

(11) Número de Publicação: **PT 1695983 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/605 (2007.10) **A61K 38/26** (2007.10)
A61P 3/10 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.06.01	(73) Titular(es): ELI LILLY & COMPANY LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN 46285 US
(30) Prioridade(s): 2000.06.16 US 212171 P 2000.10.13 US 240349 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.08.30	(72) Inventor(es): WOLFGANG GLAESNER US ROHN MILLICAN US
(45) Data e BPI da concessão: 2009.03.19 086/2009	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANÁLOGOS DO PEPTÍDEO-1 DO TIPO GLUCAGON**

(57) Resumo:

RESUMO

"ANÁLOGOS DO PEPTÍDEO-1 DO TIPO GLUCAGON"

Estão descritos compostos do peptídeo-1 do tipo glucagon (GLP-1) com modificações numa ou em mais das seguintes posições: 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 33, 34, 35, 36, ou 37. Estão também descritos métodos de tratamento de um indivíduo com necessidade de estimulação de receptor de GLP-1 utilizando estes compostos de GLP-1.

DESCRIÇÃO

"ANÁLOGOS DO PEPTÍDEO-1 DO TIPO GLUCAGON"

O Peptídeo 1 do Tipo Glucagon (GLP-1) é um peptídeo de 37 aminoácidos que é secretado pelas células L do intestino em resposta à ingestão de comida. Sabe-se que estimula a secreção da insulina (acção insulínica), causando por isso a absorção da glucose pelas células e um decréscimo dos níveis do soro glicosado (ver, por exemplo, Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Research*, 40: 333-343 (1992)). No entanto, o GLP-1 (1-37) é pouco activo e a atenção tem sido focada em análogos truncados, referidos como compostos de GLP. Que são biologicamente muito mais potentes do que o GLP-1. Os exemplos incluem o GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36)NH₂, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH e Ser³⁴-GLP-1(7-37)OH. Devido à sua capacidade de para estimular a secreção de insulina, os compostos de GLP demonstram grandes possibilidades como agentes para o tratamento da diabetes, da obesidade, e de doenças relacionadas.

Os compostos de GLP-1 podem existir em pelo menos duas formas diferentes. A primeira forma é fisiologicamente activa e dissolve-se instantaneamente numa solução aquosa a pH fisiológico (7,4). Em contraste, a segunda forma tem pouca ou nenhuma actividade insulínica e é substancialmente insolúvel em água a pH 7,4. Infelizmente,

a forma inactiva é rapidamente produzida quando são agitadas soluções aquosas de GLP-1, expostas a superfícies hidrofóbicas ou que possuam grandes interfaces ar/água. A tendência para se converter na forma insolúvel complica consideravelmente a produção de quantidades comerciais de compostos de GLP-1 activos; as operações de mistura, ou o movimento contínuo através de uma bomba são operações comuns em processos de fabrico em massa e estas operações causam a agitação, das interfaces ar/água e/ou o contacto com as superfícies hidrofóbicas o que resulta na forma insolúvel. A conversão para a forma inactiva pode também ocorrer durante o armazenamento ou após a administração no paciente, complicando ainda mais a utilização destes compostos como fármacos. Por isso, existe uma grande necessidade de análogos de GLP-1 biologicamente activos que se convertam menos rapidamente na forma insolúvel do que os compostos de GLP-1 presentemente disponíveis.

Foi agora descoberto que um determinado número de análogos de GLP-1 com modificações numa ou mais das seguintes posições: 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36, ou 37, demonstram propensão marcadamente menor para se agregarem quando comparados com o GLP-1(7-37)OH.

Muitos destes análogos retêm o receptor de activação de GLP-1 que é comparável e em alguns casos maior do que os compostos de GLP-1 conhecidos tais como o GLP-1 (7-37)OH e Val⁸-GLP-1 (7-37)OH. Por exemplo, o tempo de agregação do Val⁸-Glu²²-GLP (7-37)OH é mais do que vinte

vezes maior e o seu receptor de activação de GLP-1 é cerca de 25% maior do que o GLP-1 (7-37)OH. Com base nestas descobertas, são aqui descritos novos compostos de GLP-1 e métodos de tratamento utilizando estes novos compostos de GLP-1.

Uma forma de realização da presente invenção é um polipeptídeo contendo a sequência de aminoácidos de fórmula I (SEQ ID NO: 1):

**His - Xaa₈ - Glu - Gli - Xaa₁₁ - Xaa₁₂ - Tre - Ser - Asp -
Xaa₁₆ - Ser - Ser - Tir - Leu - Glu - Glu - Xaa₂₃ - Xaa₂₄ -
Ala - Xaa₂₆ - Xaa₂₇ - Fen - Ile - Ala - Xaa₃₁ - Leu - Xaa₃₃ -
Xaa₃₄ - Xaa₃₅ - Xaa₃₆ - R**

fórmula I (SEQ ID NO: 1)

em que:

Xaa₈ é: Gli, Val;

Xaa₁₁ é: Asp, Glu, Arg, Tre, Ala, Lis, ou His;

Xaa₁₂ é: His, Trp, Fen, ou Tir;

Xaa₁₆ é: Leu, Ser, Tre, Trp, His, Fen, Asp, Val, Glu, ou Ala;

Xaa₂₃ é: His, Asp, Lis, Glu, ou Gln;

Xaa₂₄ é: Glu, His, Ala, ou Lis;

Xaa₂₆ é: Asp, Lis, Glu, ou His;

Xaa₂₇ é: Ala, Glu, His, Fen, Tir, Trp, Arg, ou Lis;

Xaa₃₀ é: Ala, Glu, Asp, Ser, ou His;

Xaa₃₃ é: Asp, Arg, Val, Lis, Ala, Gli, ou Glu;

Xaa₃₄ é: Glu, Lis, ou Asp;

Xaa₃₅ é: Tre, Ser, Lis, Arg, Trp, Tir, Fen, Asp, Gli, Pro, His, ou Glu;

Xaa₃₆ é: Arg, Glu, ou His;

R é: Lis, Arg, Tre, Ser, Glu, Asp, Trp, Tir, Fen, His, -NH₂, Gli, Gli-Pro, ou Gli-Pro-NH₂, ou é delectado.

Outra forma de realização da presente invenção é um polipeptídeo contendo a sequência de aminoácidos de fórmula II (SEQ ID NO: 2):

His - Xaa₈ - Glu - Gli - Tre - Xaa₁₂ - Tre - Ser - Asp - Xaa₁₆ - Ser - Ser - Tir - Leu - Glu - Glu - Xaa₂₃ - Ala - Ala - Xaa₂₆ - Glu - Fen - Ile - Xaa₃₀ - Trp - Leu - Val - Lis - Xaa₃₅ - Arg - R

fórmula II (SEQ ID NO: 2)

em que:

Xaa₈ é: Gli, Val;

Xaa₁₂ é: His, Trp, Fen, ou Tir;

Xaa₁₆ é: Leu, Ser, Tre, Trp, His, Fen, Asp, Val, Glu, ou Ala;

Xaa₂₃ é: His, Asp, Lis, Glu, ou Gln;

Xaa₂₆ é: Asp, Lis, Glu, ou His;

Xaa₃₀ é: Ala, Glu, Asp, Ser, ou His;

Xaa₃₅ é: Tre, Ser, Lis, Arg, Trp, Tir, Fen, Asp, Gli, Pro, His, ou Glu;

R é: Lis, Arg, Tre, Ser, Glu, Asp, Trp, Tir, Fen, His, -NH₂, Gli, Gli-Pro, ou Gli-Pro-NH₂, ou é delectado.

Outra forma de realização da presente invenção é um polipeptídeo contendo a sequência de aminoácidos de fórmula III (SEQ ID NO: 3):

**His - Xaa₈ - Glu - Gli - Tre - Fen - Tre - Ser - Asp - Val
- Ser - Ser - Tir - Leu - Glu - Glu - Xaa₂₃ - Ala - Ala -
Lis - Xaa₂₇ - Fen - Ile - Xaa₃₀ - Trp - Leu - Val - Lis -
Gli - Arg - R**

fórmula III (SEQ ID NO: 3)

em que:

Xaa₈ é: Gli, Val;

Xaa₂₃ é: His, Asp, Lis, Glu, ou Gln;

Xaa₂₇ é: Ala, Glu, His, Fen, Tir, Trp, Arg, ou Lis;

Xaa₃₀ é: Ala, Glu, Asp, Ser, ou His;

R é: Lis, Arg, Tre, Ser, Glu, Asp, Trp, Tir, Fen, His, -NH₂, Gli, Gli-Pro, ou Gli-Pro-NH₂, ou é delectado.

O composto de GLP-1 da presente invenção estimula o receptor de GLP-1 num indivíduo que necessite de estimulação do receptor de GLP-1. O composto de GLP-1 aqui descrito é administrado ao indivíduo numa quantidade efectiva.

Uma outra forma de realização da presente invenção engloba os compostos de GLP-1 aqui descritos para a utilização na estimulação do receptor de GLP-1 num

indivíduo que necessita de estimulação do receptor de GLP-1.

Os compostos de GLP-1 da presente invenção contêm a capacidade de activação do receptor de GLP-1 e que apresentam, adicionalmente, diminuição da propensão para agregar em comparação com outros compostos de GLP-1. Como resultado, as soluções destes compostos podem ser agitadas com conversão mínima à forma inactiva, insolúvel. Esta vantagem simplifica bastante o processo de manufacturação. Adicionalmente, espera-se que pouca ou nenhuma agregação *in vivo* ocorra após a administração nos pacientes, aumentando assim a actividade e minimizando o potencial para reacções adversas. Adicionalmente, estes compostos de GLP-1 são resistentes à degradação pela diaminopeptidase IV e ligam-se ao zinco e crê-se que fornecem assim um maior tempo de acção *in vivo*.

A Figura 1 apresenta as sequências de aminoácidos de Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 5), Val⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 6), Val⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 7) e Val⁸-Lis²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 8).

A Figura 2 apresenta as sequências de aminoácidos de Gli⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 9), Gli⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 10), Gli⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 11) e Gli⁸-Lis²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 12).

A Figura 3 apresenta as sequências de aminoácidos de Val⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 13), Gli⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 14), Val⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 15), e Gli⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 16).

A Figura 4 apresenta as sequências de aminoácidos de Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 17) e Val⁸-Lis²²-Glu²³-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 18).

Um composto de GLP-1 é um polipeptídeo contendo desde cerca de vinte e cinco até cerca de 39 aminoácidos que ocorrem ou não na natureza e que possui suficiente homologia a GLP-1 (7-37)OH tal que exiba actividade insulínica. Exemplos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente incluem aminoácidos α -metil (por exemplo, α -metil alanina), D-aminoácidos, aminoácidos do tipo histidina (por exemplo, 2-amino-histidina, β -hidróxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina e α -metil-histidina), aminoácidos contendo um metileno extra na cadeia lateral ("homo" aminoácidos) e aminoácidos nos quais um grupo funcional de ácido carboxílico na cadeia lateral é substituído por um grupo de ácido sulfónico (por exemplo, ácido cisteico). Preferencialmente, no entanto, os compostos de GLP-1 da presente invenção contêm apenas aminoácidos que ocorrem na natureza excepto indicação em contrário.

Um composto de GLP-1 fornece normalmente um

polipeptídeo contendo a sequência de aminoácidos de GLP-1 (7-37)OH, um análogo de GLP-1 (7-37)OH, um fragmento de GLP-1 (7-37)OH ou um fragmento de um GLP-1 (7-37)OH análogo. O GLP-1 (7-37)OH possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 19:

**⁷His - Ala - Glu - ¹⁰Gli - Tre - Fen - Tre - Ser - ¹⁵Asp -
Val - Ser - Ser - Tir - ²⁰Leu - Glu - Gli - Gln - Ala -
²⁵Ala - Lis - Glu - Fen - Ile - ³⁰Ala - Trp - Leu - Val -
Lis - ³⁵Gli - Arg - ³⁷Gli
(SEQ ID NO: 19)**

Por costume na técnica, a extremidade amino de GLP-1 (7-37)OH foi designada pelo resíduo número 7 e a extremidade carboxílica, número 37. Os outros aminoácidos no polipeptídeo são numerados consecutivamente, como observado na SEQ ID NO: 19. Por exemplo, a posição 12 é a fenilalanina e a posição 22 glicina. Quando não especificado, o C-terminal encontra-se na forma carboxilo tradicional.

Um "fragmento de GLP-1" é um polipeptídeo obtido após a truncagem de um ou mais aminoácidos do N-terminal e/ou do C-terminal de GLP-1 (7-37)OH ou de um análogo de GLP-1 (7-37)OH. A nomenclatura utilizada para descrever o GLP-1 (7-37)OH é aplicável aos fragmentos de GLP-1. Por exemplo, o GLP-1 (9-36)OH denota um fragmento de GLP-1 obtido através da truncagem de dois aminoácidos a partir do N-terminal e um aminoácido a partir do C-terminal. Os

aminoácidos no fragmento são denotados pelo mesmo número tal como o aminoácido correspondente no GLP-1 (7-37)OH. Por exemplo, o *N*-terminal do ácido glutâmico no GLP-1 (9-36)OH encontra-se na posição 9; a posição 12 é ocupada pela fenilalanina; e a posição 22 é ocupada pela glicina, tal como no GLP-1 (7-37)OH.

O "composto de GLP-1" inclui também polipeptídeos nos quais um ou mais aminoácidos foram adicionados ao *N*-terminal e/ou *C*-terminal do GLP-1 (7-37)OH ou fragmentos daí resultantes. Os compostos de GLP-1 deste tipo tenham até cerca de 39 aminoácidos. Os aminoácidos no composto de GLP-1 "ampliado" são denotados pelo mesmo número tal como o aminoácido correspondente no GLP-1 (7-37)OH. Por exemplo, o *N*-terminal do aminoácido de um composto de GLP-1 obtido através da adição de dois aminoácidos ao *N*-terminal de GLP-1 (7-37)OH encontra-se na posição 5; o *C*-terminal do aminoácido de um composto de GLP-1 obtido através da adição de um aminoácido ao *C*-terminal de GLP-1 (7-37)OH encontra-se na posição 38. Assim, a posição 12 é ocupada pela fenilalanina e a posição 22 é ocupada pela glicina em ambos os compostos de GLP-1 "ampliados", tal como no GLP-1 (7-37)OH. Os aminoácidos 1-6 de um composto de GLP-1 ampliado são preferencialmente os mesmos ou uma substituição conservativa do aminoácido na posição correspondente de GLP-1 (7-37)OH. Os aminoácidos 38-45 de um composto de GLP-1 ampliado são preferencialmente os mesmos ou uma substituição conservativa dos aminoácidos na posição correspondente de glucagom ou da Exenatida-4.

Um "análogo de GLP-1" possui a homologia suficiente ao GLP-1 (7-37)OH ou a um fragmento do GLP-1 (7-37)OH tal que o análogo possua actividade insulínica. Preferencialmente, um análogo de GLP-1 possui a sequência de aminoácidos de GLP-1 (7-37)OH ou de um fragmento daí resultante, modificado tal que desde um, dois, três, quatro ou cinco aminoácidos difiram dos aminoácidos na posição correspondente do GLP-1 (7-37)OH ou o fragmento de GLP-1 (7-37)OH. Na nomenclatura aqui utilizada para designar compostos de GLP-1, o aminoácido de substituição e a sua posição são indicados antes da estrutura original. Por exemplo, o Glu²²-GLP-1 (7-37)OH designa um composto de GLP-1 no qual a glicina normalmente encontrada na posição 22 de GLP-1 (7-37)OH foi substituída pelo ácido glutâmico; Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH designa um composto de GLP-1 no qual a alanina normalmente encontrada na posição 8 e a glicina normalmente encontrada na posição 22 de GLP-1 (7-37)OH foram substituídas pela valina e pelo ácido glutâmico, respectivamente.

O N-terminal de um composto de GLP-1 não é normalmente substituído mas pode também ser alquilado ou acilado (preferencialmente C1-C20). O C-terminal pode não ser substituído, como no caso do GLP-1 (7-37)OH, amidado com -NH₂, -NHR ou NRR' ou esterificado com -OR". R e R' são grupos alquilo ou acilo independentes (preferencialmente C1-C20), R" é um alquilo (C1-C20). O GLP-1 (7-36)NH₂ é um exemplo de um "composto GLP amidado". Preferencialmente, os

compostos de GLP-1 da presente invenção possuem um C-terminal que é substituído ou não com $-NH_2$.

É preferível que os compostos de GLP-1 da presente invenção possuam 6 ou menos alterações em comparação com os aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH nativo. Os análogos mais preferenciais possuem 5 ou menos alterações em comparação com os aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH nativo ou possuem 4 ou menos alterações em comparação com os aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH nativo. É ainda preferível que estes análogos possuam 3 ou menos alterações em comparação com os aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH nativo. É o mais preferencial que estes análogos possuam 2 ou menos alterações em comparação com os aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH nativo.

Foi descoberto que estas substituições reduzem a propensão dos compostos de GLP-1 para se agregarem e criam a fórmula insolúvel. Os compostos de GLP-1 da presente invenção agregam-se geralmente pelo menos cerca de 5 vezes menos rapidamente do que o GLP-1 (7-37)OH quando avaliados, por exemplo, pelo ensaio de agregação descrito no Exemplo 3, preferencialmente pelo menos 20 vezes menos rapidamente, mais preferencialmente pelo menos 40 vezes menos rapidamente, mais preferencialmente pelo menos cerca de 50 vezes menos rapidamente, ainda mais preferencialmente cerca de 60 vezes menos rapidamente, e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 65 vezes menos rapidamente. Preferen-

cialmente, os compostos de GLP-1 aqui descritos são análogos de GLP-1 (7-36)NH₂ ou de GLP-1 (7-37)OH.

Preferencialmente, os compostos de GLP-1 da presente invenção possuem zero, um, dois ou três aminoácidos adicionalmente aos aminoácidos nas posições 8 e 22 que diferem do aminoácido na posição correspondente de GLP-1 (7-37)OH ou de um fragmento de GLP-1 (7-37)OH. Num exemplo, um ou mais dos aminoácidos nas posições 7, 21 e 27 do composto de GLP-1 diferem do aminoácido correspondente em GLP-1 (7-37)OH ou de um fragmento de GLP-1 (7-37)OH, adicionalmente aos aminoácidos nas posições 8 e 22.

Preferencialmente, apenas as posições 7, 8 e 22 diferem do aminoácido na posição correspondente de GLP-1 (7-37)OH (ou um fragmento daí resultante). É esperado que outros compostos de GLP-1 melhorados com propriedades de agregação reduzidas possam ser obtidos a partir compostos de GLP-1 biologicamente activos, conhecidos através da substituição da glicina na posição 22 e preferencialmente a alanina na posição 8 destes compostos com um aminoácidos adequado, como descrito aqui. Compostos conhecidos de GLP-1 biologicamente activos estão descritos na Patente dos E.U.A. No 5,977,071 para Hofmann, et al., Patente dos E.U.A. No 5,545,618 para Buckley, et al., Adelhorst, et al., J. Biol. Chem. 269: 6275 (1994).

Uma "substituição conservativa" é a substituição de um aminoácidos por outro aminoácidos que possui a mesma

rede de carga electrónica e aproximadamente o mesmo tamanho e forma. Os aminoácidos com cadeias laterais de aminoácidos alifáticos ou alifáticos substituídos possuem aproximadamente o mesmo tamanho quando o número total de carbonos e de heteroátomos nas suas cadeias laterais difere não mais do que cerca de quatro. Eles possuem aproximadamente a mesma forma quando o número de ramificações nas suas cadeias laterais difere não mais do que uma. Os aminoácidos com grupos fenilo ou fenilo substituídos nas suas cadeias laterais são tidas em conta por possuírem aproximadamente o mesmo tamanho e forma. Estão listados em baixo cinco grupos de aminoácidos. A substituição de um aminoácido num composto de GLP-1 por outro aminoácido a partir dos mesmos grupos resulta uma substituição conservativa:

Grupo I: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, e aminoácidos que não ocorrem naturalmente com C1-C9 alifático ou C1-C4 hidroxilo substituído por cadeias laterais alifáticas (directamente encadeadas ou mono-ramificadas).

Grupo II: ácido glutâmico, ácido aspártico e aminoácidos que não ocorrem naturalmente com o ácido carboxílico substituído por cadeias laterais alifáticas C1-C4 (não ramificadas ou com um ponto de ramificação).

Grupo III: lisina, ornitina, arginina, e aminoácidos que não ocorrem naturalmente com a amina ou o guanidino substituído por cadeias laterais alifáticas C1-C4 (não ramificadas ou com um ponto de ramificação).

Grupo IV: glutamina, asparagina, e aminoácidos que não ocorrem naturalmente com a amina substituída por cadeias laterais alifáticas C1-C4 (não ramificadas ou com um ponto de ramificação).

Grupo V: fenilalanina, fenilglicina, tirosina e triptofano.

Excepto indicação em contrário especificamente aqui fornecida, as substituições conservativas são preferencialmente efectuadas com aminoácidos que ocorrem naturalmente.

Como utilizado aqui o termo "composto GLP-1" inclui também sais farmacêuticamente aceitáveis dos compostos aqui descritos. Um composto GLP-1 desta invenção pode possuir um grupo funcional suficientemente ácido, um suficientemente básico, ou ambos, e reage de acordo com qualquer uma de um número de bases inorgânicas, e de ácidos inorgânicos e orgânicos para formar um sal. Os ácidos empregues normalmente para formar sais de adição ácida são ácidos inorgânicos tais como o ácido hidrocloreídrico, ácido hidrobromico, ácido hidroiódico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, e outros, e ácidos orgânicos tais como o ácido p-toluenossulfónico, ácido metanossulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzóico, ácido acético, e outros. Exemplos de tais sais incluem o sulfato, piros-

sulfato, bissulfato, sulfito, bissulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, di-hidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloreto, brometo, iodeto, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenossulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gama-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanossulfonato, propanossulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato, e outros.

Sais de adição básica incluem aqueles que derivam de bases inorgânicas, tais como o amónio ou alcalinos ou hidróxidos de metais alcalino-terrosos, carbonatos, bicarbonatos, e outros. Estas bases úteis na preparação dos sais desta invenção incluem assim hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amónio, carbonato de potássio, e outros.

Os compostos de GLP-1 podem ser utilizados para tratar indivíduos com uma grande variedade de doenças e perturbações. Acredita-se que os compostos de GLP-1, incluindo os da presente invenção, exercem os seus efeitos biológicos através da actuação num receptor referido como o "receptor de GLP-1" (ver Patente dos E.U.A. No. 5,670,360 para Thorrens). Indivíduos com doenças e/ou perturbações

que respondem favoravelmente à estimulação do receptor de GLP-1 ou à administração de compostos de GLP-1 podem desta forma ser tratados com os compostos de GLP-1 da presente invenção. Estes indivíduos são designados como "com necessidade de tratamento com compostos de GLP-1" ou como "com necessidade de estimulação do receptor de GLP-1". Estão incluídos indivíduos com diabetes não dependentes de insulina, com diabetes dependentes de insulina, derrame cerebral (ver WO 00/16797 por Efendic), enfarte do miocárdio (ver WO 98/08531 por Efendic), obesidade (ver WO 98/19698 por Efendic), alterações catabólicas pós-cirurgia (ver Patente dos E.U.A. No. 6,006,753 por Efendic), dispepsia funcional e síndrome do intestino irritável (ver WO 99/64060 por Efendic). Estão também incluídos indivíduos que necessitam de tratamento profilático com um composto de GLP-1, por exemplo, indivíduos em risco de desenvolver diabetes não dependentes de insulina (ver WO 00/07617). Os indivíduos com diminuição da tolerância à glucose ou diminuição da glicémia em jejum, indivíduos cujo peso corporal é de cerca de 25% acima do peso corporal normal para a altura e constituição física do indivíduo, indivíduos com uma pancreatectomia parcial, indivíduos com um ou ambos os pais com diabetes não dependentes de insulina, indivíduos que apresentaram diabetes gestacionais e indivíduos que tiveram pancreatite aguda ou crónica estão em risco de desenvolver diabetes não dependente de insulina.

Uma "quantidade efectiva" de um composto de GLP-1

é a quantidade que resulta num efeito terapêutico e/ou profilático desejado sem causar efeitos secundários inaceitáveis quando administrado a um indivíduo com necessidade de estimulação do receptor de GLP-1. Um "efeito terapêutico desejado" inclui um ou mais dos seguintes: 1) uma melhoria do(s) sintoma(s) associado(s) à doença ou perturbação; 2) um atraso no início dos sintomas associados com a doença ou perturbação; 3) longevidade aumentada comparada com a ausência de tratamento; e 4) maior qualidade de vida comparada com a ausência de tratamento. Por exemplo, uma "quantidade efectiva" de um composto de GLP-1 para o tratamento da diabetes é a quantidade que irá resultar num maior controlo da concentração da glucose no sangue do que na ausência de tratamento, resultando assim num atraso no início de complicações diabéticas tais como a retinopatia, neuropatia ou doença renal. Uma "quantidade efectiva" de um composto de GLP-1 para a prevenção da diabetes é a quantidade que poderá atrasar, comparada com a ausência de tratamento, o início de níveis elevados de glucose no sangue que requer o tratamento com fármacos anti-hipoglicémicos tais como sulfonilureias, tiazolidinedionas, insulina e/ou bisguanidinas.

Uma "quantidade efectiva" do composto de GLP-1 administrada a um indivíduo irá depender também do tipo e severidade da doença e das características do indivíduo, tais como o estado de saúde, idade, sexo, massa corporal e tolerância a fármacos. O perito será capaz de determinar doses apropriadas dependendo destes e de outros factores.

Normalmente, uma quantidade terapeuticamente efectiva do composto GLP-1 pode variar desde cerca de 0,01 mg por dia até cerca de 1000 mg por dia para um adulto. Preferencialmente, a dosagem varia desde cerca de 0,1 mg por dia até cerca de 100 mg por dia, mais preferencialmente desde cerca de 1,0 mg/dia até cerca de 10 mg/dia.

Os compostos de GLP-1 da presente invenção podem, por exemplo, ser administrados oralmente, por administração nasal, inalação ou parenteralmente. A administração parenteral pode incluir, por exemplo, administração sistémica, tal como por injeção intramuscular, intravenosa, subcutânea, ou intraperitoneal. Os compostos de GLP-1 podem ser administrados ao indivíduo em conjunção com um veículo farmacologicamente aceitável, diluente ou excipiente, como parte de uma composição farmacêutica para tratamento das doenças acima apresentadas. A composição farmacêutica pode ser uma solução ou, ser administrada parenteralmente, uma suspensão do composto de GLP-1 ou uma suspensão do composto de GLP-1 complexada com um catião metálico divalente, como descrito abaixo. Veículos farmacologicamente aceitáveis podem conter ingredientes inertes que não interagem com o peptídeo ou com derivados de peptídeos. Podem ser empregues técnicas de formulação farmacêutica padrão tais como as descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Veículos farmacologicamente aceitáveis para a administração parenteral incluem, por exemplo, água estéril, salino fisiológico, salino bacteriostático (salino contendo álcool benzílico a cerca

de 0,9% mg/ml), salino tamponado com fosfato, solução de Hank, lactase de Ringer e outros. Alguns exemplos de excipientes adequados incluem a lactose, a dextrose, a sacarose, a trealose, o sorbitol, e o manitol.

Um "indivíduo" é um mamífero, preferencialmente um humano, mas pode também ser um animal, por exemplo, animais de companhia (por exemplo, cães, gatos, e outros), animais de quinta (por exemplo, vacas, ovelhas, porcos, cavalos, e outros), e animais de laboratório (por exemplo, ratazanas, ratos, porcos da guiné, e outros).

Os compostos de GLP-1 da presente invenção podem ser complexados com um catião metálico divalente adequado. Os complexos de metal divalente de compostos de GLP-1 são geralmente insolúveis em solução aquosa perto do pH fisiológico. Assim, estes complexos podem ser administrados subcutaneamente como suspensões e apresentam um decréscimo da taxa de libertação *in vivo*, estendendo assim o tempo de acção do composto. Exemplos de catiões metálicos divalentes adequados incluem Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} , e outros. O Zn^{++} é o preferido.

Para obter os complexos entre os compostos de GLP-1 da presente invenção e um catião metálico divalente, um GLP-1 é dissolvido num tampão adequado e na presença de um sal metálico. É permitido que a mistura incube à temperatura ambiente para permitir que o complexo se precipite. Tampões adequados são aqueles que mantêm a

mistura numa escala de pH de cerca de 3,0 a cerca de 9,0 e não interferem com a reacção de complexação. Os exemplos incluem tampões de fosfato, tampões de acetado, tampões de citrato e tampões de Goode, por exemplo, HEPES, Tris e Tris-acetato. Sais metálicos adequados são aqueles em que o metal está disponível para complexação. Exemplos de sais de zinco adequados incluem cloreto de zinco, acetato de zinco, óxido de zinco, e sulfato de zinco. Preferencialmente, um sal metálico catiónico divalente tal como o cloreto de zinco é fornecido em excesso para produzir uma taxa molar até cerca de 50 moléculas de um catião metálico divalente para cada molécula do composto de GLP-1.

"Actividade insulínótropica" refere-se à estimulação da secreção da insulina em resposta a níveis elevados de glucose, causando assim a absorção da glucose pelas células e o decréscimo dos níveis do soro glicosado. A actividade insulínótropica pode ser conseguida por métodos conhecidos na área, incluindo a utilização de experiências *in vivo* e ensaios *in vitro* que medem a actividade de ligação ao receptor de GLP-1 ou a activação do receptor, por exemplo, ensaios que empregam células dos ilhéus pancreáticos ou células de insulinoma, como descrito em EP 619,322 para Gelfand et al., e Patente dos E.U.A. No. 5,120,712, respectivamente.

Os compostos de GLP-1 da presente invenção podem ser preparados utilizando métodos padrão de técnicas de síntese de peptídeos de fase sólida. Os sintetizadores de

peptídeo estão comercialmente disponíveis em, por exemplo, Applied Biosystems em Foster City CA. Os reagentes para a síntese de fase sólida estão disponíveis comercialmente, por exemplo, em Midwest Biotech (Fishers, IN). Os sintetizadores de peptídeos de fase sólida podem ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante para bloquear grupos de interferência, protegendo os aminoácidos de reacções, acoplações, desacoplamento, e capeamento de aminoácidos não reactivos.

Normalmente, um aminoácido α -N-carbamoil protegido e o aminoácido N-terminal da cadeia de peptídeos extensível numa resina são acoplados à temperatura ambiente num solvente inerte tal como a dimetilformamida, a N-metilpirrolidona ou o cloreto de metileno na presença de agentes de acoplação tais como o diciclo-hexilcarbodiimida e o 1-hidroxibenzotriazole e uma base tal como a diisopropiletilamina. O grupo de protecção da α -N-carbamoil é removido da resina de peptídeo resultante utilizando um reagente tal como o ácido trifluoroacético ou a piperidina, e a reacção de acoplamento é repetida com o próximo aminoácido N-protegido desejado para ser adicionado à cadeia de peptídeos. Grupos adequados que protegem grupos amins são bem conhecidos na área e são descritos, por exemplo, em Green e Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley e Sons, 1991. Exemplos incluem t-butiloxicarbonilo (tBoc) e fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

Os peptídeos são também sintetizados utilizando

protocolos padrão de síntese de fase sólida automatizada utilizando t-butoxicarbonil- ou fluorenilmetoxycarbonil-alfa-aminoácidos com protecção de cadeia lateral apropriada. Após a conclusão da síntese os peptídeos são clivados a partir do suporte de fase sólida com desprotecções de cadeia lateral simultâneas utilizando métodos padrão de fluoreto de hidrogénio. Os peptídeos em bruto são então novamente purificados utilizando cromatografia de fase reversa em colunas Vydac C18 utilizando gradientes de acetonitrilo em ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1%. Para remover o acetonitrilo, os polipeptídeos são liofilizados a partir de uma solução contendo TFA a 0,1%, acetonitrilo e água. A pureza pode ser verificada por cromatografia analítica de fase reversa. A identidade dos polipeptídeos pode ser verificada por espectrometria de massa. Os peptídeos podem ser solubilizados em tampões aquosos a pH neutro.

A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos que não pretendem ser limitantes em qualquer modo.

Exemplo 1 - Preparação dos Compostos de GLP-1 da Presente Invenção por Química t-Boc de Fase sólida

Foram colocadas aproximadamente 0,5-0,6 gramas (0,38-0,45 mmole) de resina Gly-PAM Boc num reactor padrão de 60 ml e o duplo acoplamento foi realizado num sintetizador de peptídeos ABI430A da Applied Biosystems. Os seguintes aminoácidos protegidos pela cadeia lateral (2 mmole de cartuxos de aminoácidos Boc) foram obtidos a

partir da Midwest Biotech (Fishers, IN) e utilizados na síntese:

Arg-Tosilo (TOS), éster Aps- δ -ciclo-hexilo (CHXL), éster Glu- δ -ciclo-hexilo (CHXL), His-benziloximetilo (BOM), Lys-2-clorobenziloxicarbonilo (2Cl-Z), Met-sulfóxido (O), éter Ser-O-benzilo (OBzl), éter Thr-O-benzilo (OBzl), Trp-formilo (CHO) e Tyr-2-bromobenziloxicarbonilo (2Br-z) e resina Gly-PAM Boc. O ácido trifluoroacético (TFA), a diisopropiletilamina (DIEA), hidroxibenzotriazole (HOBt) a 0,5 M em DMF e diciclohexilcarbodiimida (DCC) a 0,5 M em diclorometano foram adquiridos a partir da PE-Applied Biosystems (Foster City, CA). A dimetilformamida (DMF-Burdick and Jackson) e o diclorometano (DCM-Mallinkrodt) foram adquiridos à Mays Chemical Co. (Indianapolis, IN).

Os acoplamentos duplos padrão foram realizados utilizando quer ésteres HOBt ou anidridos simétricos, ambos formados utilizando DCC. Um segundo conjunto de acoplamentos duplos (sem desprotecção de TFA) foi realizado em Trp31, Thr13 e Thr11. No término das sínteses, o grupo Boc N-terminal foi removido e as peptidil-resinas tratadas com piperidina a 20% em DMF para deformilar a cadeia lateral do Trp. Após a lavagem com DCM, as resinas foram transferidas para um reactor de TEFLON e secas *in vacuo*.

Para análogos contendo Met, foi efectuada uma redução na resina utilizando TFA/dimetilsulfeto (DMS) a

10%/HCl concentrado a 2%. As clivagens foram efectuadas acoplando os reactores a um dispositivo com HF (ácido hidrofúrico) (Penninsula Laboratories). Foi adicionado 1 ml de m-cresol por grama/resina e 10 ml de HF (adquiridos a AGA, Indianapolis, IN) foram condensados no recipiente pré-arrefecido. Foi adicionado 1 ml de DMS por grama de resina quando a metionina estava presente. As reacções foram agitadas durante uma hora numa banho de gelo e o HF foi removido *in vacuo*. Os resíduos foram ressuspensos em éter etílico e os sólidos foram filtrados e lavados com éter. Cada peptídeo foi extraído em ácido acético aquoso e quer liofilizado ou carregado directamente numa coluna de fase reversa.

As purificações foram realizadas numa coluna VYDAC C18 2,2 x 25 cm em tampão A (ácido trifluoroacético a 0,1% em água, B: TFA a 0,1% em acetonitrilo). Um gradiente de 20% a 90% de B foi realizado numa HPLC (Waters) durante 120 minutos a 10 ml/minuto enquanto se monitorizava o UV a 280 nm (4,0 A) e colectando fracções de um minuto. As fracções apropriadas foram combinadas, congeladas e liofilizadas. Os produtos secos foram analisados por HPLC (0,46 x 15 cm METASIL AQ C18) e por espectrometria de massa MALDI.

Exemplo 2 - Preparação dos Compostos de GLP-1 da Presente Invenção por Química F-Moc de Fase sólida

Aproximadamente 114 mg (50 mMole) de resina FMOC

Gly WANG (adquirida à NovaBiochem, LaJolla, CA) foram colocados em cada poço programado do bloco de reacção de 96 poços e os acoplamentos duplos foram realizados num sintetizador de peptídeo Advanced ChemTech 396. Os análogos com uma amida C-terminal foram preparados utilizando 75 mg (50 μ mole) de resina Rink Amide AM (NovaBiochem, LaJolla, CA).

Os seguintes aminoácidos FMOC foram adquiridos à Advanced ChemTech (Louisville, KY), NovaBiochem (LaJolla, CA), e Midwest Biotech (Fishers, IN): Arg-2,2,4,6,7-pentametildi-hidrobenzofurano-5-sufonil (Pbf), Asn-tritilo (Trt), éster Asp- β -t-butilo (tBu), éster Glu- δ -t-butilo (tBu), Gln-tritilo (Trt), His-tritilo (Trt), Lys-t-butiloxicarbonilo (Boc), éter Ser-t-butilo (OtBu), éter Thr-t-butilo (OtBu), Trp-t-butiloxicarbonilo (Boc), éter Tyr-t-butilo (OtBu).

Os solventes dimetilformamida (DMF-Burdick and Jackson), N-metilpirrolidona (NMP-Burdick and Jackson), diclorometano (DCM-Mallinkrodt) foram adquiridos à Mays Chemical Co. (Indianapolis, IN).

O hidroxibenzotriazole (HOBt), a diisopropilcarbodiimida (DIC), a diisopropiletilamina (DIEA), e a piperidina (Pip) foram adquiridos à Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Todos os aminoácidos foram dissolvidos em HOBt a

0,45 M em NMP e foram realizados acoplamentos activados de DIC/HOBt durante 50 minutos após 20 minutos de desprotecção utilizando Pip/DMF a 20%. Cada resina foi lavada com DMF após as desprotecções e os acoplamentos. Após o último acoplamento e desprotecção, as peptidil-resinas foram lavadas com DCM e secas *in vacuo* no bloco de reacção.

Com o bloco de reacção/clivagem reunido no local, foram adicionados 2 ml de Reagente K a cada poço e a reacção de clivagem foi agitada durante 2 horas [Reagente K = fenol a 0,75 mg, tioanisole a 0,5 ml, etanoditiol a 0,25 ml, água a 0,5 ml por 10 ml de ácido trifluoroacético (TFA), tudo adquirido à Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI]. Os filtrados de TFA foram adicionados a 40 ml de éter etílico e os precipitados foram centrifugados durante 2 minutos a 2000 rpm. Os sobrenadantes foram decantados, os pellets foram ressuspensos em 40 ml de éter, re-centrifugados, re-decantados, secos em azoto e seguidamente *in vacuo*.

Foi dissolvido 0,3-0,6 mg de cada produto em 1 ml de TFA/acetonitrilo (ACN) a 0,1% e foram analisados 20 µl em HPLC [0,46 x 15 cm METASIL AQ C18, 1 ml/min, a 45 °C, 214 nM (0,2A), A = TFA a 0,1%, B = TFA a 0,1%/ACN a 50%. Gradiente = 50% de B a 90% de B durante 30 minutos].

As purificações foram realizadas numa coluna VYDAC C18 2,2 x 25 cm em tampão A (ácido trifluoroacético a

0,1% em água, B: TFA a 0,1% em acetonitrilo). Um gradiente de 20% a 90% de B foi realizado numa HPLC (Waters) durante 120 minutos a 10 ml/minuto enquanto se monitorizava o UV a 280 nm (4,0 A) e colectando fracções de 1 minuto. As fracções apropriadas foram combinadas, congeladas e liofilizadas. Os produtos secos foram analisados por HPLC (0,46 x 15 cm METASIL AQ C18) e por espectrometria de massa MALDI.

Exemplo 3 - Ensaio de Agregação de GLP:

Os peptídeos GLP desta invenção foram analisados no que respeita ao seu potencial para se agregarem em solução. De um modo geral, os peptídeos em solução foram agitados a temperatura elevada num tampão adequado enquanto que se registava a turbidez a 350 nm como uma função do tempo. O tempo para o início da agregação foi medido para quantificar o potencial de uma dada molécula de GLP para se agregar sob estas condições de stresse.

Protocolo:

Um composto de GLP-1 foi primeiramente dissolvido sob condições alcalinas (pH 10,5) durante 30 minutos para dissolver qualquer material pré-agregado. A solução foi então ajustada a pH 7,4 e filtrada. Especificamente, 4 mg de um composto de GLP-1 liofilizado foi dissolvido em 3 ml de fosfato a 10 mM/citrato a 10 mM. O pH foi ajustado entre

10,0-10,5 e mantido durante 30 minutos. A solução foi ajustada com HCl para pH 7,4 e filtrada através de um filtro adequado, por exemplo, um filtro de seringa Millex GV (Millipore Corporation, Bedford, MA). Esta solução foi então diluída para uma amostra final contendo proteína a 0,3 mg/ml em citrato a 10 mM, fosfato a 10 mM, NaCl a 150 mM, e ajustado para pH 7,4 a 7,5. A amostra foi incubada a 37 °C numa cuvete de quartzo. A turbidez da solução foi medida de cinco em cinco minutos a 350 nm num espectrofotómetro de UV-VIS AVIV Modelo 14DS (Lakewood, NJ). Durante 30 segundos antes e durante a medição a solução foi agitada utilizando uma barra de agitação magnética da Starna Cells, Inc. (Atascadero, CA). Um aumento na DO a 350 nm indica a agregação do peptídeo GLP. O tempo para a agregação foi aproximado pela intercepção de preparados lineares para o pré-crescimento e fase de crescimento de acordo com o método de Drake (Arvin T, Cudd A, e Drake AF. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6415-6422).

A cuvete foi limpa entre as experiências com uma solução de sabão cáustico (por exemplo, Contrad-70).

Os resultados para os compostos de GLP-1 da presente invenção são reportados na Tabela 1 como o tempo em horas requerido para o composto se agregar. Como pode ser observado, os compostos da presente invenção apresentam grande aumento dos tempos de agregação sobre os compostos de GLP-1 conhecidos em técnicas anteriores.

Exemplo 4 - Activação do Receptor de GLP-1 com os Compostos de GLP-1 da Presente Invenção

A capacidade dos compostos de GLP-1 da presente invenção para activarem o receptor de GLP-1 foi conseguida utilizando ensaios *in vitro* tais como os descritos em EP 619,322 para Gelfand, *et al.*, e na Patente dos E.U.A. No. 5,120,712, respectivamente. Todos os ensinamentos destas referências estão aqui incorporados como referência. A actividade destes compostos relativamente à actividade de GLP-1 (7-37)OH está apresentada na Tabela 1. Como se pode observar através destes resultados, a actividade dos compostos de GLP-1 da presente invenção são normalmente tão bons ou melhores do que os de GLP-1 (7-37)OH.

Tabela 1

Tempo do Composto de GLP-1	Agregação em Horas	Activação do Receptor de GLP-1
GLP-1 (7-37)OH*	1	1,0
Val ⁸ -GLP-1 (7-37)OH*	0,9 ± 0,2 (n = 6)	0,47
Gli ⁸ -His ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH*	9+	0,282
Val ⁸ -Ala ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH*	10	0,021
Val ⁸ -Lis ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH*	13	0,001
Val ⁸ -Tir ¹² -GLP-1 (7-37)OH*	6	0,81
Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1 (7-37)OH*	12	0,047
Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1 (7-37)OH*	16	0,112
Val-Tir ¹⁶ -GLP-1 (7-37)OH*	5	1,175
Val ⁸ -Lis ²⁰ -GLP-1 (7-37)OH*	5	0,33
Gln ²² -GLP-1 (7-37)OH*	7	0,42
Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1 (7-37)OH*	19	0,56

(continuação)

Tempo do Composto de GLP-1	Agregação em	Activação do Receptor
	Horas	de GLP-1
Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1 (7-37)OH*	22	0,50
Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1 (7-37)OH*	> 90	0,40
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37)OH*	72	1,29
Val ⁸ -Lis ²² -GLP-1 (7-37)OH*	100, 54	0,58
Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1 (7-37)OH*	> 75	0,01
Val ⁸ -His ²² -GLP-1 (7-37)OH*	> 75	0,14
Val ⁸ -Lis ²² -GLP-1 (7-36)NH ₂ *	24	0,53
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-36)NH ₂	> 65	1,0
Gli ⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37)OH	19	1,07
Val ⁸ -Glu ²³ -GLP-1 (7-36)OH*	65	0,28
Val ⁸ -Lis ²³ -GLP-1 (7-37)OH*	> 45	0,18
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1 (7-37)OH*	3	0,007
Val ⁸ -Lis ²⁴ -GLP-1 (7-37)OH*	22	0,02
Ala ⁸ -His ²⁶ -GLP-1 (7-37)OH*	> 24	0,8
Ala ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1 (7-37)OH*	> 24	0,7
Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1 (7-37)OH*	10	0,37
Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1 (7-37)OH*	2	0,47
Gli ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH*	> 40	0,29
Val ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH*	30	0,29
Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH*	> 45	0,15
Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH*	8	0,19
Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH*	13	0,19
Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1 (7-37)OH*	> 70	0,039
Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1 (7-37)OH*	20	0,1
Val ⁸ -Gli ³³ -GLP-1 (7-37)OH*	9	0,01
Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1 (7-37)OH*	> 40+	0,17
Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1 (7-37)OH*	14	0,094
Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1 (7-37)OH*	> 45, 30	0,41
Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1 (7-37)OH*	63	0,15
Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1 (7-37)OH*	> 45	0,11
Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1 (7-37)OH*	8	0,22
Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1 (7-37)OH*	> 40	0,33
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1 (7-37)OH*	> 20	0,23
Val ⁸ -Lis ²² -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH*	4	0,37

(continuação)

Tempo do Composto de GLP-1	Agregação em Horas	Activação do Receptor de GLP-1
Val ⁸ -Lis ²² -Glu ²³ -GLP-1 (7-37)OH*	> 30	0,35
Val ⁸ -Glu ²² -Gln ²³ -GLP-1 (7-37)OH	> 20	0,47
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1 (7-37)OH	> 45	1,02
Val ⁸ -Glu ²² -Lis ²³ -GLP-1 (7-37)OH	> 65	1,43
Val ⁸ -Lis ³³ -Val ³⁴ -GLP-1 (7-37)OH*	22	0,08
Val ⁸ -Lis ³³ -Asn ³⁴ -GLP-1 (7-37)OH*	> 48	0,09
Val ⁸ -Gli ³⁴ -Lis ³⁵ -GLP-1 (7-37)OH*	27	0,34
Val ⁸ -Gli ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1 (7-37)NH ₂ *	2	0,53

+ Tempo de agregação determinado a 30 °C

* apresentado apenas com fins ilustrativos

Exemplos 5 - Precipitação de Zinco de Compostos de GLP-1

Foram preparados compostos de GLP-1 individuais como descrito nos Exemplo 1 ou 2. Foram dissolvidas 3 mg de uma molécula individual de GLP liofilizada em 3 ml de tampão HEPES a 0,1 M a pH 10,5. O pH da solução resultante foi então ajustado entre 10,0 e 10,5 com NaOH a 0,2 N. A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e a solução foi então ajustada a um pH de 7,4 com HCl a 0,2 N. A solução foi filtrada através de um filtro de seringa apropriado, por exemplo um filtro de seringa Millex GV (Millipore Corporation, Bedford, MA), e a concentração do composto de GLP-1 foi estimada medindo a absorção a 280 nm num espectrofotómetro, por exemplo um Beckman DU640. A concentração da proteína foi então ajustada para 200 pM em HEPES pH 7,4.

As soluções de GLP-1 filtradas (100 µl) foram diluídas com 100 µl de HEPES a 0,1 M a pH 7,4 contendo vários níveis de cloreto de zinco numa placa de ELISA, (por exemplo, Falcon Microtest™ 96) resultando numa solução de 200 µl contendo vários níveis de cloreto de zinco e 100 µM de compostos de GLP-1. Estas soluções foram incubadas à temperatura ambiente (22 °C) durante 18 horas e então centrifugadas, por exemplo, numa centrífuga Jouan CR412 com adaptadores de microplaca. Após a centrifugação foram então transferidos 150 µl dos sobrenadantes para uma placa de microtítulo de ELISA de UV legível (por exemplo, placa de UV Costar) e a OD a 280 foi determinado num leitor de microplaca (por exemplo, Molecular Devices SPECTRAMax PLUS, SOFTmax PRO). Os resultados de uma experiência estão apresentados na Tabela 2. Os valores A_{280} são os resultados de duas determinações independentes.

Tabela 2

razão molar Zn/GLP-1	A280 de GLP-1 (7- 37)OH	A280 de Gli ⁸ -GLP-1 (7-37)OH	A280 de Val ⁸ -GLP-1 (7-37)OH	A280 de Gln ²² -GLP-1 (7-37)OH	A280 de Val ⁸ -Glu ²² - GLP-1 (7- 37)OH	A280 de Val ⁸ -Ala ²² - GLP-1 (7- 37)OH
0	0,337	0,32	0,3	0,290	0,295	0,289
0,3	0,318	0,166	0,27	0,390	0,291	0,202
0,5	0,329	0,151	0,26	0,123	0,292	0,107
0,7	0,253	0,156	0,124	0,076	0,293	0,104
1	0,148	0,119	0,06	0,074	0,26	0,110
2	0,092	0,089	0,025	0,095	0,078	0,110
3	0,081	0,085	0,021	0,095	0,052	0,104
5	0,074	0,078	0,019	0,097	0,035	0,119

Tabela 2 (continuação)

razão molar Zn/GLP-1	A280 de Val ⁸ - Ser ²² -GLP-1 (7-37)OH	A280 de Val ⁸ - Fen ²² -GLP-1 (7-37)OH	A280 de Val ⁸ - Pro ²² -GLP-1 (7-37)OH	A280 de Val ⁸ - Lis ²² -GLP-1 (7-37)OH	A280 de Val ⁸ - Asp ²² -GLP-1 (7-37)OH
0	0,2855	0,31	0,2595	0,299	0,288
0,3	0,2805	0,1485	0,2455	0,0825	0,2785
0,5	0,2665	0,1165	0,2325	0,0905	0,2845
0,7	0,1825	0,1015	0,219	0,1195	0,287
1	0,149	0,1265	0,1905	0,1225	0,291
2	0,0935	0,092	0,1695	0,1675	0,184
3	0,101	0,061	0,1615	0,1475	0,1485
5	0,0615	0,00795	0,171	0,142	0,1675

Estes resultados demonstram que apenas são necessárias pequenas quantidades de zinco para se complexar com e precipitar uma porção significativa de vários compostos de GLP-1 a partir dessas soluções diluídas.

EQUIVALENTES

Embora esta invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com referências às suas formas de realização preferidas, será compreendido pelos especialistas na técnica que podem aí ser feitas várias alterações na forma e detalhes, sem nos afastarmos do âmbito da invenção tal como definida pelas reivindicações apenas.

Lisboa, 23 de Abril de 2009

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> ANÁLOGOS DO PEPTÍDEO-1 DO TIPO GLUCAGON

<130> X-13989

<160> 53

<170> PatentIn Versão 3.0

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

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

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa na posição 5 é Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, ou His;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na posição 6 é His, Trp, Phe, ou Tyr;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa na posição 10 é Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, ou Ala;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ou Cys;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa na posição 17 é His, Asp, Lys, Glu, ou Gln;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa na posição 18 é Glu, His, Ala, ou Lys;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa na posição 20 é Asp, Lys, Glu, ou His;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa na posição 21 é Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, ou Lys;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa na posição 25 é Ala, Glu, Asp, Ser, ou Lys;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa na posição 27 é Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, ou Glu;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa na posição 28 é Glu, Lys, ou Asp;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa na posição 29 é Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, ou Glu;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na posição 30 é Arg, Glu, ou His;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na posição 31 é Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, ou Gly-Pro-NH₂, ou é deletada.

<400> 1

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

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Ile Ala Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

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

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na posição 6 é His, Trp, Phe, ou Tyr;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa na posição 10 é Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, ou Ala;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ou Cis;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa na posição 17 é His, Asp, Lys, Glu, ou Gln;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa na posição 20 é Asp, Lys, Glu, ou His;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa na posição 24 é Ala, Glu, Asp, Ser, ou His;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa na posição 29 é Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, ou Glu;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na posição 31 é Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, ou Gly-Pro-NH₂, ou é deletada.

<400> 2

His	Xaa	Glu	Gly	Thr	Xaa	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Ala	Ala	Xaa	Glu	Phe	Ile	Xaa	Trp	Leu	Val	Lys	Xaa	Arg	Xaa	
			20					25					30		

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

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

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ou Cis;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa na posição 17 é His, Asp, Lys, Glu, ou Gln;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa na posição 21 é Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, ou Lys;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa na posição 24 é Ala, Glu, Asp, Ser, ou His;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na posição 31 é Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, ou Gly-Pro-NH₂, ou é deletada.

<400> 3

```

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

Xaa Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
      20              25              30

```

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na posição 1 é L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, Beta-hidroxi-histidina, homo-histidina, alfa-fluorometil-histidina, ou alfa-metil-histidina;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

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

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é Asp, Glu, Gln, Asp, Lys, Arg, ou Cis;

<220>

<221> VARIANTE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na posição 31 é -NH₂, ou Gly.

<400> 4

```

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
      20              25              30

```

<210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 5

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 6

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 7

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ala
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 8

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Lys
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 9
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 9

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 10

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 11

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Arg
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 12
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 12

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 13

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 14

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 15

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 16

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 16

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	His	
			20					25					30		

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 17

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	His	
			20					25					30		

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 18

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

Glu	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	His	
			20					25					30		

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> homo sapiens

<400> 19

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 20
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 20

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5				10					15		
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 21
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 21

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp
1				5				10					15		
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 22
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 22

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Arg
1				5				10					15		
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 23
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 23

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 24

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é ácido cisteico;

<400> 24

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 25

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é ácido cisteico;

<400> 25

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é ácido cisteico;

<400> 26

```

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
      20           25           30

```

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 27

```

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
      20           25           30

```

<210> 28

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 28

```

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
      20           25           30

```

<210> 29

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 29

```

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
      20           25           30

```

<210> 30
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 30
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa na posição 16 é ácido cisteico;

<400> 31
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> construção sintética

<400> 32
 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 33
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 33

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
	20						25					30	

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 34

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
	20						25					30	

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 35

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
	20						25					30	

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é ácido cisteico;

<400> 36

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
			20					25					30

<210> 37

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 37

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
			20					25					30

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 38

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
			20					25					30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 39

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
			20					25					30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 40

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Lys
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg		
			20					25					30		

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na posição 16 é ácido cisteico;

<400> 41

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Xaa
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg		
			20					25					30		

<210> 42

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 42

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 43

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 43

```

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
          20           25           30

```

<210> 44

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 44

```

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
          20           25           30

```

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 45

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
          20           25           30

```

<210> 46

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 46

```

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys His Arg Gly
          20           25           30

```

<210> 47

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 47

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	His	
			20					25					30		

<210> 48

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 48

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 49

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 49

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 50

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 50

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 51

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 51

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Gly	Lys	Arg	Gly	
	20							25					30		

<210> 52

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 52

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	His	
	20							25					30		

<210> 53

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 53

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

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	His	
	20							25					30		

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto de GLP-1 compreendo a sequência de aminoácidos de fórmula 1 (SEQ ID NO: 1)

**His - Xaa₈ - Glu - Gli - Xaa₁₁ - Xaa₁₂ - Tre - Ser - Asp -
Xaa₁₆ - Ser - Ser - Tir - Leu - Glu - Glu - Xaa₂₃ - Xaa₂₄ -
Ala - Xaa₂₆ - Xaa₂₇ - Fen - Ile - Xaa₃₀ - Trp - Leu - Xaa₃₃ -
Xaa₃₄ - Xaa₃₅ - Xaa₃₆ - R**

Fórmula I (SEQ ID NO: 1)

em que:

Xaa₈ é: Gli, ou Val;

Xaa₁₁ é: Asp, Glu, Arg, Tre, Ala, Lis, ou His;

Xaa₁₂ é: His, Trp, Fen, ou Tir;

Xaa₁₆ é: Leu, Ser, Tre, Trp, His, Fen, Asp, Val, Tir, Glu,
ou Ala;

Xaa₂₃ é: His, Asp, Lis, Glu, Gln, ou Arg;

Xaa₂₄ é: Glu, Arg, Ala, ou Lis;

Xaa₂₆ é: Trp, Tir, Fen, Asp, Lis, Glu, ou His;

Xaa₂₇ é: Ala, Glu, His, Fen, Tir, Trp, Arg, ou Lis;

Xaa₃₀ é: Ala, Glu, Asp, Ser, ou His;

Xaa₃₃ é: Asp, Arg, Val, Lis, Ala, Gli, ou Glu;

Xaa₃₄ é: Glu, Lis, ou Asp;

Xaa₃₅ é: Tre, Ser, Lis, Arg, Trp, Tir, Fen, Asp, Gli, Pro,
His, ou Glu;

Xaa₃₆ é: Tre, Ser, Asp, Trp, Tir, Fen, Arg, Glu, ou His;

R é: Lis, Arg, Tre, Ser, Glu, Asp, Trp, Tir, Fen, His, -NH₂, Gli, Gli-Pro, ou Gli-Pro-NH₂, ou é delectado.

2. Um composto de GLP-1 da reivindicação 1 compreendo a sequência de aminoácidos de fórmula II (SEQ ID NO: 2):

His - Xaa₈ - Glu - Gli - Tre - Xaa₁₂ - Tre - Ser - Asp - Xaa₁₆ - Ser - Ser - Tir - Leu - Glu - Xaa₂₂ - Xaa₂₃ - Ala - Ala - Xaa₂₆ - Glu - Fen - Ile - Xaa₃₀ - Trp - Leu - Val - Lis - Xaa₃₅ - Arg - R

Fórmula II (SEQ ID NO: 2)

em que:

Xaa₈ é: Gli, ou Val;

Xaa₁₂ é: His, Trp, Fen, ou Tir;

Xaa₁₆ é: Leu, Ser, Tre, Trp, His, Fen, Asp, Val, Glu, ou Ala;

Xaa₂₂ é: Glu;

Xaa₂₃ é: His, Asp, Lis, Glu, ou Gln;

Xaa₂₆ é: Asp, Lis, Glu, ou His;

Xaa₃₀ é: Ala, Glu, Asp, Ser, ou His;

Xaa₃₅ é: Tre, Ser, Lis, Arg, Trp, Tir, Fen, Asp, Gli, Pro, His, ou Glu;

R é: Lis, Arg, Tre, Ser, Glu, Asp, Trp, Tir, Fen, His, -NH₂, Gli, Gli-Pro, Gli-Pro-NH₂, ou é delectado.

3. O composto de GLP-1 da reivindicação 1 compreendendo a sequência de aminoácidos de fórmula III (SEQ ID NO: 3):

**His - Xaa₈ - Glu - Gli - Tre - Fen - Tre - Ser - Asp - Val
- Ser - Ser - Tir - Leu - Glu - Xaa₂₂ - Xaa₂₃ - Ala - Ala -
Lis - Xaa₂₇ - Fen - Ile - Xaa₃₀ - Trp - Leu - Val - Lis -
Gli - Arg - R**

Fórmula III (SEQ ID NO: 3)

em que:

Xaa₈ é: Gli, ou Val;

Xaa₂₂ é: Glu;

Xaa₂₃ é: His, Asp, Lis, Glu, ou Gln;

Xaa₂₇ é: Ala, Glu, His, Fen, Tir, Trp, Arg, ou Lis;

Xaa₃₀ é: Ala, Glu, Asp, Ser, ou His;

R é: Lis, Arg, Tre, Ser, Glu, Asp, Trp, Tir, Fen, His, -NH₂, Gli, Gli-Pro, ou Gli-Pro-NH₂, ou é delectado.

4. O composto de GLP-1 de qualquer uma das reivindicação de 1 a 3 em que não mais do que 6 aminoácidos no composto de GLP-1 diferem dos aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH ou em GLP-1 (7-36)NH₂.

5. O composto de GLP-1 da reivindicação 4 em que não mais do que 5 aminoácidos no composto de GLP-1 diferem dos aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH ou em GLP-1 (7-36)NH₂.

6. O composto de GLP-1 da reivindicação 5 em que não mais do que 4 aminoácidos no composto de GLP-1 diferem dos aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH ou em GLP-1 (7-36)NH₂.

7. O composto de GLP-1 da reivindicação 6 em que não mais do que 3 aminoácidos no composto de GLP-1 diferem dos aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH ou em GLP-1 (7-36)NH₂.

8. O composto de GLP-1 da reivindicação 7 em que não mais do que 2 aminoácidos no composto de GLP-1 diferem dos aminoácidos correspondentes em GLP-1 (7-37)OH ou em GLP-1 (7-36)NH₂.

9. O composto de GLP-1 de qualquer uma das reivindicações precedentes para utilização como um medicamento.

10. O composto de GLP-1 de qualquer uma das reivindicações de 1 a 8 para utilização no tratamento da diabetes não dependente de insulina.

11. O composto de GLP-1 de qualquer uma das reivindicações de 1 a 8 para utilização no tratamento profilático da diabetes não dependente de insulina.

12. O composto de GLP-1 de qualquer uma das reivindicações de 1 a 8 para utilização no tratamento da obesidade, do derrame cerebral, do enfarte do miocárdio, das alterações catabólicas pós cirurgia, ou do síndrome do intestino irritável.

Lisboa, 23 de Abril de 2009

Fig. 1

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Asp-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Arg-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH

Fig. 2

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37) OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Asp-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37) OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Arg-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37) OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37) OH

Fig. 3

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Val⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37)OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Gly⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37)OH

Fig. 4

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Ala-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1 (7-37) OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1 (7-37) OH

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 5977071 A, Hoffmann
- US 5545618 A, Buckley
- US 5670360 A, Thorrens
- WO 0016797 A, Efendic
- WO 9808531 A, Efendic
- WO 9819698 A, Efendic
- US 6006753 A, Efendic
- WO 9964080 A, Efendic
- WO 0007817 A
- EP 619322 A, Gelfand
- US 5120712 A [0032]

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- MOJSDOV, S. *Int. J. Peptide Protein Research*, 1982, vol. 40, 333-343.
- ADELHORST et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 5275.
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company.
- GREEN ; WILTS. *Protecting Groups in Organic Synthesis*. John Wiley and Sons, 1991
- ARVINTE T ; CUDD A ; DRAKE AF, *J. Bio. Chem.*, 1993, vol. 268, 6415-6422