-3,5-dimetoxibenziloxicarbonila, o-nitrofenilsulfenila, 2-ciano-t-butoxicarbonila, 9-fluorenil-metoxicarbonila (Fmoc) e similares, preferivelmente Boc ou mais preferivelmente, Fmoc. Grupos de proteção de cadeia lateral adequados incluem, porém não estão limitados a: acetila, benzila (Bzl), benziloximetila (Bom), Boc, t-butila, o-bromobenziloxicarbonila, t-butila, t-butildimetilsilila, 2-clorobenzila (Cl-z), 2,6-diclorobenzila, cicloexila, ciclopentila, isopropila, pivalila, tetraidropiran-2-ila, tosila (Tos), 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonila (Pbf), trimetilsilila e tritila. Um grupo de proteção de  $N\alpha$  preferido para a síntese dos compostos é o grupo Fmoc. Os grupos de proteção de cadeia lateral preferidos são grupo O-t-Butila para Glu, Tyr, Thr, Asp e Ser; grupo Boc para cadeias laterais Lys e Trp; grupo Pbf para Arg; grupo Trt para Asn, Gln, e His. Para modificação seletiva de um resíduo Lys, proteção ortogonal com um grupo de proteção não removido por reagentes que clivam os grupos de proteção com base em Fmoc ou t-butila é preferida. Exemplos preferidos para modificação da cadeia lateral de Lys incluem, porém não estão limitados a, aqueles removidos por hidrazina, porém não piperidina; por exemplo, 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxocicloex-1-ilideno)-3-metilbutila (ivDde) ou 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxocicloex-1-ilideno)etila (Dde) e aliloxicarbonila (Alloc). O esquema de grupo de proteção Fmoc-Lys(ivDde) ou Fmoc-Lys(Dde) é preferido em casos onde a formação de lactam de cadeia lateral é desejada (Houston, M.E., Jr., e outro (1995) J Pept Sci 1: 274-282; Murage, E.N., e outro (2010) J Med

Chem), visto que neste caso Fmoc-Glu(O-Alil) e Fmoc-Lys(Alloc) podem ser incorporados e usados para fornecer proteção transitória, em seguida desprotegidos para formação de lactam, enquanto o grupo de proteção de Lys(Dde) permanece para remoção posterior e reação com o tensoativo funcionalizado.

[000589] O esquema do grupo de proteção de Fmoc-Lys(ivDde) ou Fmoc-Lys(Dde) é preferidos em casos onde a formação de lactam de cadeia lateral é desejada (Houston, M.E., Jr., e outro (1995) J Pept Sci 1: 274-282; Murage, E.N., e outro (2010) J Med Chem), visto que neste caso Fmoc-Glu(O-Alil) e Fmoc-Lys(Alloc) podem ser incorporados e usados para fornecer proteção transitória, em seguida desprotegidos para formação de lactam, enquanto o grupo de proteção de Lys(Dde) permanece para remoção posterior e reação com o tensoativo funcionalizado.

[000590] Em síntese de fase sólida, o aminoácido de terminal C é primeiro ligado a um suporte de resina adequado. Suportes de resina adequados são aqueles materiais que são inertes aos reagentes e condições de reação da condensação etapa a etapa e reações de desproteção, bem como sendo insolúvel no meio usado. Exemplos de resinas comercialmente disponíveis incluem resinas de estire/divinilbenzeno modificadas com um grupo reativo, por exemplo, co-poli-(estire-divinilbenzeno) clorometilado, co-poli-(estire-divinilbenzeno) hidroximetilado, e similares. Resina de fenilacetamidometila (PAM) hidroximetilada benzilada é preferida para a preparação de ácidos de peptídeo. Quando a terminação C do composto é uma amida, uma resina preferida é a resina de p-metilbenzidrilamino-co-poli(estire-divinil-benzeno), uma resina com base em 2,4 dimetoxibenzidrilamino ("amida Rink"), e similares. Um suporte especialmente preferido para a síntese de peptídeos maiores são as resinas comercialmente disponíveis contendo sequências de

PEG enxertadas sobre outras matrizes poliméricas, tais como as resinas Rink Amida-PEG e PAL-PEG-PS (Applied Biosystems) ou resinas similares designadas para a síntese de amida de peptídeo usando o protocolo de Fmoc. Desse modo em certos casos é desejável ter uma ligação de amida a uma cadeia de PEG. Aqueles casos são convenientes para se ligar um ácido N-Fmoc-amino-PEG-carboxílico à resina de formação de amida acima (por exemplo resina de amida Rink e similares). O primeiro aminoácido da cadeia pode ser acoplado como um N-Fmoc-aminoácido à função de amino da cadeia de PEG. A desproteção final produzirá o produto desejado de Peptídeo-NH-PEG-CO-NH<sub>2</sub>.

[000591] A ligação à resina PAM pode ser realizada por reação do aminoácido N $\alpha$  protegido, por exemplo, o ácido Boc-amino, como seu amônio, cério, trietilamônio, 1,5-diazabicyclo-[5.4.0]undec-5-eno, tetrametilamônio, ou sal similar em etanol, acetonitrila, N,N-dimetilformamida (DMF), e similares, preferivelmente o sal de cério em DMF, com a resina em uma temperatura elevada, por exemplo, entre cerca de 40° e 60°C, preferivelmente cerca de 50°C, durante cerca de 12 a 72 horas, preferivelmente cerca de 48 horas. Isto eventualmente produzirá o produto de ácido de peptídeo seguindo a clivagem de ácido ou uma amida seguindo aminólise.

[000592] O N $\alpha$ -Boc-aminoácido pode ser ligado à resina de benzidrilamina por meio de, por exemplo, um acoplamento mediado por N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/1-hidroxibenzotriazol (HOBt) durante cerca de 2 a cerca de 24 horas, preferivelmente cerca de 2 horas em uma temperatura entre cerca de 10° e 50 °C, preferivelmente 25 °C em um solvente tal como CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ou DMF, preferivelmente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

[000593] Para protocolos com base em Boc, o acoplamento sucessivo de aminoácidos protegidos pode ser realizado por métodos bem conhecidas na técnica, tipicamente em um sintetizador de peptídeo



automatizado. Seguindo neutralização com trietilamina, N,N-diisopropiletilamina (DIEA), N-metilmorfolina (NMM), colidina, ou base similar, cada aminoácido protegido é introduzido em aproximadamente cerca de 1,5 a 2,5 vezes o excesso molar e o acoplamento realizado em um solvente polar, não aquoso, inerte, tal como CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMF, N-metilpirrolidona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMA), ou misturas dos mesmos, preferivelmente em diclorometano em temperatura ambiente. Para protocolos com base em Fmoc nenhum ácido é usado para desproteção, porém uma base, preferivelmente DIEA ou NMM, é geralmente incorporada na mistura de acoplamento. Os acoplamentos são tipicamente feitos em DMF, NMP, DMA ou solventes mistos, preferivelmente DMF. Agentes de acoplamento representativos são N,N'-dicicloexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropil-carbodiimida (DIC) ou outra carbodiimida, ou sozinhos ou na presença de HOBt, O-acil ureias, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris(pirrolidino)fosfônio (PyBop), N-hidroxisuccinimida, outras N-hidroxiimidas, ou oximas. Alternativamente, ésteres ativos de aminoácido protegido (por exemplo, p-nitrofenila, pentafluorofenila e similares) ou anidridos simétricos podem ser usados. Os agentes de acoplamento preferidos são da classe de amínio/urônio (nomenclaturas alternativas usadas pelos fornecedores), tal como hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio (HBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU), hexafluorofosfato de 2-(6-Cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio (HCTU), e similares.

[000594] Um método preferido de ligação à resina de Fmoc-PAL-PEG-PS pode ser realizado por desproteção do ligante de resina com 20% de piperidina em DMF, seguido por reação do aminoácido protegido por N- $\alpha$ -Fmoc, cerca de um excesso molar de 5 vezes do N- $\alpha$ -Fmoc-aminoácido, usando HBTU: di-isopropiletilamina (DIEA) (1:2) em DMF

em um sintetizador de peptídeo auxiliado por micro-ondas com um ciclo de acoplamento de 75° max, 5 minutos.

[000595] Para este protocolo com base em Fmoc no sintetizador de peptídeo auxiliado por micro-ondas, os grupos de proteção de aminoácido N- $\alpha$ -Fmoc são removidos com 20% de piperidina em DMF, contendo 1-hidroxibenzotriazol a 0,1M (HOBt), em um protocolo de desproteção dupla durante 30 segundos e em seguida durante 3 minutos, com uma fixação máxima de temperatura a 75°C. HOBt é adicionado à solução de desproteção para reduzir a formação de aspartimida. O acoplamento do próximo aminoácido então emprega um excesso molar de cinco vezes, usando HBTU:DIEA (1:2) com um ciclo de acoplamento duplo de 75° max., 5 minutos.

[000596] No término da síntese de fase sólida o peptídeo totalmente protegido é removido da resina. Quando a ligação ao suporte da resina é do tipo benzila éster, a clivagem pode ser realizada por meio de aminólise com uma alquilamina ou fluoroalquilamina para peptídeos com uma terminação C de alquilamida, ou por aminólise com, por exemplo, amônia/metanol ou amônia/etanol para peptídeos com uma terminação C de amida não substituída, em uma temperatura entre cerca de -10° e 50°C, preferivelmente cerca de 25°C, durante cerca de 12 e 24 horas, preferivelmente cerca de 18 horas. Peptídeos com uma terminação C de hidróxi pode ser clivada por HF ou outro regime de desproteção fortemente acídica ou por saponificação. Alternativamente, o peptídeo pode ser removido da resina por transesterificação, por exemplo, com metanol, seguido por aminólise ou saponificação. O peptide protegido pode ser purificado por sílica-gel ou HPLC de fase reversa.

[000597] Os grupos de proteção de cadeia lateral podem ser removidos do peptídeo por tratamento do produto de aminólise com, por exemplo, fluoreto de hidrogênio líquido anidro na presença de anisol

ou outro recuperador de íon de carbônio, tratamento com complexo de fluoreto de hidrogênio/piridina, tratamento com tris(trifluoroacetil)boro e ácido trifluoroacético, por redução com hidrogênio e paládio sobre carbono ou polivinilpirrolidona, ou por redução com sódio em amônia líquida, preferivelmente com fluoreto de hidrogênio líquido e anisol em uma temperatura entre cerca de -10° e +10°C, preferivelmente em cerca de 0°C, durante cerca de 15 minutos e 2 horas, preferivelmente cerca de 1,5 horas.

[000598] Para peptídeos nas resinas do tipo benzidrilamina, a clivagem da resina e etapas de desproteção podem ser combinadas em uma única etapa utilizando fluoreto de hidrogênio líquido e anisol, como descrito acima ou preferivelmente através do uso de coquetéis de clivagem mais suaves. Por exemplo, para a resina de PAL-PEG-PS, um método preferido é através do uso de um protocolo de desproteção dupla no sintetizador de peptídeo auxiliado por micro-ondas usando um dos coquetéis de clivagem suaves conhecidos na técnica, tal como TFA/água/tri-iso-propilsilano/3,6-dioxa-1,8-octanoditiol (DODT) (92,5/2,5/2,5/2,5) durante 18 minutos a 38°C cada vez. A clivagem de materiais contendo alquil glicosídeo tem mostrado sobrevivência da ligação de alquil glicosídeo usando protocolos com relações de TFA/água na faixa de 9/1 a 19/1. Um coquetel típico é de 94% de TFA: 2% de EDT; 2% de H<sub>2</sub>O; 2% de TIS. Tipicamente o produto totalmente desprotegido é precipitado e lavado com Et<sub>2</sub>O frio (-70° a 4°C), dissolvido em água desionizada e liofilizado.

[000599] A solução de peptídeo pode ser dessalinizada (por exemplo, com a resina de permuta de ânion BioRad AG-3®) e o peptídeo purificado por uma sequência de etapas cromatográficas empregando qualquer ou todos os seguintes tipos: permuta de íon sobre uma resina fracamente básica na forma de acetato; cromatografia de adsorção hidrofóbica em co-poli(estire-divinilbenzeno) não derivado, por exemplo

Amberlite® XAD; cromatografia de adsorção de sílica-gel; cromatografia de permuta de íon sobre carboximetilcelulose; cromatografia, por exemplo on Sephadex® G-25; distribuição contracorrente; cromatografia de fluido supercrítico; ou HPLC, especialmente HPLC de fase reversa em empacotamento de coluna de fase ligada de octil- ou octadecilsilil-sílica (ODS).

[000600] São também fornecidos aqui processos para preparar peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui e sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos, cujos processos compreendem aminoácidos protegidos por condensação sequencial em um suporte de resina adequado, removendo os grupos de proteção e suporte de resina, e purificando o produto, para produzir análogos dos homólogos truncados fisiologicamente ativos e análogos dos peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui. Em algumas modalidades, peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui incorporam modificações de alquil glicosídeo como acima definido.

[000601] Outro aspecto refere-se a processos para preparar peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui e sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos, cujos processos compreendem o uso de processos com base em síntese de fase sólida auxiliada por micro-onda ou protocolos de síntese de peptídeo padrão para sequencialmente condensar aminoácidos protegidos em um suporte de resina adequado, removendo os grupos de proteção e suporte de resina, e purificando o produto, para produzir análogos dos peptídeos fisiologicamente ativos, como acima definido.

### **Exemplo 3. Método de oxidação geral para ácidos urônicos**

[000602] A uma solução de 1-dodecil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo (Carbosynth) [2,0 g, 5,74 mmol] em 20 mL de acetonitrila e 20 mL de água DI foi adicionado (diacetoxiiodo)benzeno (Fluka) [4,4 g, 13,7 mmol]

e TEMPO (SigmaAldrich) [0,180g, 1,15 mmol]. A mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente durante 20 horas. A mistura de reação foi diluída com água e liofilizada até a secar para fornecer 1,52 g (produção crua 73,1%) do produto cru, ácido 1-dodecil  $\beta$ -D-glucurônico, como um pó branco, que foi usado diretamente para a síntese de fase sólida sem outra purificação. Este produto foi previamente preparado por um processo alternativo usando NaOCl como oxidante, como descrito no relatório descritivo, e também foi usado para grupos alquila mais longos. De uma maneira similar são preparados ácidos urônicos de alquil sacarídeo desejados usados para preparar os produtos e reagentes descritos aqui.

[000603] De uma maneira semelhante, porém usando os correspondentes 1-tetradecil, 1-hexadecil, e 1-octadecil  $\beta$ -D-glucopiranosídeos (adquiridos de Anatrache, Maumee, OH) foram preparados dos ácidos urônicos de 1-alkil sacarídeo que foram usados para preparar os produtos e reagentes descritos aqui.

**Exemplo 4: Preparação de EU-A387 análogo.**

[000604] Uma amostra de resina de amida Fmoc-His-Aib-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Bip-Ser-Lys-Tyr-Leu-Glu-Ser-Lys(Alloc)-Rink foi preparada por adição sequencial de aminoácidos N-alfa-Fmoc protegidos como descrito no exemplo 1 e desprotegidos na posição Lys-N-épsilon por incubação com  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,5 eq) e DMBA (20 eq) em DMF/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) durante a noite no escuro em temperatura ambiente. Seguindo lavagem por DMF/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a cadeia lateral de Lys foi acilada com ácido 1'-dodecil  $\beta$ -D-glucurônico em DMF/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  através do uso de DIC/HOBt. A conclusão do acoplamento foi checada por ninidrina e o produto foi lavado extensivamente com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

[000605] A resina de produto é submetido à desproteção final e clivagem da resina por tratamento com o coquetel de clivagem (94% de TFA: 2% de EDT; 2% de  $\text{H}_2\text{O}$ ; 2% de TIS) durante um período de 240

minutos em temperatura ambiente. A mistura foi tratada com Et<sub>2</sub>O, para precipitar o produto e lavada extensivamente com Et<sub>2</sub>O para produzir o produto título cru de peptídeo após secagem em vácuo.

[000606] A purificação é realizada em duas bateladas por HPLC de fase reversa (C18). O peptide cru foi carregado em uma coluna de HPLC 4.1x25 cm em uma taxa de fluxo de 15 mL/min (15% de modificador orgânico; tampão de ácido acético) e eluído com um gradiente de 15 a 45% de tampão B em 60 minutos a 50°C. A fração de produto é liofilizada para produzir o peptídeo de produto título com uma pureza de 98,03% por HPLC analítica (18,6 min; 30 a 60% de CH<sub>3</sub>CN em 0,1% de TFA)/espectrometria de massa (pico M+1 = 2382,14).

[000607] Os correspondentes análogos de 1-metila e 1-octila do composto título são preparados de uma maneira similar, porém usando os reagentes ácido 1'-metila β-D-glucurônico e ácido 1'-octil β-D-glucurônico (Carbosynth). Os correspondentes análogos de 1-decila, 1-dodecila, 1-tetradecila, 1-hexadecila, 1-octadecila e 1-eicosila são preparados usando os correspondentes ácidos glucourônicos, preparados como descrito acima. Alternativamente, a 1-alkil glucuronila, ou outros análogos acilados urônicos, podem ser preparados por purificação inicial do peptídeo desprotegido ou parcialmente desprotegido, seguido por acilação pelo desejado reagente de ácido urônico.

[000608] A análise foi feita por HPLC/espectrometria de massa em modo de íon positivo, usando os gradientes eluentes mencionados na tabela abaixo.

<b>Composto Nome</b>	<b>Peso Molecular Esperado</b>	<b>Peso Molecular Encontrado</b>	<b>HPLC (min; eluição)</b>
EU-A387	2379,66	2380,14	18,6[b]
EU-A388	2393,69	2393,74	16,0 [a]
EU-A391	2317,62	2318,26	11,2 [b]

<b>Composto Nome</b>	<b>Peso Molecular Esperado</b>	<b>Peso Molecular Encontrado</b>	<b>HPLC (min; eluição)</b>
EU-A455	2988,36	2988,00	11,5 [b]
EU-A474	2570,86	2570,54	11,3 [b]
EU-A478	2459,75	2459,74	11,1 [b]
EU-A484	2544,86	2545,06	9,6 [b]
EU-A501	2904,2	2903,34	7,9 [b]
EU-A502	2776,07	2776,14	8,0 [b]
EU-A503	2704,98	2704,40	8,0 [b]
EU-A504	2548,80	2548,00	9,1 [b]
EU-A505	2392,61	2392,40	10,5 [b]
EU-A506	2305,53	2305,06	10,7 [b]
EU-A507	3763,23	3762,66	9,0 [b]
EU-A521	2303,56	2303,60	8,2 [c]
EU-A522	2315,60	2315,60	14,2 [d]
EU-A523	2615,94	2616,00	8,1 [b]
EU-A524	2459,75	2459,74	12,7 [d]
EU-A525	2459,75	2459,06	6,0 [c]
EU-A526	2473,75	2473,60	12,7 [d]
EU-A527	2390,64	2390,40	14,6 [d]
EU-A529	2546,83	2546,80	9,5 [b]
EU-A531	2546,83	2546,80	9,5 [b]
EU-A532	2559,00	2558,66	9,6 [b]
EU-A533	2560,96	2560,66	9,5 [b]
EU-A534	2544,99	2544,94	9,7 [b]
EU-A535	2573,05	2574,00	12,0 [b]
EU-A536	2602,96	2603,46	14,3 [b]
EU-A538	2516,99	2516,40	10,3 [b]
EU-A539	2657,20	2656,80	10,8 [b]
EU-A540	2685,20	2684,94	9,8 [c]
EU-A541	2713,20	2712,80	13,0 [c]

<b>Composto Nome</b>	<b>Peso Molecular Esperado</b>	<b>Peso Molecular Encontrado</b>	<b>HPLC (min; eluição)</b>
EU-A544	2631,94	2632,26	10,8 [b]
EU-A546			
EU-A549	2388,67	2388,66	6,3 [e]
EU-A551	2444,67	2445,20	11,4 [e]
EU-A552			
EU-A554	2560,86	2560,40	10,3 [c]
EU-A556	2616,86	2616,40	11,7 [e]
EU-A560	2570,86	2571,06	8,3 [c]
EU-A562	2626,86	2626,66	9,9 [e]
EU-A563			
EU-A565	2542,80	2542,54	9,5 [c]
EU-A567	2598,80	2599,06	12,0 [e]
EU-A568			

Gradientes de HPLC em 0,1% de TFA

[a.] 35 a 65% CH<sub>3</sub>CN durante 30 minutos.

[b.] 30 a 60% CH<sub>3</sub>CN durante 20 minutos.

[c.] 35 a 65% CH<sub>3</sub>CN durante 20 minutos.

[d.] 25 a 55% CH<sub>3</sub>CN durante 20 minutos.

[e.] 40 a 70% CH<sub>3</sub>CN durante 20 minutos.

[000609] HPLC em Phenomenex Luna C18 5 microns 250x4,6 mm.

#### **Exemplo 5: Ensaio Celular dos Compostos.**

[000610] Os compostos foram pesados precisamente em uma quantidade de aproximadamente 1 mg e ensaiados em ensaios celulares padrões (Cerep SA). A leitura é a quantidade de cAMP gerada nas células tratadas com os compostos testes, em modo agonista ou antagonista. O ensaios usado foi a estimulação dos níveis de cAMP N<sup>os</sup> ensaios celulares de glucagon e GLP-1. Os ensaios são descritos em Chicchi, G.G., e outro (1997) J Biol Chem 272: 7765-7769 e Runge, S., e outro (2003) Br J Pharmacol 138: 787-794.



[000611] Para o composto EU-A391 a resposta celular de GLCR não muda e a resposta celular de GLP1R eleva-se abruptamente com EC50 de 420nM

Composto	Estrutura	EC <sub>50</sub> GLP-1 R (nM)	EC <sub>50</sub> glucagon R (nM)
EU-A391	1-dodecila	420	n.c.
EU-A455	1-dodecila	59	770
EU-A474	1-dodecila	3000	n.c.
EU-A478	1-dodecila	n.c.	n.c.
EU-A484	1-dodecila	n.c.	n.c.
EU-A501	1-dodecila	20000	12000
EU-A502	1-dodecila	9400	n.c.
EU-A503	1-dodecila	n.c.	n.c.
EU-A504	1-dodecila	3100	1100
EU-A505	1-dodecila	8500	6100
EU-A506	1-dodecila	4600	1300
EU-A507	1-dodecila	18	1
EU-A521	1-dodecila	n.c.	n.c.
EU-A522	1-dodecila	n.c.	9000
EU-A523	1-dodecila	n.c.	n.c.
EU-A524	1-dodecila	n.c.	n.c.
EU-A525	1-dodecila	n.c.	n.c.
EU-A526	1-dodecila	n.c.	n.c.
EU-A527	1-dodecila	n.c.	5000
EU-A529	1-dodecila	n.c.	7000
EU-A531	1-dodecila	2100	1100
EU-A532	1-dodecila	5000	2600
EU-A533	1-dodecila	770	780
EU-A534	1-dodecila	290	1900
EU-A535	1-tetradecila	§4800	2100
EU-A536	1-hexadecila	>10000	4400
EU-A538	1-dodecila	270	n.c.
EU-A539	1-dodecila	860	2300
EU-A540	1-tetradecila	n.c.	8800
EU-A541	1-hexadecila	800	5000

n.c. significa EC50 não calculável

§ significa superagonista

**Exemplo 6: Ensaio *in vivo* de compostos**

[000612] Sessenta (60) camundongos machos C57BL/6J obesos induzidos pela dieta são recebidos de JAX labs em 14 semanas de idade. Os camundongos são cortados a orelha para identificação e alojados individualmente e em gaiolas de policarbonato positivamente ventiladas com ar filtrado por HEPA em densidade de um camundongo por gaiola. A área do animal é iluminada totalmente com iluminação fluorescente artificial, com um ciclo controlado de 12 horas de luz/escuro. A temperatura normal e faixas de umidade relativa na área do animal são de  $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$  e  $50 \pm 15\%$ , respectivamente. Água da bica filtrada, acidificada para um pH de 2,8 a 3,1, e dieta com alto teor de gordura (60 kcal %) são fornecidas *ad libitum*.

[000613] Seguindo uma aclimação de 2 semanas, 40 camundongos são escolhidos com base na faixa corporal de peso desejada e os camundongos são randomizados em grupos (n=10) como abaixo. Grupo 1. Veículo tratado; Grupo 2. Baixa dose de composto teste de; Grupo 3. Dose média de composto teste; Grupo 4. Alta dose de composto teste. Os camundongos são dosados por meio SC diariamente durante 28 dias. Os pesos corporais e observações laterais da gaiola são registrados diariamente. A ingestão de alimento e água será registrada semanalmente. Os camundongos sofrem medições de NMR para determinar a composição magra e gordura corporal total N<sup>os</sup> dias 1 (pré-dose) e 26. N<sup>os</sup> dias 0, 14 e 27, os camundongos são jejuados durante a noite para um teste de tolerância à glicose oral. No dia seguinte, a primeira amostra de sangue é coletada por meio de corte no rabo (t=0). Os camundongos são em seguida administrados um bolo de 1,0 g/kg de glicose. As amostras de sangue são obtidas por meio de corte no rabo a 5, 30, 60 e 120 minutos após a glicose e glicose plasmática serem imediatamente determinadas usando um glucômetro.

**[000614]** Sacrifício e coleta de tecido: Os camundongos são sacrificados no dia 29. O sangue terminal é processado para soro/plasma e as alíquotas são enviadas para análise de perfil de glicose, insulina e lipídeo. Tecidos gordurosos são coletados, pesados e congelados para análise. O perfil de composto ideal mostra excursão de glicose diminuída no OGTT, secreção de insulina basal diminuída, com secreção de insulina dependente de glicose potenciada, ganho de peso diminuído, massa gordurosa diminuída, porém efeitos mínimos sobre a massa magra.

#### **Exemplo 7: Usos dos compostos**

**[000615]** Os peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados são descritos aqui úteis para a prevenção e tratamento de uma variedade de doenças relacionadas com a obesidade, a síndrome metabólica, doença cardiovascular e diabetes. Peptídeos modificados por tensoativo adequadamente rotulados podem ser usados como sondas diagnósticas.

**[000616]** Regimes de liberação representativos incluem oral, parenteral (incluindo injeção subcutânea, intramuscular e intravenosa), retal, bucal (incluindo sublingual), transdérmica, inalação ocular e intranasal. Um método atrativo e amplamente usado para liberação de peptídeos vincula injeção subcutânea de uma formulação injetável de liberação controlada. Outras rotinas de administração para a aplicação dos peptídeos e/ou proteínas covalentemente modificados descritos aqui são a administração subcutânea, intranasal e inalação.

#### **Exemplo 8. Uso farmacêutico para o tratamento de resistência à insulina.**

**[000617]** Um paciente humano, com evidência de síndrome de insulina ou metabólica é tratado com EU-A596 por administração intranasal (200µL) de um atomizante padrão usado na técnica de uma solução do agente farmacêutico em salina fisiológica contendo de 0,5 a

10 mg/mL do agente farmacêutico e contendo excipientes padrões, tal como álcool benzílico. O tratamento é repetido quando necessário para o alívio de sintomas tais como obesidade, glicose sanguínea elevada e similares. De uma maneira similar, uma solução de EU-A596, e excipientes selecionados, em um solvente de evaporação, contendo tal como a hidrofluoroalcano é administrada intranasalmente por inalador dosificado (MDI) quando necessário para reduzir a resistência à insulina. O efeito de tratamento é determinado usando testes padrões incluindo medição dos níveis de glicose sanguínea, Índice de Massa Corporal, e/ou peso corporal e/ou medição das relações da cintura para o quadril.

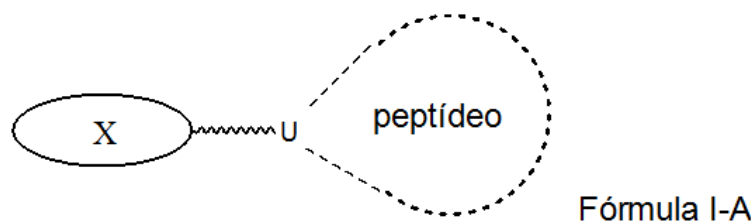
[000618] De uma maneira similar, a administração de uma quantidade ajustada por rotinas transbucal, intravaginal, inalação, subcutânea, intravenosa, intraocular, ou oral é testada para determinar o nível de estimulação de GLP1R e/ou GLCR nas células no corpo e para determinar os efeitos terapêuticos.

## **SEQUÊNCIAS**

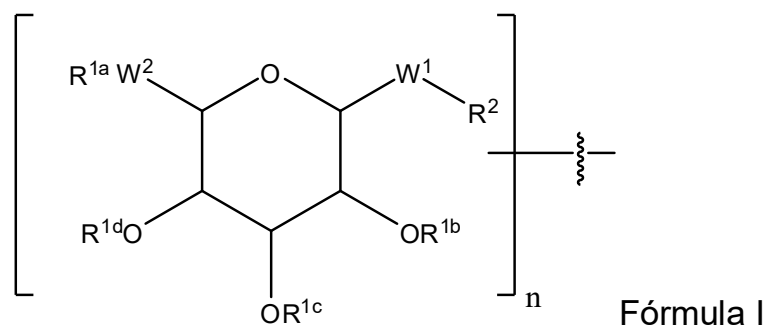
[000619] O relatório descritivo fornece sequências para SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 1-3 e SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 318-343. Adicionalmente, a Tabela 1 de Figura 1 fornece SEQ. ID N<sup>os</sup>. para os compostos EU-A300 a EU-A425 tendo SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 4-129 respectivamente, como mostrado na Tabela 1 de Figura 1. Os compostos na Tabela 1 de Figura 1, e suas respectivas SEQ. ID. N<sup>os</sup>. mostradas na Tabela 1 de Figura 1 são pelo presente incorporados no relatório descritivo como depositado. Adicionalmente, Tabela 2 de Figura 2 fornece SEQ. ID N<sup>os</sup>. para os compostos EU-A426 a EU-599 tendo SEQ. ID. N<sup>os</sup>. 130-317 respectivamente, como mostrado na Tabela 2 de Figura 2. Os compostos na Tabela 2 de Figura 2, e suas respectivas SEQ. ID. N<sup>os</sup>. mostradas na Tabela 2 de Figura 2 são pelo presente incorporados no relatório descritivo como depositado.

## REIVINDICAÇÕES

1. Produto de peptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende um tensoativo X, covalentemente ligado a um peptídeo, o peptídeo compreendendo um aminoácido U ligante e pelo menos outro aminoácido:



em que o tensoativo X é um grupo de Fórmula I:



em que:

$R^{1a}$  é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, um grupo aralquila substituída ou não substituída, ou uma porção contendo núcleo esteroide;

$R^{1b}$ ,  $R^{1c}$ , e  $R^{1d}$  são cada qual, independentemente em cada ocorrência, uma ligação, H, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída;

$W^1$  é independentemente, em cada ocorrência,  $-CH_2-$ ,  $-CH_2-O-$ ,  $-(C=O)-$ ,  $-(C=O)-O-$ ,  $-(C=O)-NH-$ ,  $-(C=S)-$ ,  $-(C=S)-NH-$ , ou  $-CH_2-S-$ ;

$W^2$  é  $-O-$ ,  $-CH_2-$  ou  $-S-$ ;

$R^2$  é independentemente, em cada ocorrência, uma ligação a U, H, um grupo  $C_1$ - $C_{30}$  alquila substituída ou não substituída, um grupo

alcoxiarila substituída ou não substituída, ou um grupo aralquila substituída ou não substituída, -NH<sub>2</sub>, -SH, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-alceno, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-alcino, -NH(C=O)-CH<sub>2</sub>-Br, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> -maleimida, ou -N<sub>3</sub>;

n é 1, 2 ou 3; e

m é 1-10;

em que o peptídeo é selecionado de glucagon, GLP1, ou análogo dos mesmos consistindo na Fórmula III-B:

His<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-aa<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Thr<sub>5</sub>-aa<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Ser<sub>8</sub>-Asp<sub>9</sub>-aa<sub>10</sub>-aa<sub>11</sub>-aa<sub>12</sub>-aa<sub>13</sub>-aa<sub>14</sub>-  
aa<sub>15</sub>-aa<sub>16</sub>-aa<sub>17</sub>-aa<sub>18</sub>-aa<sub>19</sub>-aa<sub>20</sub>-aa<sub>21</sub>-aa<sub>22</sub>-aa<sub>23</sub>-Z Fórmula III-B  
**(SEQ. ID. Nº. 3)**

em que:

Z é OH, ou -NH-R<sup>3</sup>, em que R<sup>3</sup> é H ou substituído ou não substituído C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquila;

aa<sub>2</sub> é Ser, Ala, Gly, Aib, Ac4c, ou Ac5c;

aa<sub>3</sub> é Gln, ou Cit;

aa<sub>6</sub> é Phe, Trp, F2Phe, Me2Phe, MePhe, ou Nal2;

aa<sub>10</sub> é Tyr, Leu, Met, Nal2, Bip, ou Bip2EtMeO;

aa<sub>12</sub> é Lys, Glu, Ser ou U(X);

aa<sub>11</sub> é Ser, Asn, ou U(X);

aa<sub>13</sub> é ausente ou Tyr, Gln, Cit, ou U(X);

aa<sub>14</sub> é ausente ou Leu, Met, Nle, ou U(X);

aa<sub>15</sub> é ausente ou Asp, Glu, ou U(X);

aa<sub>16</sub> é ausente ou Ser, Gly, Glu, Aib, Ac5c, Lys, R, ou U(X);

aa<sub>17</sub> é ausente ou Arg, hArg, Gln, Glu, Cit, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

aa<sub>18</sub> é ausente ou Arg, hArg, Ala, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

aa<sub>19</sub> é ausente ou Ala, Val, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

aa<sub>20</sub> é ausente ou Gln, Lys, Arg, Cit, Glu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

aa<sub>21</sub> é ausente ou Asp, Glu, Leu, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

aa<sub>22</sub> é ausente ou Phe, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X)

aa<sub>23</sub> é ausente ou Val, Ile, Aib, Ac4c, Ac5c, ou U(X);

em que quaisquer dois de aa<sub>1</sub>-aa<sub>23</sub> são opcionalmente ciclizados por meio de suas cadeias laterais para formar uma ligação de lactam; e contanto que um, ou pelo menos um de aa<sub>16</sub>, aa<sub>17</sub>, aa<sub>18</sub>, aa<sub>19</sub>, aa<sub>20</sub>, aa<sub>21</sub>, aa<sub>22</sub>, ou aa<sub>23</sub> é o aminoácido natural ou não natural U covalentemente ligado a X,

e U é um aminoácido natural ou não natural que compreende um grupo funcional usado para ligação covalente ao tensoativo X.

2. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que n é 1.

3. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tensoativo X é um tensoativo da classe de 1-álquil glicosídeo.

4. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que X é compreendido de ácido 1-eicosil beta-D-glucurônico, ácido 1-octadecil beta-D-glucurônico, ácido 1-hexadecil beta-D-glucurônico, ácido 1-tetradecil beta-D-glucurônico, ácido 1-dodecil beta-D-glucurônico, ácido 1-decil beta-D-glucurônico, ácido 1-octil beta-D-glucurônico, ácido 1-eicosil beta-D-diglucurônico, ácido 1-octadecil beta-D-diglucurônico, ácido 1-hexadecil beta-D-diglucurônico, ácido 1-tetradecil beta-D-diglucurônico, ácido 1-dodecil beta-D-diglucurônico, ácido 1-decil beta-D-diglucurônico, ácido 1-octil beta-D-diglucurônico, ou 1-eicosil beta-D-glicose, 1-octadecil beta-D-glicose, 1-hexadecil beta-D-glicose, 1-tetradecil beta-D-glicose, 1-dodecil beta-D-glicose, 1-decil beta-D-glicose, 1-octil beta-D-glicose, 1-eicosil beta-D-maltosídeo, 1-octadecil beta-D-maltosídeo, 1-hexadecil beta-D-maltosídeo, 1-dodecil beta-D-maltosídeo, 1-decil beta-D-maltosídeo, ou 1-octil beta-D-maltosídeo funcionalizada.

5. Produto de peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que U é selecionado de Lys, Cys, Orn, ou um aminoácido não natural que compreende um grupo

funcional usado para ligação covalente ao tensoativo X.

6. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que aa<sub>2</sub> é um resíduo Aib ou Ac4c.

7. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o peptídeo compreende um ou mais resíduos Aib.

8. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que X compreende uma cadeia dodecil alquila.

9. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o peptídeo compreende aa<sub>1</sub>-aa<sub>20</sub> de SEQ ID NO. 3 em que aa<sub>17</sub> é U(X).

10. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que aa<sub>2</sub> é Aib.

11. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que aa<sub>16</sub> e aa<sub>20</sub> são ciclizados para formar uma ligação de lactam.

12. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o tensoativo X é um tensoativo da classe de 1-alkil glicosídeo.

13. Produto de peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R<sup>1a</sup> é um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alquila substituída ou não substituída, ou R<sup>1a</sup> é um grupo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> alquila substituída ou não substituída, ou em que R<sup>1a</sup> é um grupo C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> alquila substituída ou não substituída.

14. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um produto de peptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, ou sal aceitável do mesmo, e pelo menos um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.



15. Uso de um produto de peptídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratamento de uma condição associada com resistência à insulina em um indivíduo em necessidade do mesmo, ou para tratamento de uma doença cardiovascular em um indivíduo em necessidade do mesmo, ou para tratamento de diabetes em um indivíduo em necessidade do mesmo.

Fig 1

Tabela 1

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20
EU-A300	4	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	Lys(C8)-#									
EU-A301	5	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	Lys(C12)-#									
EU-A302	6	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	Lys(C16)-#									
EU-A303	7	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	Lys(C8)-#									
EU-A304	8	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	Lys(C12)-#									
EU-A305	9	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	Lys(C16)-#									
EU-A306	10	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal (2)	Lys(C8)-#									
EU-A307	11	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal (2)	Lys(C12)-#									
EU-A308	12	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal (2)	Lys(C16)-#									
EU-A309	13	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	Lys(C8)-#									
EU-A310	14	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	Lys(C12)-#									
EU-A311	15	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	Lys(C16)-#									
EU-A312	16	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	Lys(C8)-#					
EU-A313	17	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	Lys(C12)-#					
EU-A314	18	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	Lys(C16)-#					
EU-A315	19	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	Lys(C8)-#					
EU-A316	20	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	Lys(C12)-#					
EU-A317	21	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	Lys(C16)-#					
EU-A318	22	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	Lys(C8)-#					
EU-A319	23	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	Lys(C12)-#					
EU-A320	24	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	Lys(C16)-#					
EU-A321	25	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	Lys(C8)-#					
EU-A322	26	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	Lys(C12)-#					
EU-A323	27	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	Lys(C16)-#					
EU-A324	28	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C8)-#		
EU-A325	29	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C8)-#		
EU-A326	30	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C12)-#		
EU-A327	31	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C16)-#		
EU-A328	32	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C8)-#		

**Fig 1 ( Continuação )**  
**Tabela 1 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20
EU-A329	33	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C12)-#		
EU-A330	34	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C16)-#		
EU-A331	35	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C8)-#		
EU-A332	36	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C12)-#		
EU-A333	37	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C16)-#		
EU-A334	38	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C8)-#		
EU-A335	39	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C12)-#		
EU-A336	40	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	D	G	R	Lys(C16)-#		
EU-A337	41	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	Lys(C8)-#									
EU-A338	42	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	Lys(C12)-#									
EU-A339	43	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	Lys(C16)-#									
EU-A340	44	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	Lys(C8)-#									
EU-A341	45	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	Lys(C12)-#									
EU-A342	46	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	Lys(C16)-#									
EU-A343	47	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	Lys(C8)-#									
EU-A344	48	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	Lys(C12)-#									
EU-A345	49	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	Lys(C16)-#									
EU-A346	50	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	Lys(C8)-#									
EU-A347	51	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	Lys(C12)-#									
EU-A348	52	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	Lys(C16)-#									
EU-A349	53	H	Aib	Q	G	T	2,6MeF	T	S	D	Bip	Lys(C8)-#									
EU-A350	54	H	Aib	Q	G	T	2,6MeF	T	S	D	Bip	Lys(C12)-#									
EU-A351	55	H	Aib	Q	G	T	2,6MeF	T	S	D	Bip	Lys(C16)-#									
EU-A352	56	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	L	S	K	Y	L	Lys(C8)-#					
EU-A353	57	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	L	S	K	Y	L	Lys(C12)-#					
EU-A354	58	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	L	S	K	Y	L	Lys(C16)-#					
EU-A355	59	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	Lys(C8)-#					
EU-A356	60	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	Lys(C12)-#					
EU-A357	61	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	Lys(C16)-#					
EU-A358	62	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	Lys(C8)-#					

**Fig 1 ( Continuação )**  
**Tabela 1 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20
EU-A359	63	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	Lys(C12)-#					
EU-A360	64	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	Lys(C16)-#					
EU-A361	65	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	Lys(C8)-#					
EU-A362	66	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	Lys(C12)-#					
EU-A363	67	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	Lys(C16)-#					
EU-A364	68	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	K	Y	L	E	S	Lys(C8)-#			
EU-A365	69	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	E	S	Lys(C8)-#			
EU-A366	70	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	E	S	Lys(C12)-#			
EU-A367	71	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	L	S	K	Y	L	E	S	Lys(C16)-#			
EU-A368	72	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	E	S	Lys(C8)-#			
EU-A369	73	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	E	S	Lys(C12)-#			
EU-A370	74	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	E	S	Lys(C16)-#			
EU-A371	75	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	E	S	Lys(C8)-#			
EU-A372	76	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	E	S	Lys(C12)-#			
EU-A373	77	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	E	S	Lys(C16)-#			
EU-A374	78	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	E	S	Lys(C8)-#			
EU-A375	79	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	E	S	Lys(C12)-#			
EU-A376	80	H	Aib	Q	G	T	2,6FF	T	S	D	Bip2Et4MeO	S	K	Y	L	E	S	Lys(C16)-#			
EU-A377	81	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	S	Lys(C8)-#			
EU-A378	82	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	S	Lys(C12)-#			
EU-A379	83	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	S	Lys(C16)-#			
EU-A380	84	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	R	Lys(C8)-#			
EU-A381	85	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	R	Lys(C12)-#			
EU-A382	86	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	D	R	Lys(C16)-#			
EU-A383	87	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	R	Lys(C8)-#			
EU-A384	88	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	R	Lys(C12)-#			
EU-A385	89	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	R	Lys(C16)-#			
EU-A386	90	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Har	Lys(C12)-#			
EU-A387	91	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	E	S	Lys(C12)-#			
EU-A388	92	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	E	S	Lys(C12)-#			
EU-A389	93	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip	S	Aib	Y	L	E	S	Lys(C12)-#			

**Fig 1 ( Continuação )**  
**Tabela 1 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20
EU-A390	94	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Bip	S	K	Y	L	E	Aib	Lys(C12)-#			
EU-A391	95	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C12)-#			
EU-A392	96	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	L	D	Aib	Lys(C12)-#			
EU-A393	97	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	Lys(C12)-#								
EU-A394	98	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Nal(2)	Aib	Lys(C12)-#								
EU-A395	99	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C12)	Aib-#		
EU-A396	100	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Nal(2)	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C12)	Aib-#		
EU-A397	101	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	L	D	Aib	Lys(C12)-#			
EU-A398	102	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	L	D	Aib	Lys(C12)	Aib-#		
EU-A399	103	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C12)	Aib-#		
EU-A400	104	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	R	Aib	Lys(C12)	Aib-#	
EU-A401	105	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	L	D	R	Aib	Lys(C12)	Aib-#	
EU-A402	106	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	L	D	R	Aib	Lys(C12)	Ac5c-#	
EU-A403	107	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Nal(2)	Aib	K	Y	L	E	R	Aib	Lys(C12)-#		
EU-A404	108	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Har	Aib	Lys(C8)	Aib-#	
EU-A405	109	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Har	Aib	Lys(C12)	Aib-#	
EU-A406	110	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Har	Aib	Lys(C16)	Aib-#	
EU-A407	111	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	Lys(C12)-#						
EU-A408	112	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	Lys(C12)	-NHet					
EU-A409	113	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	Lys(C12)	Aib-#					
EU-A410	114	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	Lys(C12)	Aib	-NHet				
EU-A411	115	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	Aib	K	Y	Lys(C12)	Ac5c-#					
EU-A412	116	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C8)-#			
EU-A413	117	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C16)-#			
EU-A414	118	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C8)-#			
EU-A415	119	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C12)-#			
EU-A416	120	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Lys(C16)-#			
EU-A417	121	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C8)	Aib-#	
EU-A418	122	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C12)	Aib-#	
EU-A419	123	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C16)	Aib-#	
EU-A420	124	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C8)	Ac5c-#	

**Fig 1 ( Continuação )**  
**Tabela 1 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20
EU-A421	125	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C12)	Ac5c-#	
EU-A422	126	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C16)	Ac5c-#	
EU-A423	127	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C8)	Ac5c-#	
EU-A424	128	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C12)	Ac5c-#	
EU-A425	129	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C16)	Ac5c-#	

5/14

MeF significa C-alfaMe-Phe  
Har significa homoArg  
2,6F-F significa 2',6'-difluoro-Phe  
Bip2Et4MeO significa 2'-etil-4'-MeO-bifenilalanina  
Lys(C12) significa N-épsilon-(1'-dodecil beta-D-glucuronil)-L-lisina  
e outros números C significam o correspondente 1'-alquil glucoronídeo  
# significa terminação C de amida.

Fig 2

Tabela 2

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20					25				
EU-A426	130	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C8)	Aib-#									
EU-A427	131	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C12)	Aib-#									
EU-A428	132	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C16)	Aib-#									
EU-A429	133	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C8)	Ac5c-#									
EU-A430	134	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C12)	Ac5c-#									
EU-A431	135	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C16)	Ac5c-#									
EU-A432	136	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C8)	Aib-#									
EU-A433	137	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C12)	Aib-#									
EU-A434	138	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C16)	Aib-#									
EU-A435	139	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C8 )	F	Aib-#						
EU-A436	140	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A437	141	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 6)	F	Aib-#						
EU-A438	142	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C8 )	F	Aib-#						
EU-A439	143	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A440	144	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 6)	F	Aib-#						
EU-A441	145	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C8 )	F	Ac5c-#						
EU-A442	146	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 2)	F	Ac5c-#						
EU-A443	147	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 6)	F	Ac5c-#						
EU-A435	148	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C8 )	F	Aib-#						
EU-A436	149	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A437	150	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 6)	F	Aib-#						
EU-A438	151	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C8)	F	Ac5c-#						

**Fig 2 ( Continuação)**  
**Tabela 2 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20				25					
																					)									
EU-A439	152	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 2)	F	Ac5c-#						
EU-A440	153	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 6)	F	Ac5c-#						
EU-A441	154	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C8 )	F	Ac5c-#						
EU-A442	155	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 2)	F	Ac5c-#						
EU-A443	156	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 6)	F	Ac5c-#						
EU-A444	157	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C8 )	F	Aib-#						
EU-A445	158	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A446	159	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	Q	Lys(C1 6)	F	Aib-#						
EU-A447	160	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C8 )	F	Aib-#						
EU-A448	161	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A449	162	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C1 6)	F	Aib-#						
EU-A450	163	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C8 )	F	Ac5c-#						
EU-A451	164	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C1 2)	F	Ac5c-#						
EU-A452	165	H	Aib	Q	G	T	MeF	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C1 6)	F	Ac5c-#						
EU-A447	166	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C8 )	F	Aib-#						
EU-A448	167	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A449	168	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C1 6)	F	Aib-#						



**Fig 2 ( Continuação )**  
**Tabela 2 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20					25				
EU-A450	169	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C8 )	F	Ac5c-#						
EU-A451	170	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C1 2)	F	Ac5c-#						
EU-A452	171	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	K*	R	Aib	Ala	K*	Lys(C1 6)	F	Ac5c-#						
EU-A453	172	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	A	A	K*	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A454	173	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	A	A	K*	Lys(C1 6)	F	Aib-#						
EU-A455	174	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	A	A	K*	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A456	175	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	A	A	K*	Lys(C1 6)	F	Aib-#						
EU-A457	176	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	A	A	K*	Lys(C1 2)	F	Ac5c-#						
EU-A458	177	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	R	A	A	K*	Lys(C1 6)	F	Ac5c-#						
EU-A459	178	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	A	A	K*	Lys(C1 2)	F	Ac5c-#						
EU-A460	179	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	R	Y	L	D	E*	R	A	A	K*	Lys(C1 2)	F	Aib-#						
EU-A461	180	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C12)	Aib-#										
EU-A462	181	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C12)	Aib-#										
EU-A463	182	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C12)	Ac5c-#										
EU-A464	183	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C8)	Aib-#										
EU-A465	184	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C16)	Aib-#										
EU-A466	185	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C12)	Aib-#										
EU-A467	186	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C8)	Aib-#										
EU-A468	187	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C1)	Aib-#										
EU-A469	188	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C16)	Aib-#										
EU-A470	189	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	Aib	Lys(C16)	Aib-#										
EU-A471	190	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	Aib	Lys(C12)	Aib-#										
EU-A472	191	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	Aib	Lys(C8)	Aib-#										

**Fig 2 ( Continuação)**  
**Tabela 2 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1				5					10					15					20					25				
EU-A473	192	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C16)	Aib-#										
EU-A474	193	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C12)	Aib-#										
EU-A475	194	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C8)	Aib-#										
EU-A476	195	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C12)	Ac5c-#										
EU-A477	196	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	R	Aib	Lys(C8)	#										
EU-A478	197	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	R	Aib	Lys(C12)	#										
EU-A479	198	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	R	Aib	Lys(C16)	#										
EU-A480	199	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C8)	#									
EU-A481	200	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C12)	#									
EU-A482	201	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Aib	Lys(C16)	#									
EU-A483	202	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	R	Aib	Lys(C8)	#									
EU-A484	203	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	R	Aib	Lys(C12)	#									
EU-A485	204	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	R	Aib	Lys(C16)	#									
EU-A486	205	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	R	Aib	Lys(C8)	#										
EU-A487	206	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	R	Aib	Lys(C12)	#										
EU-A488	207	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	R	Aib	Lys(C16)	#										
EU-A489	208	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	Aib	R	Lys(C8)	Lys(C8)	#									
EU-A490	209	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	Aib	R	Lys(C12)	Lys(C12)	#									
EU-A491	210	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	Aib	R	Lys(C16)	Lys(C16)	#									
EU-A492	211	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	hArg	Aib	Lys(C8)	#										
EU-A493	212	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	hArg	Aib	Lys(C12)	#										
EU-A494	213	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	hArg	Aib	Lys(C16)	#										
EU-A495	214	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	hArg	Aib	Lys(C8)	#									
EU-A496	215	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	hArg	Aib	Lys(C12)	#									
EU-A497	216	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	hArg	Aib	Lys(C16)	#									
EU-A498	217	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	hArg	Aib	Lys(C8)	#										
EU-A499	218	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	hArg	Aib	Lys(C12)	#										

**Fig 2 ( Continuação )**  
**Tabela 2 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1				5				10					15					20					25					
EU-A501	219	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	R	A	Q	Lys(C1 2)	Aib	#						
EU-A502	220	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	R	A	Lys(C12)	Aib	#							
EU-A503	221	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	R	Lys(C12)	Aib	#								
EU-A504	222	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C12)	Aib	#									
EU-A505	223	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Lys(C12)	Aib	#										
EU-A506	224	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Lys(C12)	Aib	#											
EU-A507	225	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	A	A	K*	E	F	I	Lys( C12)	W	L	M	N	T#
EU-A509	226	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	R	A	Q	Lys(C1 2)	#							
EU-A510	227	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	R	A	Lys(C12)	#								
EU-A511	228	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	R	Lys(C12)	#									
EU-A512	229	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C12)	#										
EU-A513	230	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Lys(C12)	#											
EU-A514	231	H	S	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Lys(C12)	#												
EU-A515	232	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	Lys(C12)	Aib	#							
EU-A516	233	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	Lys(C12)	Aib	#								
EU-A517	234	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	Lys(C12)	Aib	#									
EU-A518	235	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Lys(C12)	Aib	#										
EU-A519	236	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	Lys(C12)	Aib	#											
EU-A520	237	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	Lys(C12)	Aib	#												
EU-A521	238	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Lys(C12)	Aib	#											
EU-A522	239	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Lys(C12)	Ac4c	#											
EU-A523	240	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Lys(C12)	R	R	Aib	#									
EU-A524	241	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Lys(C12)	Aib	R	#										
EU-A525	242	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Lys(C12)	R	Aib	#										
EU-A526	243	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Lys(C12)	hArg	Aib	#										
EU-A527	244	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Lys(C12)	Aib	#										
EU-A528	245	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Lys(C12)	Ac4c	#										
EU-A529	246	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Lys(C12)	R	Aib	#									
EU-A530	247	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Lys(C12)	hArg	Aib	#									
EU-A531	248	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C12)	Aib	#									
EU-A532	249	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C12)	Ac4c	#									

**Fig 2 ( Continuação )**  
**Tabela 2 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1			5					10					15					20					25				
EU-A533	250	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	hArg	Lys(C12)	Aib	#								
EU-A534	251	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	R	Lys(C12)	Aib	#								
EU-A535	252	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C14)	Aib	#								
EU-A536	253	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C16)	Aib	#								
EU-A537	254	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C18)	Aib	#								
EU-A538	255	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Q	Lys(C12)	Aib	#								
EU-A539	256	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	Lys(C12)	A	K*	#							
EU-A540	257	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	Lys(C14)	A	K*	#							
EU-A541	258	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	Lys(C16)	A	K*	#							
EU-A542	259	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	Lys(C18)	A	K*	#							
EU-A543	260	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q	Lys(C20)	A	K*	#							
EU-A544	261	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C12)	Aib	Aib	#							
EU-A545	262	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C14)	Aib	Aib	#							
EU-A546	263	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C16)	Aib	Aib	#							
EU-A547	264	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C18)	Aib	Aib	#							
EU-A548	265	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R	Lys(C20)	Aib	Aib	#							
EU-A549	267	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Aib	Lys(C12)	#									
EU-A550	268	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Aib	Lys(C14)	#									
EU-A551	269	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Aib	Lys(C16)	#									
EU-A552	270	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Aib	Lys(C18)	#									
EU-A553	271	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	Aib	Aib	Lys(C20)	#									
EU-A554	272	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C12)	Aib	Aib	#							
EU-A555	273	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C14)	Aib	Aib	#							
EU-A556	274	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C16)	Aib	Aib	#							
EU-A557	275	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C18)	Aib	Aib	#							
EU-A558	276	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C20)	Aib	Aib	#							
EU-A559	277	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	Aib	Lys(C22)	Aib	Aib	#							
EU-A560	278	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C12)	Aib	#								
EU-A561	279	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C14)	Aib	#								
EU-A562	280	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C16)	Aib	#								
EU-A563	281	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C18)	Aib	#								
EU-A564	282	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C20)	Aib	#								
EU-A565	283	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	Q	Lys(C12)	Aib	#								
EU-A566	284	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	Q	Lys(C14)	Aib	#								

**Fig 2 ( Continuação)**  
**Tabela 2 ( Continuação )**

	SEQ. ID. NO.	1			5					10				15					20					25				
EU-A567	285	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	Q	Lys(C16)	Aib	#							
EU-A568	286	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	Q	Lys(C18)	Aib	#							
EU-A569	287	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	Q	Lys(C20)	Aib	#							
EU-A570	288	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C12)	Aib	Aib	#						
EU-A571	289	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C14)	Aib	Aib	#						
EU-A572	290	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C16)	Aib	Aib	#						
EU-A573	291	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C18)	Aib	Aib	#						
EU-A574	292	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C20)	Aib	Aib	#						
EU-A575	293	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C12)	Aib	Aib	#						
EU-A576	294	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C14)	Aib	Aib	#						
EU-A577	295	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C16)	Aib	Aib	#						
EU-A578	296	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C18)	Aib	Aib	#						
EU-A579	297	H	Aib	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C20)	Aib	Aib	#						
EU-A580	298	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C12)	Aib	Aib	#						
EU-A581	299	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C14)	Aib	Aib	#						
EU-A582	300	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C16)	Aib	Aib	#						
EU-A583	301	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C18)	Aib	Aib	#						
EU-A584	302	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	R	Lys(C20)	Aib	Aib	#						
EU-A585	303	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	hArg	Lys(C12)	Aib	Aib	#						
EU-A586	304	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	hArg	Lys(C14)	Aib	Aib	#						
EU-A587	305	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	hArg	Lys(C16)	Aib	Aib	#						
EU-A588	306	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	hArg	Lys(C18)	Aib	Aib	#						
EU-A589	307	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	K*	Y	L	D	E*	hArg	Lys(C20)	Aib	Aib	#						
EU-A590	308	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C12)	Aib	Aib	#						
EU-A591	309	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C14)	Aib	Aib	#						
EU-A592	310	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C16)	Aib	Aib	#						
EU-A593	311	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C18)	Aib	Aib	#						
EU-A594	312	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	R	Lys(C20)	Aib	Aib	#						
EU-A595	313	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C12)	Aib	Aib	#						
EU-A596	314	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C14)	Aib	Aib	#						
EU-A597	315	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C16)	Aib	Aib	#						
EU-A598	316	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C18)	Aib	Aib	#						
EU-A599	317	H	Ac4c	Q	G	T	F	T	S	D	Y	S	E*	Y	L	D	K*	hArg	Lys(C20)	Aib	Aib	#						

**Fig 2** ( Continuação)  
Tabela 2 ( Continuação )

MeF significa C-alfaMe-Phe  
Lys(C12) significa N-épsilon-(1'-dodecil beta-D-glucuronil)-L-lisina  
e outros números C significam o correspondente 1'-alquil glucoronídeo  
O par de aminoácidos E+, K+ ou K+, E+ separados por 4 resíduos denota uma ligação  
de lactam de cadeia lateral formada entre  
os grupos funcionais de cadeia lateral nestes aminoácidos.  
# significa terminação C de amida.

Figure 3

