



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

(21) PI0615573-1 A2



(51) Int.Cl.:
A61K 38/00 2006.01

(22) Data de Depósito: 07/09/2006
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)

(54) Título: **ANÁLOGOS DE GLP-1 ESTABILIZADOS**

(30) Prioridade Unionista: 08/09/2005 US 60/715.322

(73) Titular(es): Trustees Of Tufts College

(72) Inventor(es): DAVID GEORGE SANFORD, WILLIAM W. BACHOVCHIN

(74) Procurador(es): Flávia Salim Lopes

(86) Pedido Internacional: PCT US2006034685 de 07/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/030519 de 15/03/2007

(57) Resumo: ANALOGOS DE GLP-1 ESTABILIZADOS Análogos de polipeptídeo da invenção que incluem: a) uma seqüência de aminoácido de base pelo menos 80% idêntica a uma de um fragmento de GLP-I; e b) resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base, onde os análogos têm atividade semelhante à GLP-I de duração mais longa do que GLP-I nativo e/ou receptor de GLP-I tem uma afinidade maior para os análogos do que GLP-I nativo. Outros análogos de polipeptídeo da invenção incluem a) uma seqüência de aminoácido de base de pelo menos 50% idêntico a um fragmento de GLP-I no qual o resíduo de aminoácido na seqüência de aminoácido base correspondendo a resíduo P¹ de GLP-I é um análogo de aminoácido tendo um carbono CB tetrassubstituído; e b) resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base, onde os análogos têm as propriedades indicadas acima. A invenção também inclui métodos de tratamento onde esses análogos são administrados.

ANÁLOGOS DE GLP-1 ESTABILIZADOS

Pedidos Relacionados

O presente pedido reivindica o benefício de prioridade ao pedido de patente provisório dos Estados Unidos número 5 de série 60/715.322, depositado em 8 de setembro de 2005; o qual é incorporado aqui a título de referência na íntegra.

Antecedentes da Invenção

A terapêutica de polipeptídeo e peptídeo é amplamente utilizada em prática médica. Sua facilidade de produção, 10 por tecnologia de DNA recombinante ou sintetizadores de peptídeo, assegura seu uso contínuo em uma variedade de circunstâncias nos anos por vir. Por conseguinte, terapêutica de polipeptídeo, como hormônios, citocinas e fatores de crescimento, representam uma classe importante 15 de agentes terapêuticos. Certos polipeptídeos nativos, entretanto, podem ser inativados rapidamente *in vivo* através de proteólise ou isomerização. Essa inativação pode ser inconveniente em casos onde se deseja manter um nível de sangue consistente ou contínuo da terapêutica durante um 20 período de tempo, visto que administrações repetidas serão então necessárias. Em certos casos, um ou mais dos produtos proteolíticos do polipeptídeo podem ser antagonistas à atividade do polipeptídeo intacto. Nesses casos, a administração de terapêutica adicional individualmente pode 25 ser insuficiente para superar o efeito antagonista dos produtos proteolíticos.

Para ilustrar adicionalmente, um hormônio de peptídeo cuja presença prolongada no sangue pode ser benéfica inclui peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1). GLP-1 é um 30 hormônio de polipeptídeo importante com função reguladora

em metabolismo de glicose e secreção e metabolismo gastrintestinal. Os esforços atuais mostram que GLP-1 é um fator de crescimento para células beta no pâncreas e talvez esteja envolvido em diferenciação de células em outros 5 órgãos além do pâncreas.

Acredita-se que GLP-1 seja degradado por membros da classe de clivagem pós-prolina de enzimas de proteinase de serina, como dipeptidil peptidase IV (DPP IV). DPP IV é um peptidase de serina associado a membrana que cliva dipeptídeos terminais-N a partir de uma cadeia de peptídeo contendo na penúltima (P1) posição, preferivelmente, um resíduo de prolina, ou um resíduo de alanina se o resíduo de terminal-N (P2) for histidina ou um grande aromático como tirosina, triptofano ou fenil alanina. A seqüência de 10 extremidade amino de GLP-1 é HIS-Ala-Glu. Conseqüentemente, 15 DPP IV está envolvido na regulação da atividade de GLP-1 in vivo.

A remoção mediada por DPP IV de dipeptídeos Xaa-Ala ou Xaa-Pro, onde Xaa é um resíduo de aminoácido, a partir da 20 extremidade-N de hormônios de peptídeo bioativo como GLP-1 torna os mesmos inativos, ou mesmo antagonistas. Por conseguinte, a clivagem e inativação de hormônios de peptídeo por proteinases de serina como DPP IV é um exemplo que ilustra limitações para o uso de polipeptídeos 25 terapêuticos; a saber, sua duração curta de ação in vivo. Por esse motivo, há necessidade na técnica por peptídeos de ação mais longa com atividade semelhante a GLP-1.

Sumário da Invenção

A presente invenção provê, genericamente, análogos de 30 GLP-1 que aumentaram a duração de atividade semelhante a

GLP-1 *in vivo*. A presente invenção também provê análogos de GLP-1 que têm afinidade aumentada para o receptor de GLP-1.

Em um aspecto, a presente invenção é um análogo de polipeptídeo compreendendo:

5 a) uma seqüência de aminoácido de base pelo menos 80% idêntica a uma de GLP-1 (7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1(7-36) e GLP-1(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4); e

10 b) um a quinze resíduos de aminoácidos de ocorrência (natural ou não naturalmente) ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido,

onde o análogo tem atividade semelhante a GLP-1 de duração mais longa *in vivo* em seres humanos do que GLP-1 nativo.

15 Em outro aspecto, a presente invenção é um análogo de polipeptídeo compreendendo:

a) uma seqüência de aminoácido pelo menos 80% idêntica a um entre GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4); e

20 b) um a quinze resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base,

onde o receptor de GLP-1 tem maior afinidade com o análogo do que GLP-1 nativo. Tais análogos têm também vantajosamente atividade semelhante a GLP-1 de duração mais longa *in vivo* em seres humanos do que GLP-1 nativo.

25 Ainda em outro aspecto, a presente invenção é um análogo de peptídeo compreendendo:

a) uma seqüência de aminoácido pelo menos 50% idêntica a um entre GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4) na qual o resíduo de aminoácido 30 na seqüência de aminoácido de base correspondendo ao

resíduo P₁ de GLP-1 é um análogo de aminoácido tendo um carbono C_β tetrassubstituído; e

b) um a quinze resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base,

5 onde o análogo tem atividade semelhante a GLP-1 de duração mais longa in vivo em seres humanos do que GLP-1 nativo.

Em aspecto adicional, a presente invenção é um análogo de peptídeo compreendendo:

10 a) uma seqüência de aminoácido pelo menos 50% idêntica a um entre GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS. 1-4) na qual o resíduo de aminoácido na seqüência de aminoácido de base correspondendo ao resíduo P₁ de GLP-1 é um análogo de aminoácido tendo um carbono C_β tetrassubstituído; e

b) um a quinze resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base,

onde o receptor de GLP-1 tem atividade maior para o análogo do que para GLP-1 nativo. Tais análogos têm também vantajosamente atividade semelhante a GLP-1 de duração mais longa in vivo em seres humanos do que GLP-1 nativo.

20 A presente invenção também provê composições farmacêuticas que compreendem um ou mais dos presentes análogos. Composições farmacêuticas exemplares compreendem um ou mais análogos formulados com veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

Outro aspecto da presente invenção é um método de tratar uma doença em um sujeito compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de 30 um ou mais dos referidos análogos. Os presentes análogos

podem ser administrados individualmente, ou podem ser administrados como parte de um regime terapêutico incluindo outras terapias apropriadas à indicação específica da doença. Como exemplo, a administração de um análogo para o tratamento de diabetes pode ser utilizada individualmente, ou pode ser utilizada em combinação com modulação de dieta e exercício, e/ou com administração de insulina. Métodos de tratamento combinatórios exemplares, adicionais, compreendem a administração de um análogo e a administração de um inibidor da enzima ou enzimas específicas que clivam o polipeptídeo de GLP-1 nativo. Tal inibidor pode ser específico à enzima particular (por exemplo, um inibidor específico de DPP IV) ou pode ser mais genérico à classe de enzima (por exemplo, um inibidor de protease de serina).

Outro aspecto da presente invenção é utilizar os presentes análogos para fins de diagnóstico.

Outro aspecto da presente invenção é utilizar os presentes análogos para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou condição aqui revelada.

Um aspecto adicional da invenção é um método de aumentar a meia-vida in vivo em seres humanos de um peptídeo pelo menos 80% idêntico a GLP-1, que inclui ligar um a quinze resíduos de aminoácido à extremidade carbóxi do peptídeo.

Ainda outro aspecto da presente invenção é um método de conduzir um negócio compreendendo identificar, fabricar, comercializar, distribuir e/ou licenciar um análogo da invenção, composições farmacêuticas do mesmo, e/ou kits incluindo o análogo.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 mostra digestão de (A) Ala-Pro-Leu-Ser-Trp-Ser-NH₂ (), Ala-Pro-Ile-Ser-Trp-Ser-NH₂ (Δ) e Ala-Pro-Tle-Ser-Trp-Ser-NH₂ (▽), incubado com DPP IV de rato em 50 mM HEPES, 0.14 M NaCl, pH 8,0 a 37°C; e (B) GLP-1 (7-36 amida) (■), TPA1B4 (◆) e P1732 (▲) incubado com DPP IV humano em 50 mM HEPES, 0.14 M NaCl, pH 8,0 a 30°C. Nos tempos indicados uma alíquota foi removida, a reação foi parada pela adição de HCl a um pH de 2, e as amostras foram analisadas por LCMS. Concentrações de peptídeo foram 0.1 mM. A percentagem de clivagem foi determinada por integração dos picos de produto e substrato no cromatograma de MS. Os dados foram adaptados em uma equação exponencial de fase única.

A figura 2 mostra a competição de GLP-1 (■), Exendin-4 (▲), TPA144 (○), TPA1B4 (◆) e P1732 (▼) com ligação de ¹²⁵I exendin (9-39) em células COS-7 que expressam o receptor de GLP-1 humano. Valores de IC₅₀ foram 1.5 nM para GLP-1, 36.3 nM para TPA144, 7.6 nM para TPA1B4, 2.5 nM para P1732 e 0.4 nM para Exendin-40. Os dados representam os resultados de experimentos independentes e são normalizados para ligação de ¹²⁵I exendin (9-39) na ausência de concorrente.

A figura 3 mostra ativação do receptor de GLP-1, como medido por produção de cAMP. Os peptídeos foram testados em relação à atividade agonista em uma concentração de 300 nM. Os dados representam a média +SEM com n = 4.

A figura 4 mostra produção de cAMP em células COS-7 expressando o receptor de GLP-1 humano após incubação com várias concentrações de GLP-1 (■), P1732 (▼) e Exendin-4 (▲). Os valores de dados + SEM são traçados e adaptados em

uma curva de resposta de dose sigmoidal. Valores de EC₅₀ obtidos a partir das curvas adaptadas são 0.5 nM, 0.6 nM e 0.2 nM para GLP-1, P1732 e Exendin-4, respectivamente.

A figura 5 mostra curso de tempo de efeitos de redução de glicose, onde as medições de glicose no sangue foram feitas antes, e nos tempos indicados após injeção de solução salina (●), ou 8 µg de GLP-1 (■), TPA1B4 (◆), P1732 (▼), DGS65 (○), ou Exendin-4 (▲). TPA1B4 com P3 β-dimetil Asp é comparado com GLP-1 (A) e análogos de peptídeo com modificações tanto de P3 como terminal carbóxi são comparados com exendin-4 (B). Em cada ponto de tempo a percentagem de alteração em glicose de sangue foi determinada para 10 camundongos e a alteração média ± SEM é traçada.

A figura 6 mostra a resposta de dose apresentada pelos peptídeos do Exemplo 1 em camundongos diabéticos. Medições de glicose de sangue foram feitas antes da injeção de várias doses de TPA1B4 (◆), P1732 (▼) e Exendin-4 (▲) e novamente em 60 minutos após injeção. Em cada dose, a percentagem de alteração em glicose de sangue foi determinada para 10 camundongos e a alteração média ± SEM é traçada. Os dados foram adaptados em uma curva de resposta de dose sigmoidal. Valores EC₅₀ a partir dessas adaptações (e 95% de intervalos de confiança) são 0,4 µg (0,1 - 1,92 µg) para TPA1B4, 0,5 µg (0,4 - 3,5 µg) para P173 e 0,5 µg (0,2 - 1,2 µg) para exendin-4.

A figura 7 mostra o curso de tempo de efeitos de redução de glicose, onde as medições de glicose no sangue foram feitas antes, e nos tempos indicados após injeção de solução salina (■), ou 8 µg de TPA1B4 (▼), DGS69 (▽) ou

Exendin-4 (^). Em cada ponto de tempo, a percentagem de alteração em glicose no sangue foi determinada para 10 camundongos e a alteração média \pm SEM é traçada.

Descrição Detalhada da Invenção

5 1. Visão geral

A presente invenção refere-se genericamente a análogos de GLP-1 que têm meia-vidas in vivo aumentadas, por exemplo, resultando de suscetibilidade reduzida à clivagem por enzimas proteolíticas e/ou afinidade aumentada para o 10 receptor de GLP-1, ainda assim retêm a atividade desejada de GLP-1. Em particular, a presente invenção refere-se à descoberta de que a meia-vida in vivo de um peptídeo tendo atividade semelhante a GLP-1 pode ser alongada pela ligação de um a quinze resíduos de aminoácido (de ocorrência 15 natural ou não natural) à extremidade carbóxi do peptídeo.

Os análogos de GLP-1 da invenção têm um a quinze resíduos de aminoácido ligados à extremidade terminal de carbóxi da seqüência de aminoácidos de base. A seqüência de aminoácido de base se refere à seqüência de aminoácido 20 antes da modificação com um a quinze resíduos de aminoácido adicionais. Tipicamente, a seqüência de aminoácido de base é pelo menos 50% idêntica à seqüência de um entre GLP-1-(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4) particularmente pelo menos 80% idêntica, pelo menos 25 90% idêntica, pelo menos 95% idêntica, ou mesmo 100% idêntica. Tipicamente, a identidade de seqüência é medida sobre o comprimento inteiro da seqüência relevante. Em certas modalidades da invenção, a seqüência de aminoácido de base é uma de GLP-1-(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1-(7-36) e 30 GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4) ou difere em somente um

resíduo de aminoácido a partir de GLP-1-(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4). As seqüências de GLP-1-(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4) são como a seguir:

5 GLP-1-(7-34) : HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK (SEQ ID NO: 1)

GLP-1-(7-35) : HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKKG (SEQ ID NO: 2)

10 GLP-1-(7-36) : HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID NO: 3)

GLP-1-(7-37) : HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 4)

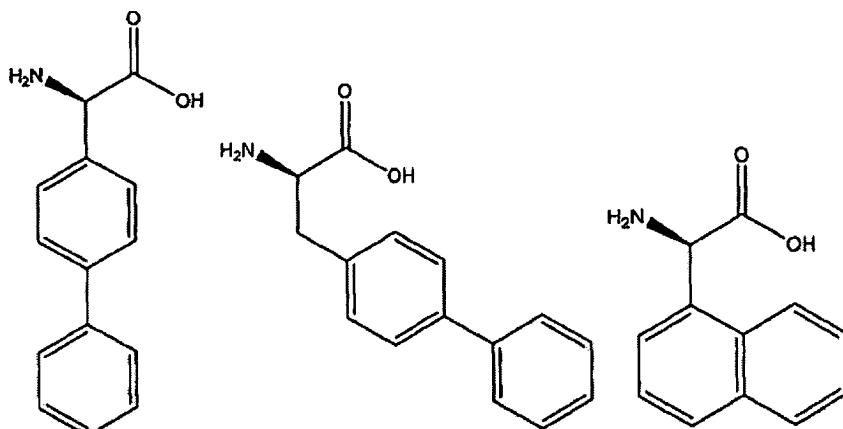
Os resíduos de aminoácido adicionados são tipicamente resíduos de alfa-aminoácido.

15 Em certas modalidades, um ou mais (até mesmo todos) resíduos de aminoácido adicionados são de ocorrência não natural. Como utilizado aqui, aminoácidos de ocorrência não natural são aminoácidos diferentes dos 20 aminoácidos codificados para DNA humano. "Ocorrência não natural" não 20 pretende excluir todos os aminoácidos encontrados em organismos (por exemplo, seres humanos e outros mamíferos) a menos que especificamente indicado.

Aminoácidos de ocorrência não natural exemplares apropriados para uso na invenção são aqueles tendo cadeias laterais contendo arila. Em certas modalidades, a cadeia lateral contendo arila tem um grupo de arila bicíclico ou policíclico. Em certas modalidades, a cadeia lateral contendo arila tem dois ou mais grupos de arila, como bifenil (4-fenil-fenil). Aminoácidos exemplares com cadeias laterais de ocorrência não natural incluem bifenil glicina,

bifenil alanina e naftil glicina, cujas estruturas são como a seguir:

5



10 Em certas modalidades, os resíduos de aminoácido adicionados são todos de ocorrência natural. Quando todos os resíduos de aminoácido adicionados são de ocorrência natural, os resíduos são vantajosamente selecionados de um ou mais daqueles na extremidade carbóxi, resíduos 31-39, de 15 exendin-4. Exendin-4 é um hormônio de peptídeo isolado a partir da salina de *Heloderma suspectum* (Gila monster) que tem atividade de redução de glicose em mamíferos. Os resíduos 31-39 de exendin-4 são:

Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5).

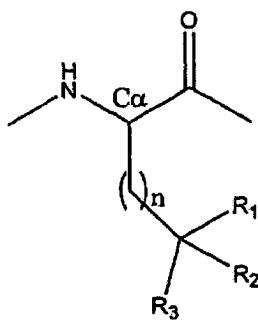
20 Preferivelmente, pelo menos três resíduos consecutivos a partir dos resíduos 31-39, como Pro-Ser-Ser ou a seqüência inteira de nove resíduos, são adicionados à extremidade carbóxi de uma seqüência de aminoácido de base. Em outra modalidade preferida, somente Pro é ligado à 25 extremidade carbóxi.

Em certas modalidades da invenção, a seqüência de aminoácido de base é modificada para proteinases de clivagem pós-prolina na posição P'1 (o resíduo para o lado terminal de carbóxi do sítio de clivagem de amida). Essa 30 modificação produz análogos de GLP-1 com suscetibilidade

muito reduzida à clivagem mediada por enzima em relação a GLP-1 nativo, ainda assim os análogos retêm a atividade biológica de GLP-1 nativo.

Tipicamente, a modificação de análogos de GLP-1 no resíduo P'_1 (do sítio de clivagem) envolve a substituição de um análogo de aminoácido tendo um carbono $C\beta$ tetra-substituído. Tais análogos de aminoácido podem aumentar acentuadamente a meia-vida in vivo do análogo resultante, por exemplo, que pode ter uma duração mais longa de ação biológica e/ou clearance reduzida (por exemplo, meia-vida de soro mais longa) em relação ao polipeptídeo do tipo selvagem.

Embora a substituição do resíduo de P'_1 por outro aminoácido de ocorrência natural seja considerada, em modalidades preferidas, o resíduo de P'_1 com um análogo de aminoácido de ocorrência não natural e ainda mais preferivelmente, com um que é um análogo estrutural, por exemplo, retendo atributos similares com relação à natureza estérica e/ou eletrônica. Para ilustrar, em certas modalidades a presente invenção provê um polipeptídeo modificado que é tornado menos suscetível à proteólise por uma proteinase de clivagem pós-prolina, como dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), onde o polipeptídeo foi modificado na posição P'_1 com um aminoácido ou análogo de aminoácido da Fórmula 1:



onde:

R₁ e R₂ representam cada um independentemente uma alquila inferior, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, arila, alcoxila, carboxamida, 5 carbonila, halogênio, hidroxila, amina ou ciano, ou R₁ e R₂ tomados juntos formam um anel de 4-7 átomos;

R₃ representa uma alquila inferior, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, arila, amino, alcoxila, halogênio, carboxamida, carbonila, ciano, tiol, tioalquila, 10 acilamino, um amido, ciano, nitro, azido, sulfato, sulfonato, sulfonamido, -(CH₂)_m-R₄, -(CH₂)_m-OH, -(CH₂)_m-COOH, -(CH₂)_m-O-alquila inferior, -(CH₂)_m-O-alquenila inferior, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-R₄, -(CH₂)_m-S-alquila inferior, 15 -(CH₂)_m-S-alquenila inferior, -(CH₂)_n-S-(CH₂)_m-R₄, -(CH₂)_m-N-C(=NH)NH₂, -(CH₂)_m-C(=O)NH₂, ou -(CH₂)_m-NH₂,;

R₄ representa independentemente para cada ocorrência, uma arila, aralquila, cicloalquila, cicloalquenila ou um heterociclo;

M = 0, 1 ou 2; e

20 N = 0, 1 ou 2.

Em certas modalidades preferidas, R₁ e R₂ representam cada um independentemente um grupo hidrofóbico pequeno, como alquila inferior (preferivelmente metila, etila ou propila, e ainda mais preferivelmente metila), um halogênio, ou uma alquila inferior halogenada. 25

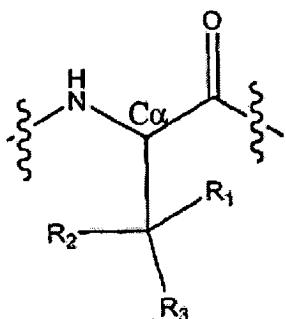
Em certas modalidades preferidas, R₃ representa uma alquila inferior, mais preferivelmente metila, etila ou propila, e ainda mais preferivelmente metila. Em outras modalidades preferidas, R₃ representa uma arila, como 30 fenila ou hidróxi fenila (preferivelmente para-hidróxi).

Ainda em outras modalidades preferidas, R_3 representa um grupo de hidroxila. Ainda em outras modalidades preferidas, R_3 representa $-(CH_2)_m-COOH$, onde m é preferivelmente 0 ou 1.

Em certas modalidades preferidas, $n = 0$.

5 Em certas modalidades preferidas de tais análogos de substrato, o P'_1 é um análogo de aminoácido tendo um carbono $C\beta$ tetrassubstituído, como representado na fórmula II:

10



onde:

15

R_1 e R_2 representam cada um independentemente uma alquila inferior, heteroalquila, cicloalquila, heterocicloalquila, arila, alcoxila, carboxamida, carbonila, halogênio, hidroxila, amina ou ciano, ou R_1 e R_2 tomados juntos formam um anel de 4-7 átomos;

20

R_3 representa uma alquila inferior, heteroalquila, amino, alcoxila, halogênio, carboxamida, carbonila, ciano, tiol, tioalquila, acilamino, nitro, azido, sulfato, sulfonato, sulfonamido, $-(CH_2)_m-R_4$, $-(CH_2)_m-OH$, $-(CH_2)_m-COOH$, $-(CH_2)_m-O$ -alquila inferior, $-(CH_2)_m-O$ -alquenila inferior, $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-R_4$, $-(CH_2)_m-S$ -alquila inferior, $-(CH_2)_m-S$ -alquenila inferior, $-(CH_2)_n-S-(CH_2)_m-R_4$, $-(CH_2)_m-N-C(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_m-C(=O)NH_2$, ou $-(CH_2)_m-NH_2$;

25

R_4 representa independentemente para cada ocorrência, uma arila, aralquila, cicloalquila, cicloalquenila ou um heterociclo não aromático; e

30

$m = 0, 1$ ou 2 .

Em certas modalidades, R_1 e R_2 representam cada um independentemente uma alquila inferior ou um halogênio; R_3 representa uma alquila inferior, arila, um grupo de hidróxi, $-(CH_2)_m-COOH$, $-(CH_2)_m-NH_2$, $-(CH_2)_m-N-C(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_m-C(=O)NH_2$, $-SH$, ou $-(CH_2)_m-S-CH_3$; e $m = 0, 1$ ou 2 .

Em certas modalidades preferidas, R_1 e R_2 representam cada um independentemente uma metila, etila ou propila, e ainda mais preferivelmente uma metila.

Em certas modalidades preferidas, R_3 representa uma alquila inferior, mais preferivelmente metila, etila ou propila, e ainda mais preferivelmente uma metila. Em outras modalidades preferidas, R_3 representa uma arila, como fenila, hidróxi fenila (preferivelmente para-hidróxi), indol ou imidazol. Ainda em outras modalidades preferidas, R_3 representa um grupo hidroxila. Em certas modalidades preferidas, R_3 representa $-COOH$ ou $-CH_2-COOH$. Ainda em outras modalidades preferidas, R_3 representa $-CH_2-CH_2-N-C(=NH)NH_2$, $-CH_2-C(=O)NH_2$, $-CH_2-CH_2-C(=O)NH_2$, $-SH$, ou $-CH_2-S-CH_3$.

Seqüências de aminoácido de base exemplares tendo um resíduo P'_1 modificado são mostradas na Tabela 1, onde X indica a posição do resíduo P'_1 modificado:

Tabela 1

	Seqüência nativa	Análogo exemplar
Peptídeo semelhante a glucagon humano GLP- 1 (7-37)	HAE*GTFTSDVSSYLEGQAAK EFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 4)	HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 6)

Peptídeo semelhante a Human glucagon 1: GLP-1 (7- 36) NH ₂	HAE*GTFTSDVSSYLEGQAAK EFIAVLVKGR-NH ₂ (SEQ ID NO: 3)	HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAVLVKGR-NH ₂ (SEQ ID NO: 7)
Exendin-4 (análogo de GLP-1)	HGE*GTFTSDLSKEMEEEAVR LFIEWLKNGGPSSGAPPPS- NH ₂ (SEQ ID NO: 8)	HGXGTFTSDLSKEMEEEAVRL FIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH ₂ (SEQ ID NO: 9)

Mais genericamente, a presente invenção considera especificamente a geração de análogos para GLP-1 que têm uma seqüência de aminoácido:

Xaa-Ala-Yaa-R ou Xaa-Pro-Yaa-R'

5 onde Xaa e Yaa representam resíduos de aminoácido, e R e R', independentemente para cada ocorrência, representam cadeias de polipeptídeo tendo atividade semelhante a GLP-1 e compreendendo 1 a aproximadamente 100 resíduos de aminoácido, onde a seqüência de análogo Yaa é substituída 10 por um resíduo de aminoácido representado pela Fórmula I ou Fórmula II. A invenção considera a modificação de polipeptídeos variantes que diferem em seqüência de GLP-1 para produzir análogos de P'₁ variantes. Tais variantes são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% ou maior do que 99% 15 idênticas a GLP-1-(7-36).

Em certas modalidades, R é um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido selecionada de:

GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAVLVKGRG (SEQ ID NO: 10), e

GTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAVLVKGR-NH₂ (SEQ ID NO: 11),

20 ou uma seqüência que difere em 5 ou menos resíduos de aminoácido para a mesma, ainda mais preferivelmente difere

em não mais do que 4, 3 ou mesmo 2 resíduos de aminoácido.

Uma seqüência de aminoácido de base preferida é:

His-Ala-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-

Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-

5 Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg

(SEQ ID NO: 12),

onde Xaa é beta-dimetil aspartato ou terc-leucina, particularmente beta-dimetil aspartato. Aminoácidos ligados vantajosamente a essa seqüência de aminoácido de base incluem bifenil glicina, Pro-Ser-Ser e Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5).

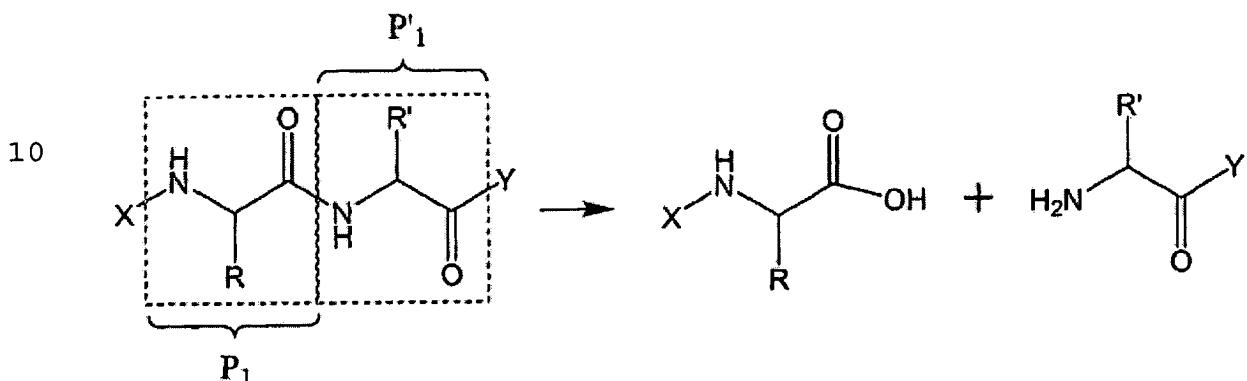
II. Definições

O sítio de ligação para um substrato de peptídeo consiste em uma série de "sub-sítios de especificidade" através da superfície da enzima. O termo "sub-sítio de especificidade" se refere a um bolso ou outro sítio na enzima capaz de interagir com uma porção de um substrato para a enzima.

Ao discutir as interações de peptídeos e substratos de proteína com proteinases, por exemplo, proteinases de serina e cisteína e similares, o presente pedido utiliza a nomenclatura de Schechter e Berger [(1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 27:157-162)]. Os resíduos de aminoácido individuais de um substrato ou inibidor são, a partir da extremidade amino para a extremidade carbóxi, designadas $-P_2-P_1-P'_1-P'_2-$, etc. e os sub-sítios correspondentes da enzima são designados $-S_2-S_1-S'_1-S'_2-$, etc. A ligação scissile do substrato é a ligação de amida que liga os resíduos P_1 e P'_1 .

30 Um "resíduo de P'_1 " se refere ao resíduo de aminoácido

de um polipeptídeo de substrato que se torna a nova extremidade amino do polipeptídeo de produto resultando a partir de clivagem mediada por proteinase da estrutura de amida do polipeptídeo de substrato. Para ilustrar 5 adicionalmente, um polipeptídeo de substrato inclui uma ligação de estrutura de amida que está sujeita a uma reação proteolítica representada pelo esquema geral:



O termo "cadeia lateral de aminoácido" é aquela parte de um resíduo de aminoácido exclusiva da estrutura, como definido por K.D. Kopple, "Peptides and Amino acids," W.A. Benjamin Inc., Nova York e Amsterdam, 1966, páginas 2 e 33; 30 os exemplos de tais cadeias laterais dos aminoácidos comuns

O termo "cadeia lateral de aminoácido" é aquela parte de um resíduo de aminoácido exclusiva da estrutura, como definido por K.D. Kopple, "Peptides and Amino acids," W.A. Benjamin Inc., Nova York e Amsterdam, 1966, páginas 2 e 33; 30 os exemplos de tais cadeias laterais dos aminoácidos comuns

são $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2$ (a cadeia lateral de metionina), $-\text{CH}_2(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (a cadeia lateral de isoleucina), $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (a cadeia lateral de leucina) ou $-\text{H}$ (a cadeia lateral de glicina). Essas cadeias laterais são pendentes a partir do carbono $\text{C}\alpha$ de estrutura.

O termo "carbono $\text{C}\beta$ tetrassubstituído" se refere a um átomo de carbono que é (i) diretamente pendente a partir de carbono $\text{C}\alpha$ da estrutura de aminoácido, e (ii) contém quatro substituintes (incluindo o carbono $\text{C}\alpha$), nenhum dos quais é hidrogênio.

Como utilizado aqui, "proteína" é um polímero que consiste essencialmente em uma combinação de quaisquer dos 20 aminoácidos. Embora "polipeptídeo" seja freqüentemente utilizado em referência a proteínas relativamente grandes, e "peptídeo" seja freqüentemente utilizado em referência à proteína pequena, o uso desses termos na técnica se sobrepõe e é variado. A menos que evidente a partir do contexto, os termos "peptídeo(s)", "proteína(s)" e "polipeptídeo(s)" são utilizados de forma intercambiável aqui.

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology (1984) recomendou o uso do termo "peptidase" para o subconjunto de hidrolases de ligação de peptídeo (Subclasse E.C.3.4). O termo amplamente utilizado "protease" é sinônimo de "peptidase", e são utilizados de forma intercambiável aqui. Peptidases compreendem dois grupos de enzimas: as endopeptidases e as exopeptidases. Endopeptidases clivam ligações de peptídeo em pontos dentro de uma proteína, e exopeptidases removem aminoácidos seqüencialmente a partir da extremidade amino ou carbóxi.

O termo "proteinase" também é utilizado como sinônimo para endopeptidase. Proteinases são classificadas de acordo com seus mecanismos catalíticos. Quatro classes mecanistas foram reconhecidas pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology: proteinases de serina, proteinases de cisteína, proteinases aspárticas, e metaloproteinases.

O termo "agonista", como utilizado aqui, pretende se referir a um análogo que retém a bioatividade do substrato nativo de interesse (por exemplo, GLP-1) de modo a produzir um efeito biológico similar quando administrado a um animal.

O termo "antagonista" se refere a um análogo que não retém a bioatividade do substrato nativo de interesse (por exemplo, GLP-1), ou pelo menos em um nível reduzido de atividade relativa ao substrato nativo, e inibe a ação biológica do substrato nativo.

O termo "análogo" se refere a uma molécula substancialmente similar em função a um peptídeo ou proteína nativa ou um fragmento do mesmo.

"Instrução(ões)" como utilizado aqui significa um rótulo de produto e/ou documentos descrevendo materiais relevantes ou metodologias pertinentes ao uso de um kit ou produto farmacêutico embalado. Esses materiais podem incluir qualquer combinação do que se segue: informações antecedentes, lista de componentes, dosagens propostas, alertas em relação a possíveis efeitos colaterais, instruções para administração da droga, suporte técnico e quaisquer outros documentos relacionados.

Uma "quantidade eficaz" de um composto, por exemplo, como um análogo da presente invenção, com relação ao uso no

tratamento, se refere a uma quantidade do análogo em um preparado que, quando administrado como parte de um regime de dosagem desejado (a um mamífero, preferivelmente um ser humano) alivia um sintoma, melhora uma condição, ou diminui o início de condições de doença de acordo com padrões clinicamente aceitáveis para o distúrbio ou condição a ser tratada ou a finalidade cosmética, por exemplo, em uma razão razoável de benefício/risco aplicável em qualquer tratamento médico.

O termo "alquila" se refere a um radical de cadeia de carbono ramificada ou não ramificada, totalmente saturada, tendo o número de átomos de carbono especificado, ou até 30 átomos de carbono se nenhuma especificação for feita. Por exemplo, uma "alquila inferior" se refere a uma alquila tendo de 1 a 10 átomos de carbono, como metila, etila, propila, butila, pentila, hexila, heptila e octila e aqueles que são isômeros posicionais dessas alquinas. Alquila de 10 a 30 átomos de carbono incluem decila, undecila, dodecila, tridecila, tetradecila, pentadecila, hexadecila, heptadecila, octadecila, nonadecila, eicosila, heneicosila, docosila, tricosila e tetracosila. Em modalidades preferidas, uma alquila de cadeia reta ou cadeia ramificada tem 30 ou menos átomos de carbono em sua estrutura (por exemplo, C₁-C₃₀ para cadeias retas, C₃-C₃₀ para cadeias ramificadas), e mais preferivelmente, 20 ou menos. De modo semelhante, cicloalquilas preferidas têm de 3-10 átomos de carbono em sua estrutura de anel, e mais preferivelmente têm 5, 6 ou 7 carbonos na estrutura de anel.

Além disso, o termo "alquila" (ou "alquila inferior")

como utilizado em todo relatório descritivo, exemplos e reivindicações pretende incluir cadeias de alquila tanto não substituídas como substituídas, as últimas se referem a frações de alquila tendo substituintes substituindo um hidrogênio em um ou mais carbonos da estrutura de hidrocarboneto. Tais substituintes podem incluir, por exemplo, um halogênio, uma hidroxila, uma carbonila (como uma carboxila, um alcóxi carbonila, formila ou acila), um tiocarbonila (como tioéster, tioacetato ou tioformato), um 10 alcoxila, fosforila, fosfato, fosfonato, fosfinato, amino, amido, amidina, ciano, nitro, sulfidrila, alquiltio, sulfato, sulfonato, sulfamoíla, sulfonamido, sulfonila, heterociclica, aralquila, ou uma fração aromática ou heteroaromática. Será entendido por aqueles versados na 15 técnica que as frações substituídas na cadeia de hidrocarboneto podem elas próprias ser substituídas, se apropriado. Por exemplo, os substituintes de uma alquila substituída podem incluir formas substituídas ou não substituídas de amino, azido, imino, amido, fosforila (incluindo fosfonato e fosfinato), sulfonila (incluindo sulfonato, sulfonamido, sulfamoíla e sulfonato) e grupos silila, bem como éteres, alquiltios, carbonilas (incluindo cetonas, aldeídos, carboxilatos e ésteres), $-CF_3$, $-CN$ e similares. Alquilas exemplares substituídas são descritas 20 25 abaixo. Cicloalquilas podem ser adicionalmente substituídas com alquilas, alquenila, alcoxilas, alquiltios, aminoalquilas, alquilas substituídas por carbonila, $-CF_3$, $-CN$ e similares.

A menos que o número de carbonos seja de outro modo 30 especificado, "alquila inferior", como utilizado aqui,

significa um grupo de alquila, como definido acima, porém tendo de um a dez carbonos, mais preferivelmente de um a seis átomos de carbono em sua estrutura como metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila, e 5 terc-butila. De modo semelhante, "alquenila inferior" e "alquinila inferior" têm comprimentos de cadeia similares. Em todo pedido, grupos de alquila preferidos são alquilas inferiores. Em modalidades preferidas, um substituinte designado aqui como alquila é uma alquila inferior.

10 Um "grupo de heteroalquila" é um grupo de alquila onde um ou mais dos átomos de carbono internos (isto é, não terminal) é substituído por um heteroátomo, como nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, selênio ou silício. Tipicamente, o heteroátomo é nitrogênio, oxigênio ou 15 enxofre. Um "grupo heterocicloalquila" é o grupo de alquila cílico análogo onde um átomo de carbono é substituído por um heteroátomo.

20 O termo "carbociclo", como utilizado aqui, se refere a um anel aromático ou não aromático no qual cada átomo do anel é carbono.

O termo "arila" como utilizado aqui inclui grupos aromáticos de anel único com 5, 6 e 7 membros que podem incluir de zero a quatro heteroátomos, por exemplo, benzeno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, 25 triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina e pirimidina, e similares. Aqueles grupos de arila tendo heteroátomos na estrutura de anel também podem ser mencionados como "heterociclos de arila" ou "heteroaromáticos". O anel aromático pode ser substituído 30 em uma ou mais posições de anel com tais substituintes como

descrito acima, por exemplo, halogênio, azida, alquila, aralquila, alquenila, alquinila, cicloalquila, hidroxila, alcoxila, amino, nitro, sulfidrila, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonila, carboxila, silila, éter, 5 alquiltio, sulfonila, sulfonamido, cetona, aldeído, éster, heterociclila, frações aromáticas ou heteroaromáticas, -CF₃, -CN ou similares. O termo "arila" também inclui sistemas de anel policíclico tendo dois ou mais anéis cílicos nos quais dois ou mais carbonos são comuns a dois 10 anéis contíguos (os anéis são "anéis fundidos") onde pelo menos um dos anéis é aromático, por exemplo, os outros anéis cílicos podem ser cicloalquila, cicloalquenilas, cicloalquinilas, arilas e/ou heterociclicas.

"Alquenila" se refere a qualquer radical de cadeia de 15 carbono insaturado ramificada ou não ramificada tendo o número de átomos de carbono especificado, ou até 26 átomos de carbono se nenhuma limitação no número de átomos de carbono for especificado; e tendo 1 ou mais ligações duplas no radical. Alquenila de 6 a 26 átomos de carbono é exemplificado por hexenila, heptenila, octenila, nonenila, 20 decenila, undecenila, dodenila, tridecenila, tetradecenila, pentadecenila, hexadecenila, heptadecenila, octadecenila, nonadecenila, eicosenila, heneicosenila, docosenila, tricosenila e tetracosenila, em suas várias formas 25 isoméricas, onde a(s) ligação(ões) insaturada(s) podem ser localizadas em qualquer lugar no radical e podem ter a configuração (Z) ou (E) em torno da(s) ligação(ões) dupla(s).

O termo "alquinila" se refere a radicais de 30 hidrocarbila do escopo de alquenila, porém tendo 1 ou mais

ligações triplas no radical.

Os termos "alcoxila" ou "alcóxi", como utilizado aqui, se refere a um grupo de alquila, como definido abaixo, tendo um radical de oxigênio ligado ao mesmo. Grupos de 5 alcoxila representativos incluem metóxi, etóxi, propóxi, terc-butóxi e similares. Um "éter" são dois hidrocarbonetos covalentemente ligados por um oxigênio. Por conseguinte, o substituinte de uma alquila que fornece aquela alquila um éter é ou se parece com uma alcoxila, como pode ser 10 representado por um entre -O-alquila, -O-alquenila, -O-alquinila, -O-(CH₂)_m-R₁, onde m e R₁ são descritos abaixo.

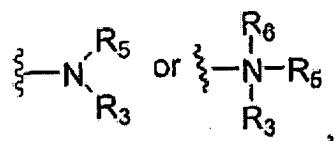
Os termos "heterociclila" ou "grupo heterocíclico" se referem a estruturas de anel de 3 a 10 membros, mais preferivelmente anéis com 3 a 7 membros, cujas estruturas 15 de anel incluem um a quatro heteroátomos. Heterociclos podem ser também policiclos. Grupos de heterociclila incluem, por exemplo, tiofeno, tianreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatiina, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, 20 pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenazsazina, 25 fenotiazina, furazan, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas como azetidinonas e pirrolidinonas, sultams, sultonas, e similares. O anel heterocíclico pode ser substituído em uma ou mais posições com tais 30 substituintes como descrito acima, como por exemplo,

halogênio, alquila, aralquila, alquenila, alquinila, cicloalquila, hidroxila, amino, nitro, sulfidrila, imino, amido, fosfato, fosfonato, fosfinato, carbonila, carboxila, silila, sulfamoíla, sulfinila, éter, alquiltio, sulfonila, 5 cetona, aldeído, éster, um heterociclila, uma fração aromática ou heteroaromática, $-CF_3$, $-CN$ ou similar.

O termo "alquiltio" se refere a um grupo de alquila, como definido acima, tendo um radical de enxofre ligado ao mesmo. Em modalidades preferidas, a fração de "alquiltio" é 10 representada por um entre $-(S)$ -alquila, $-(S)$ -alquenila, $-(S)$ -alquinila e $-(S)-(CH_2)_m-R_1$, onde m e R_1 são definidos abaixo. Grupos de alquiltio representativos incluem metiltio, etiltio e similares.

Como utilizado aqui, o termo "nitro" significa $-NO_2$; o 15 termo "halogênio" designa $-F$, $-Cl$, $-Br$ ou $-I$; o termo "sulfidrila" ou "tiol" significa $-SH$; o termo "hidroxila" significa $-OH$; e o termo "sulfonila" significa $-SO_2^-$.

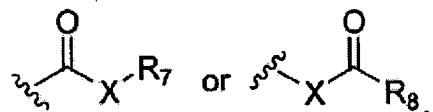
Os termos "amina" e "amino" são reconhecidos na 20 técnica e se referem a aminas tanto não substituídas como substituídas, por exemplo, uma fração que pode ser representada pelas fórmulas gerais:



25 Em que R_3 , R_5 e R_6 representam cada um independentemente um hidrogênio, uma alquila, alquenila, $-(CH_2)_m-R_1$, ou R_3 e R_5 tomados juntamente com o átomo N ao qual são ligados completam um heterociclo tendo de 4 a 8 átomos na estrutura de anel; R_1 representa uma alquenila, 30 arila, cicloalquila, cicloalquenila, heterociclila ou

policiclica; e m é zero ou um número inteiro na faixa de 1 a 8. Em modalidades preferidas, somente um entre R_3 ou R_5 pode ser um carbonila, por exemplo, R_3 , R_5 e o nitrogênio juntos não formam uma imida. Em modalidades mais preferidas, R_3 e R_5 (e opcionalmente R_6) representam cada um independentemente um hidrogênio, uma alquila, alquenila ou $-(CH_2)_m-R_1$. Desse modo, o termo "alquil amina" como utilizado aqui, significa um grupo amina, como definido acima, tendo uma alquila substituída ou não substituída ligada ao mesmo, isto é, pelo menos um entre R_3 e R_5 é um grupo alquila. Em certas modalidades, um grupo amino ou uma alquil amina é básica, significando que tem um $pK_a \geq 7.00$. As formas protonadas desses grupos funcionais têm pK_a s relativos à água acima de 7.00.

O termo "carbonila" é reconhecido na técnica e inclui tais frações como podem ser representadas pela fórmula geral:



Onde X é uma ligação ou representa um oxigênio ou enxofre, e R_7 representa um hidrogênio, uma alquila, uma alquenila, $-(CH_2)_m-R_1$ ou um sal farmaceuticamente aceitável, R_8 representa um hidrogênio, alquila, alquenila, ou $-(CH_2)_m-R_1$ onde m e R_1 são como definido acima. Onde X é um oxigênio e R_7 ou R_8 não é hidrogênio, a fórmula representa um "éster". Onde X é um oxigênio, e R_7 é como definido acima, a fração é mencionada aqui como um grupo carboxila, e particularmente quando R_7 é hidrogênio, a fórmula representa um "ácido carboxílico." Onde X é um oxigênio, e

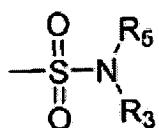
R_8 é hidrogênio, a fórmula representa um "formato". Em geral, onde o átomo de oxigênio da fórmula acima é substituído por enxofre, a fórmula representa um grupo "tiocarbonila". Onde X é um enxofre e R_7 ou R_8 não é hidrogênio, a fórmula representa um grupo "tioéster". Onde X é um enxofre e R_7 é hidrogênio, a fórmula representa um grupo de "ácido tiocarboxílico". Onde X é um enxofre e R_8 é hidrogênio, a fórmula representa um grupo "tioformato". Por outro lado, onde X é uma ligação, e R_7 não é hidrogênio, a fórmula acima representa um grupo "acila". Onde X é uma ligação, e R_7 é hidrogênio, a fórmula acima representa um grupo de "aldeído".

Como utilizado aqui, o termo "substituído" é considerado como incluindo todos os substituintes permissíveis de compostos orgânicos. Em um aspecto amplo, os substituintes permissíveis incluem substituintes de compostos orgânicos acílico e cílico, ramificado e não ramificado, carbocíclico e heterocíclico, aromático e não aromático. Substituintes ilustrativos incluem, por exemplo, aqueles descritos acima. Os substituintes permissíveis podem ser um ou mais e iguais ou diferentes para compostos orgânicos apropriados. Para fins da presente invenção, os heteroátomos como nitrogênio podem ter substituintes de hidrogênio e/ou quaisquer substituintes permissíveis de compostos orgânicos descritos aqui que satisfazem as valências dos heteroátomos. A presente invenção não pretende ser limitada de modo algum pelos substituintes permissíveis de compostos orgânicos. Será entendido que "substituição" ou "substituído com" inclui a condição implícita de que tal substituição está de acordo com

valência permitida do átomo substituído e substituinte, e que a substituição resulta em um composto estável, por exemplo, que não é submetida espontaneamente à transformação como por rearranjo, ciclização, eliminação,

5 etc.

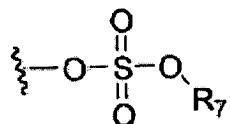
O termo "sulfamoíla" é reconhecido na técnica e inclui uma fração que pode ser representada pela fórmula geral:



10

em que R_3 e R_5 são como definidos acima.

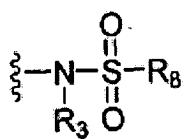
O termo "sulfato" é reconhecido na técnica e inclui uma fração que pode ser representada pela fórmula geral



15

na qual R_7 é como definido acima.

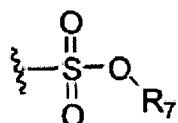
O termo "sulfonamido" é reconhecido na técnica e inclui uma fração que pode ser representada pela fórmula geral:



20

na qual R_2 e R_4 são como definidos acima.

O termo "sulfonato" é reconhecido na técnica e inclui uma fração que pode ser representada pela fórmula geral:



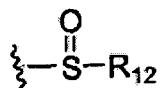
30

na qual R_7 é um par de elétrons, hidrogênio, alquila,

cicloalquila ou arila.

Os termos "sulfóxido" ou "sulfinila", como utilizado aqui, se referem a uma fração que pode ser representada pela fórmula geral:

5



na qual R_{12} é selecionado entre hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, cicloalquila, heterociclica, aralquila ou arila.

10 Substituições análogas podem ser feitas em grupos de alquenila e alquinila para produzir, por exemplo, aminoalquenilas, aminoalquinilas, amidoalquenilas, amidoalquinilas, iminoalquenilas, iminoalquinilas, tioalquenilas, tioalquinilas, alquenilas substituídas por 15 carbonila ou alquinilas.

Como utilizado aqui, a definição de cada expressão, por exemplo, alquila, m, n, etc., quando ocorre mais de uma vez em qualquer estrutura, pretende ser independente de sua definição em outro lugar na mesma estrutura.

20 Para fins dessa invenção, os elementos químicos são identificados de acordo com a Tabela Periódica dos Elementos, versão CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 67^a ed., 1986-87, capa interna. Também para fins da presente invenção, o termo "hidrocarboneto" é considerado 25 como incluindo todos os compostos permissíveis tendo pelo menos um hidrogênio e um átomo de carbono. Em um aspecto amplo, os hidrocarbonetos permissíveis incluem compostos orgânicos acíclicos e cíclicos, ramificados e não ramificados, carbocíclicos e heterocíclicos, aromáticos e 30 não aromáticos que podem ser substituídos ou não

substituídos.

III. Modalidades exemplares

(a) Características de análogos

Em muitas modalidades, o análogo será selecionado para reter um ou mais da atividade *in vitro* ou *in vivo* do substrato nativo. As atividades *in vitro* e *in vivo* podem ser medidas utilizando qualquer protocolo disponível a uma pessoa com conhecimentos comuns que seja apropriado para o análogo específico. Atividades funcionais exemplares que podem ser medidas para determinar se um análogo mantém atividade funcional igual ou similar incluem capacidade do análogo de ligar seu(s) receptor(es) em um ensaio baseado em célula ou livre de células, capacidade do análogo em induzir uma alteração (por exemplo, proliferação, diferenciação, sobrevivência, crescimento, migração, etc.) em uma célula responsiva a GLP-1, capacidade do análogo de modular a expressão de um ou mais outros genes ou proteínas em uma célula responsiva a GLP-1.

Em certas modalidades, o análogo tem atividade substancialmente similar como GLP-1 nativo ou um fragmento do mesmo (por exemplo, aproximadamente 80%, 90%, 100%, 110%, ou 120% tão ativo quanto o GLP-1 nativo). Em algumas modalidades, o análogo é menos ativo do que o GLP-1 nativo (por exemplo, aproximadamente 50%, 60%, 70% ou 75% tão ativo quanto o polipeptídeo nativo). Observa-se que um análogo que é de certo modo menos ativo pode ser útil, como *in vivo* ou em cultura de células, se a redução em atividade ainda prover a capacidade de fornecer uma concentração local suficiente de análogo por um período de tempo suficiente. Desse modo, um aumento em meia-vida obtido, por

exemplo, por resistência a proteinase poderia compensar a diminuição em atividade causada pela construção do análogo. Ainda em outra modalidade, o análogo é mais ativo do que GLP-1 nativo (por exemplo, aproximadamente 130%, 150%, 5 175%, 200%, 300%, 500%, 800% ou mesmo 1000% tão ativo quanto GLP-1 nativo). Em qualquer um dos acima, por "atividade" quer se dizer uma ou mais funções de GLP-1 nativo. Por exemplo, uma atividade (por exemplo, uma função biológica) de um análogo pode ser ligação por receptor, 10 capacidade de atuar como um ativador ou repressor de transcrição, capacidade de participar em uma via de transdução de sinal específica, ou a capacidade de influenciar o comportamento de células (por exemplo, proliferação, diferenciação, sobrevivência ou migração).

15 Tais atividades podem ser expressas, por exemplo, como constante de ligação relativa (como para a ligação por receptor), concentrações eficazes (EC_{50}) e/ou doses eficazes (ED_{50}).

Análogos exemplares têm uma meia-vida aumentada (ou 20 duração de ação) em comparação com GLP-1 nativo (in vitro e/ou in vivo). Entretanto, será genericamente reconhecido que vários análogos terão meias-vidas diferentes (bem como uma mudança diferente em meia-vida em comparação com GLP-1 nativo). A meia-vida in vitro e/ou in vivo (ou duração de 25 ação) pode ser facilmente medida por uma pessoa versada na técnica utilizando métodos padrão, por exemplo, o curso de tempo de efeitos de redução de glicose. Em certas modalidades, o análogo tem uma meia-vida in vitro ou in vivo (duração de ação) que é aproximadamente um fator de 30 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,3,

1,5,2, 3, 5, 10, 25, 30, 50, 75, 100 ou ainda maior do que 100 vezes a meia-vida in vitro e/ou in vivo do polipeptídeo nativo sob condições similares de ensaio de medição de meia-vida.

5 b) Síntese de análogos de hormônio de peptídeo

Os análogos da invenção podem ser preparados por síntese de fase sólida padrão; vide, por exemplo, Stewart, J.M., e outros, Solid Phase Synthesis (Pierce Chemical Co., 2^a edição, 1984). Como genericamente sabido, peptídeos do comprimento exigido podem ser preparados utilizando equipamento e reagentes comercialmente disponíveis seguindo as instruções dos fabricantes para bloquear grupos de interferência, proteger o aminoácido a ser reagido, acoplamento, desproteção e cobertura de resíduos não reagidos. Equipamentos apropriados podem ser obtidos, por exemplo, da Applied BioSystems em Foster City, Calif., ou Biosearch Corporation em San Raphael, Calif.

Em um método preferido, os análogos são sintetizados utilizando protocolos de síntese de fase sólida automatizada padrão empregando alfa-aminoácidos t-butóxi carbonila com proteção de cadeia lateral apropriada. O análogo completo é removido do suporte de fase sólida com desproteção de cadeia lateral simultânea utilizando o método de fluoreto de hidrogênio padrão. Análogos brutos são adicionalmente purificados por HPLC-fase reversa semi-preparativo (Vydac C₁₈) utilizando gradientes de acetonitrila em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Os análogos são secos a vácuo para remover acetonitrila e liofilizados de uma solução de TFA a 0,1% em água. A pureza é verificada por RP-HPLC analítico. Os peptídeos podem ser

liofilizados e então solubilizados em água ou ácido acético 0,01 M em concentrações de 1-2 mg/mL em peso.

O uso dos métodos sintéticos acima mencionados é necessário se aminoácidos não codificados ou as formas D de aminoácidos ocorrem nos análogos. Entretanto, para análogos que podem ser codificados em gene pode-se recorrer também a técnicas recombinantes utilizando seqüências de DNA facilmente sintetizadas em sistemas de expressão comercialmente disponíveis.

10 (c) Ensaios funcionais

Uma variedade de métodos para determinar se um análogo candidato é resistente à proteólise são disponíveis na técnica. Por exemplo, a capacidade de uma proteinase específica de clivar um análogo pode ser medida em um sistema isento de células *in vitro*. Em tal modalidade de um sistema de ensaio isento de células, o substrato candidato (por exemplo, um análogo e/ou um polipeptídeo nativo) é rotulado na extremidade com um rótulo detectável como radioatividade. O substrato rotulado é incubado na presença de proteinase. Com o passar do tempo, as amostras da mistura de reação podem ser paradas e passadas em um gel. Um deslocamento no tamanho da faixa radioativa indica que o polipeptídeo é clivado pela proteinase, e a taxa na qual esse deslocamento ocorre indica a taxa na qual o polipeptídeo é clivado pela proteinase. Essa taxa pode ser comparada com aquela observada com o polipeptídeo nativo.

Para ilustrar adicionalmente, um experimento exemplar para testar um análogo específico envolve o que se segue. O polipeptídeo nativo (GLP-1) e o análogo putativo são individualmente rotulados de forma radioativa (observação:

para fins de rotulação, tudo que é necessário é que a clivagem do polipeptídeo produza um fragmento radioativo que difere em tamanho a partir do polipeptídeo rotulado de comprimento total). O polipeptídeo nativo rotulado e 5 análogo é incubado com a proteinase específica. Após incubação, tanto o polipeptídeo nativo como o análogo são separados por eletroforese de gel, e a migração da espécie rotulada é examinada. Uma vez que a proteinase específica é conhecida por clivar o polipeptídeo nativo, seria esperado 10 ver um deslocamento no tamanho do fragmento rotulado do polipeptídeo nativo (antes e após incubação com enzima) com o fragmento menor correspondendo a um produto de clivagem. Entretanto, se o análogo é resistente a proteólise, esse 15 deslocamento em mobilidade após incubação com proteinase não ocorrerá, ou ocorrerá muito mais lentamente do que ocorre para a proteólise da proteína nativa.

A capacidade relativa de uma proteinase clivar um análogo em comparação com um polipeptídeo nativo pode ser determinada também um sistema *in vitro* baseado em células. 20 Em tal ensaio baseado em células, uma célula que expressa uma dada proteinase é contatada com um polipeptídeo nativo ou um análogo de tal modo que o polipeptídeo nativo ou análogo esteja presente na célula. Bem similar ao ensaio 25 isento de células descrito acima, o polipeptídeo nativo e análogo são rotulados de forma detectável. A clivagem do polipeptídeo nativo e análogo pode ser medida e comparada pela extração de proteína a partir das células e medição da migração de proteína rotulada.

Em um exemplo adicional de um ensaio baseado em 30 células, uma célula que não expressa uma dada proteinase é

contatada com um polipeptídeo nativo rotulado de forma detectável ou análogo de tal modo que o polipeptídeo nativo ou análogo seja expresso na célula. A célula é adicionalmente contatada com a proteinase específica de tal modo que a proteinase seja expressa na célula. A clivagem do polipeptídeo nativo e análogo pode ser medida e comparada pela extração de proteína a partir das células e medição da migração de proteína rotulada.

Em qualquer um dos ensaios baseados em célula acima mencionados, a invenção considera o uso de qualquer de um número de células primárias ou linhagens de células. Em alguns casos, pode ser vantajoso selecionar uma célula ou linhagem de célula específica na qual conduzir análise in vitro. Por exemplo, pode ser vantajoso em alguns casos selecionar uma linhagem de célula que seja mais estreitamente relacionada ao tipo de célula no qual se deseja eventualmente utilizar o análogo. Entretanto, em outros casos, pode ser mais útil executar classificação inicial e teste de análogos candidatos em um tipo de célula possivelmente não relacionada ou linhagem de célula selecionada principalmente com base em conveniência, e executar posteriormente teste de eficácia e segurança em linhagens de células mais específicas ou em modelos de animais, conforme necessário.

Além de ensaios baseados em células e isentos de células, a resistência à proteinase de um análogo específico pode ser medida in vivo utilizando qualquer de um número de modelos de animais. O teste inicial da proteólise de um dado análogo pode ser determinado em animais do tipo selvagem. Durante esse teste inicial, os

efeitos positivo ou negativo em potencial do análogo não são a questão, porém em vez disso a questão é se um análogo específico é resistente à proteólise. Após um análogo específico ser mostrado como sendo resistente à proteólise 5 utilizando qualquer um dos ensaios isento de célula, baseado em célula ou in vivo, descritos acima, teste adicional in vitro e in vivo do análogo pode ser conduzido para determinar a eficácia terapêutica do análogo.

Ensaios adicionais podem ser utilizados para avaliar a 10 atividade funcional específica de um análogo. Tais ensaios podem ser selecionados com base no análogo específico. Para os análogos GLP-1 presentes, a atividade funcional do análogo pode ser avaliada medindo-se a capacidade do análogo de ligar seu receptor em um ensaio baseado em 15 células ou isento de células, e comparar esse com a capacidade do hormônio de peptídeo nativo. Em qualquer um desses exemplos, a atividade funcional também pode ser medida em modelos de animais, como aqueles ensaiando níveis de insulina ou glicose de sangue.

20 O exemplo ilustrativo a seguir provê métodos em potencial de avaliar uma atividade funcional de análogos.

I. Ensaios de atividade insulinotrópica

Peptídeos GLP-1 ativos, 7-34, 7-35, 7-36 e 7-37, têm 25 atividade insulinotrópica, e a invenção provê métodos para fazer análogos de peptídeos desses peptídeos GLP-1 ativos. A resistência de análogos de peptídeo de GLP-1 à proteólise pode ser facilmente medida. Adicionalmente, a atividade funcional dos análogos de peptídeo GLP-1 pode ser demonstrada pelo exame das propriedades insulinotrópicas 30 dos análogos de hormônio de peptídeo. A atividade

insulinotrópica pode ser determinada, por exemplo, pela provisão de um dado análogo de peptídeo a células de animais, ou injetando aquele análogo em animais e monitorando a liberação de insulina imunorreativa (IRI) no meio ou sistema circulatório do animal, respectivamente. A 5 presença de IRI pode ser detectada através do uso de um radioimunoensaio que pode detectar especificamente insulina.

O camundongo db/db é uma cepa de camundongo 10 geneticamente obesa e diabética. Os camundongos db/db desenvolvem hiperglicemia e hiperinsulinemia concomitante com seu desenvolvimento de obesidade e desse modo servem como modelo de diabetes tipo 2 obeso (NIDDM). Os camundongos db/db podem ser adquiridos, por exemplo, de The 15 Jackson laboratories (Bar Harbor, Me). Em uma modalidade exemplar, para tratamento dos camundongos com um regime incluindo um análogo de hormônio de peptídeo ou controle, amostras de sangue sinus sub-orbital são tiradas antes e algum tempo (por exemplo, 60 minutos) após dosagem de cada 20 animal. Medições de glicose de sangue podem ser feitas por qualquer uma de várias técnicas convencionais, como utilizando um medidor de glicose. Os níveis de glicose no sangue de animais dosados com análogo de hormônio de peptídeo e controle são comparados.

25 O destino metabólico de análogo GLP-1 exógeno pode ser seguido também em sujeitos não diabéticos ou diabéticos do tipo II, e o efeito de um análogo candidato determinado. Por exemplo, uma combinação de cromatografia líquida de pressão elevada (HPLC), radioimunoensaios específicos 30 (RIAs), e um ensaio imunossorvente ligado por enzima

(ELISA), pode ser utilizada, pelo que GLP-1 biologicamente ativo intacto e seus metabólitos podem ser detectados. Vide, por exemplo, Deacon e outros (1995) Diabetes 44:1126-1131. Para ilustrar, após administração de análogo de GLP-1, o peptídeo intacto pode ser medido utilizando um ELISA ou RIA orientado terminalmente NH₂, enquanto a diferença em concentração entre esses ensaios e um RIA específico de terminal COOH permitiu determinação de metabólitos truncados terminalmente-NH₂. Sem o análogo, GLP-1 subcutâneo é rapidamente degradado em um modo dependente de tempo, formando um metabólito que co-elui em HPLC com GLP-1-(9-36) amida e tem o mesmo perfil imunorreativo. Por exemplo, trinta minutos após administração de GLP-1 subcutânea a pacientes diabéticos (n=8), o metabólito respondeu por 88,5 + 1,9% do aumento em imunorreatividade de plasma determinada pelo RIA de terminal-COOH, que era mais elevado do que os níveis medidos em sujeitos saudáveis (78,4 + 3,2%; n = 8; P < 0,05). Vide Deacon e outros, supra, GLP-1 infundido por via intravenosa também foi extensamente degradado.

Outros métodos de medir atividades insulinotrópicas de análogos de GLP-1 são reveladas na patente US no. 5.545.618.

(d) Preparados farmacêuticos

Para uso terapêutico, o análogo escolhido é formulado com um veículo que é farmaceuticamente aceitável e é apropriado para administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do análogo em um sujeito utilizando uma dosagem adaptada para uma via de administração escolhida, isto é, oral, intravenosa, ou parenteral, de modo a fornecer o

peptídeo ao tecido desejado. Em certas modalidades, os análogos são não pirogênicos, isto é, não desencadeiam elevação da temperatura corporal de um paciente em mais de uma quantidade clinicamente aceitável. Veículos 5 farmaceuticamente aceitáveis apropriados são aqueles utilizados convencionalmente com drogas à base de peptídeo, como diluentes, excipientes e similares. Pode-se fazer referência a "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa, 1985, para 10 orientação sobre formulações de drogas em geral. Em uma modalidade da invenção, os compostos são formulados para administração por infusão, por exemplo, quando utilizados como suplementos nutricionais líquidos para pacientes em terapia de nutrição parenteral total, ou por injeção, por 15 exemplo, por via subcutânea, intramuscular ou intravenosa, e são por conseguinte utilizados como soluções aquosas em forma isenta de pirogênio e estéril e opcionalmente tamponadas até pH fisiologicamente tolerável, por exemplo, um pH fisiológico ou levemente acídico. Desse modo, os 20 compostos podem ser administrados em um veículo como água destilada ou mais desejavelmente, em solução salina, solução salina tamponada com fosfato ou solução de dextrose a 5%. A solubilidade de água de um análogo pode ser aumentada, se desejado, pela incorporação de um 25 intensificador de solubilidade, como ácido acético ou hidróxido de sódio.

Os análogos da presente invenção podem ser fornecidos na forma de sais farmaceuticamente aceitáveis. Os exemplos de tais sais incluem, porém não são limitados a, aqueles 30 formados com ácidos orgânicos (por exemplo, ácido acético,

láctico, malélico, cítrico, mágico, ascórbico, succínico, benzóico, metanossulfônico ou toluenossulfônico), ácidos inorgânicos (por exemplo, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ou ácido fosfórico), e ácidos poliméricos (por exemplo, ácido tântico, carboxi metil celulose, polilático, poliglicólico, ou copolímeros de ácidos poliláctico-glicólico).

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um análogo da presente invenção e uma substância de veículo farmaceuticamente aceitável (por exemplo, carbonato de magnésio, lactose ou um fosfolipídeo com o qual o análogo terapêutico pode formar uma micela) juntas formam uma composição terapêutica (por exemplo, uma pílula, tablete, cápsula ou líquido) para administração (por exemplo, por via oral, intravenosa, transdérmica, pulmonar, vaginal, subcutâneo, nasal, iontoforético, intratecal, intracranial, intramiocardial, intrapercardial, intramuscular) a um sujeito. Uma pílula, tablete, ou cápsula que deve ser administrada por via oral pode ser revestida com uma substância para proteger a composição ativa a partir do ácido gástrico ou enzimas intestinais no estômago por um período de tempo suficiente para permitir que a mesma passe não digerida para dentro do intestino delgado. A composição terapêutica também pode estar na forma de uma formulação de liberação contínua biodegradável ou não biodegradável para administração subcutânea ou intramuscular. Vide, por exemplo, as patentes US nos. 3.773.919 e 4.767.628 e publicação PCT no. WO 94/15587. A administração contínua também pode ser obtida utilizando uma bomba implantável ou externa (por exemplo, bomba INFUSAID™). A administração

também pode ser conduzida de forma intermitente, por exemplo, injeção diária única, ou continuamente em uma dose baixa, por exemplo, formulação de liberação contínua.

5 Composições terapêuticas ou de diagnóstico da invenção são administradas em um indivíduo em quantidades suficientes para tratar ou diagnosticar distúrbios. A dose eficaz de um peptídeo da presente invenção para tratar as doenças ou distúrbios acima mencionados varia dependendo do modo de administração, idade e peso corpóreo do sujeito, e 10 a condição do sujeito a ser tratado, e finalmente será decidido pelo médico atendente ou veterinário.

Também é considerado compreendido no escopo da presente invenção um peptídeo abrangido pela fórmula genérica acima para uso no tratamento de doenças ou 15 distúrbios associados a metabolismo de glicose aberrante, metabolismo de lipídeo ou distúrbio alimentar.

Outras características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada e a partir das reivindicações.

20 (e) Métodos de uso

1. Usos de diagnóstico

Os análogos da invenção podem ser utilizados em forma radiorrotulada ou não rotulada para diagnosticar ou tratar uma variedade de estados de doença incluindo, porém, não 25 limitado àqueles associados a metabolismo de glicose, metabolismo de lipídeo e ingestão de alimentos.

Preferivelmente, complexos radiorrotulados dos compostos da invenção são utilizados para tais diagnósticos e tratamentos. Modalidades radiorrotuladas, dos compostos 30 da invenção podem ser utilizadas em cirurgia guiada por

radioisótopo, como descrito em WO 93/18797 e em Woltering, e outros (1994) *Surgery* 116, 1139-1147. Em uma modalidade preferida, um complexo de um radionuclide de emissão gama como ^{99}Tc e um composto da invenção são utilizados para 5 diagnosticar um tumor que expressa SSTR, e subsequentemente um complexo de radionuclide de emissão de β como ^{188}Re ou ^{186}Re com o composto é utilizado para tratar o tumor.

Para fins de diagnóstico, uma quantidade de diagnóstico eficaz do agente de diagnóstico ou 10 radiodiagnóstico da invenção é administrada, preferivelmente por via intravenosa. Uma quantidade de diagnóstico eficaz é definida como a quantidade de agente de diagnóstico ou radiodiagnóstico necessária para efetuar a localização e detecção do rótulo *in vivo* utilizando 15 metodologias convencionais como a ressonância magnética, tomografia computadorizada, cintigrafia gama, SPECT, PET e similares.

Para diagnóstico utilizando imageamento cintigráfico, preferivelmente, compostos rotulados ^{99}Tc da invenção são 20 administrados em uma dose injetável de unidade única. Os compostos rotulados ^{99}Tc fornecidos pela invenção podem ser administrados por via intravenosa em qualquer meio convencional para injeção intravenosa como um meio de solução salina aquosa, ou em meio de plasma de sangue. 25 Genericamente, a dose unitária a ser administrada tem uma radioatividade de aproximadamente 0,01 mCi a aproximadamente 100 mCi, preferivelmente 1 mCi a 50 mCi. A Solução a ser injetada em dosagem unitária é de aproximadamente 0,01 mL a aproximadamente 10 mL. Após 30 administração intravenosa, imageamento *in vivo* pode ocorrer

em uma questão de alguns minutos. Entretanto, o imageamento pode ocorrer, se desejado, horas ou mesmo mais tempo após o composto radiorrotulado ser injetado em um paciente. Na maioria dos casos, uma quantidade suficiente da dose 5 administrada acumulará na área a ser imageada em aproximadamente 0,1 de uma hora para permitir tirar cintifotos. Qualquer método convencional de imageamento cintigráfico para fins de diagnóstico pode ser utilizado de acordo com a presente invenção.

10 2. Métodos de tratamento

Os análogos da invenção fornecem métodos aperfeiçoados de tratar qualquer doença ou condição que possa ser tratada com uma dada composição terapêutica, onde o polipeptídeo de "origem" é normalmente clivado in vivo por uma proteinase. 15 Dado que proteólise diminui ou elimina a disponibilidade da terapêutica, e em alguns casos leva à produção de produtos funcionalmente antagonistas, a segurança e eficácia de muitas terapias de polipeptídeo que podem ser utilizados para tratar doenças e condições específicas é grandemente 20 comprometida. Por conseguinte, os métodos e composições de análogos da invenção fornecem métodos aperfeiçoados de tratar qualquer de um número de diversas doenças e condições.

Os análogos da invenção possuem, em certas 25 modalidades, a capacidade de diminuir níveis de glicose no sangue, aliviar a obesidade, aliviar a tolerância prejudica à glicose, inibir neogênese de glicose hepática, e diminuir os níveis de lipídeo de sangue (por exemplo, ácidos graxos livres) e inibir reductase aldose. Os análogos da invenção, 30 em certas modalidades, também são capazes de aumentar

proliferação de ilha e neogênese, aumentar secreção de insulina dependente de glicose, aumentar biossíntese de insulina, diminuir secreção de glucagon, retardar esvaziamento gástrico, diminuir ingestão de alimento e/ou 5 apetite, aumentar a função cardíaca (por exemplo, fração de ejeção de ventrículo esquerdo), aumentar o batimento cardíaco, aumentar a pressão sanguínea sistólica, diminuir resistência vascular (pressão sangue diastólica), aumentar o fluxo periférico de sangue, aumentar a excreção de sódio 10 em pacientes hipertrêmicos (por exemplo, diminuir hipertensão dependente de Na), diminuir a lesão de reperfusão/isquemia (por exemplo, reduzir tamanho de infarto após um infarto de miocárdio), diminuir a neurotoxicidade (por exemplo, neurotoxicidade associada a 15 glutamato ou excitotoxicidade de cainato), diminuir a apoptose (por exemplo, em neurônios), diminuir a prevalência de proteínas beta-amilóide e aumentar aprendizado espacial e/ou associativo. São desse modo úteis para, entre outras coisas, a prevenção e/ou terapia de 20 hiperglicemia, obesidade, hiperlipidemia, complicações diabéticas (incluindo retinopatia, nefropatia, neuropatia, catarata, doença de artéria coronária e arteriosclerose), doença cardíaca, infartos miocárdiais, distúrbios circulatórios, doença neurodegenerativa (por exemplo, 25 doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica) e adicionalmente para osteoporose e hipertensão relacionada à obesidade. Desse modo, um aspecto da presente invenção é um método para tratar uma doença em um paciente ou sujeito compreendendo administrar uma 30 quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais análogos

de GLP-1 revelados aqui.

Os análogos de peptídeos de GLP-1 são particularmente úteis quando administrados a um paciente que sofre de diabetes mellitus, incluindo diabetes mellitus tipo I e tipo II, porém especialmente tipo II. Diabetes mellitus é uma doença caracterizada por hiperglicemia ocorrendo a partir de uma diminuição relativa ou absoluta em secreção de insulina, resistência à insulina ou sensibilidade diminuída à insulina. A morbidez e mortalidade dessa doença resultam de complicações vascular, renal, e neurológica. Um teste oral de tolerância a glicose é um teste clínico utilizado para diagnosticar diabetes. Em um teste oral de tolerância a glicose, a resposta fisiológica de um paciente a uma carga ou desafio de glicose é avaliada. Após ingerir a glicose, a resposta fisiológica do paciente ao desafio de glicose é avaliada. Genericamente, isso é realizado por determinar os níveis de glicose no sangue do paciente (a concentração de glicose no plasma, soro ou sangue integral do paciente) para vários pontos predeterminados em tempo.

Desse modo, em um aspecto, a presente invenção refere-se a usos terapêuticos e relacionados de análogos de GLP-1 resistentes a proteólise para tratar hiperglicemia, obesidade, hiperlipidemia, complicações diabéticas (incluindo retinopatia, nefropatia, neuropatia, catarata, doença de artéria coronária e arteriosclerose) e, além disso para osteoporose e hipertensão relacionada à obesidade.

A invenção considera o uso de análogos em métodos de tratamento em que o análogo sozinho constitui o regime terapêutico, bem como métodos de tratamento que utilizam

administração de um ou mais análogos como parte de um regime terapêutico multi-fatorial mais complexo. Por exemplo, no caso de métodos de tratar diabetes e/ou complicações de diabetes, a presente invenção considera 5 métodos de tratar diabetes pela administração de um análogo de GLP-1. A presente invenção considera ainda que, em algumas circunstâncias pode ser preferível administrar mais de um análogo. Por exemplo, o método de tratamento pode compreender a administração de dois ou mais análogos. Além 10 disso, a invenção considera que a administração de um ou mais análogos pode ser utilizada como parte de um regime terapêutico complexo. No caso de um método de tratar diabetes ou complicações de diabetes, um regime terapêutico exemplar pode incluir administração de um ou mais análogos, 15 administração de insulina, modulação de dieta, e modulação de exercício.

Ainda em um exemplo adicional de um regime terapêutico multifacetado, a invenção considera a administração de um ou mais análogos e um ou mais agentes que inibem a 20 atividade enzimática da enzima específica que cliva endogenamente a proteína nativa. No caso de GLP-1, um método exemplar compreenderia a administração de um ou mais análogos com um ou mais inibidores de DDP IV. Os inibidores de uma enzima específica podem ser específicos (por 25 exemplo, um inibidor que modula somente a atividade de DPP IV) ou o inibidor pode ser mais promíscuo (por exemplo, um inibidor que modula a atividade de múltiplas proteases de serina). Adicionalmente, a invenção considera a administração de um ou mais análogos e uma ou mais enzimas 30 que degradam a enzima específica que cliva endogenamente a

proteína nativa. No caso de GLP-1, um método exemplar compreenderia a administração de um ou mais análogos de peptídeo com uma ou mais enzimas que degradam DPP IV. Tais enzimas podem ser específicas (por exemplo, uma enzima que degrada somente DPP IV) ou a enzima pode degradar múltiplas outras proteínas (por exemplo, uma enzima que degrada várias proteases de serina).
5

(f) Métodos comerciais

Outros aspectos da invenção fornecem certos métodos de fazer negócios. Em particular, pôr em prática os métodos da invenção pode identificar certos análogos de GLP-1. Essa etapa técnica, quando combinada com uma ou mais etapas adicionais, provê abordagens novas para conduzir um negócio farmacêutico, agroquímico, biotecnológico ou preferivelmente de ciência da vida. Por exemplo, análogos de acordo com a presente invenção podem ser testados quanto à eficácia como terapêuticos em uma variedade de modelos de doença, e as composições terapêuticas em potencial podem ser então testadas quanto à toxicidade e outro perfil de 15 segurança antes de formular, embalar e subseqüentemente comercializar a formulação resultante para o tratamento de doença. Alternativamente, os direitos de desenvolver e comercializar essas formulações ou conduzir essas etapas podem ser licenciados para um terceiro para consideração. 20 Em certos outros aspectos da invenção, os análogos desse modo identificados podem ter utilidade na forma de informação que pode ser fornecida a um terceiro para consideração de tal modo que uma compreensão aperfeiçoada da função ou efeitos colaterais dos referidos análogos em 25 um contexto biológico ou terapêutico é obtido.

Em certas modalidades, o análogo inicialmente identificado pode ser submetido à otimização adicional, por exemplo, para refinar ainda mais a estrutura de um análogo principal. Tal otimização pode levar ao desenvolvimento de 5 análogos que combinam duração máxima de ação com outras características farmacológicas desejáveis incluindo: solubilidade, permeabilidade, biodisponibilidade, toxicidade, mutagenicidade, e farmacocinética.

Modificações estruturais são tipicamente feitas em um 10 análogo principal para tratar de questões com os parâmetros listados acima. Essas modificações, entretanto, devem levar em conta possíveis efeitos colaterais na potência e atividade do análogo. Por exemplo, se a toxicidade de um análogo principal é elevada quando testada em um modelo 15 animal, modificações podem ser feitas no análogo em um esforço para diminuir a toxicidade enquanto mantém as características desejadas.

Análogos candidatos (quer os análogos sejam ou não modificados para alterar para aperfeiçoar as 20 características *in vivo*) ou combinações dos mesmos devem ser testados em relação à eficácia e toxicidade em modelos de animais. Tal perfil terapêutico é comumente empregado na técnica farmacêutica. Antes de testar uma terapêutica experimental em seres humanos, perfil terapêutico extenso 25 (teste pré-clínico) deve ser concluído para estabelecer parâmetros iniciais para segurança e eficácia. Teste pré-clínico estabelece um mecanismo de ação para a terapêutica, sua biodisponibilidade, absorção, distribuição, metabolismo, e eliminação através de estudos executados *in vitro* (isto 30 é, em tubos de ensaio, bêqueres, pratos petri, etc.) e em

animais. Os estudos em animais são utilizados para avaliar se a terapêutica fornecerá os resultados desejados. Doses variáveis da terapêutica experimental são administradas para testar a eficácia da terapêutica, identificar efeitos 5 colaterais prejudiciais que podem ocorrer, e avaliar toxicidade.

Resumidamente, uma pessoa versada na técnica reconhecerá que a identificação de um análogo candidato é uma primeira etapa no desenvolvimento de um preparado 10 farmacêutico útil para administração. A administração de uma quantidade de um preparado farmacêutico compreendendo o análogo eficaz para tratar uma condição ou doença deve ser tanto segura quanto eficaz. Experimentos de droga em estágio inicial, rotineiramente utilizados na técnica, 15 ajudam a tratar de preocupações da segurança e eficácia de um produto farmacêutico em potencial. No caso específico de um análogo, a eficácia do preparado farmacêutico poderia ser facilmente avaliada primeiramente em cultura de célula, e então em um modelo de camundongo o rato. Sistemas de 20 cultura de célula e modelos de animais apropriados para a indicação específica de doença para a qual um análogo dado será utilizado podem ser facilmente selecionados por uma pessoa versada na técnica. Resumidamente, camundongos ou ratos poderiam receber administração de doses variáveis dos 25 preparados farmacêuticos durante vários programas de tempo. A via de administração seria apropriadamente selecionada com base nas características específicas do agente e no tipo de célula à qual se deseja o fornecimento do análogo. Camundongos de controle podem receber a administração de um 30 placebo (por exemplo, veículo ou excipiente sozinho).

Em uma modalidade, a etapa de perfil terapêutico inclui teste de toxicidade de análogos em culturas de célula e em animais; análise de farmacocinética e metabolismo do análogo candidato; e determinação de eficácia em modelos de animais, de doenças. Em certos casos, o método pode incluir analisar a relação estrutura-atividade e otimizar análogos principais com base em perfis de eficácia, segurança e farmacocinética. O objetivo dessas etapas é a seleção de candidatos análogos para estudos pré-clínicos para levar arquivamento de pedidos de Nova droga em Investigação ("IND") junto ao FDA antes de experimentos clínicos em humanos.

Entre a otimização principal e o perfil terapêutico, um objetivo é desenvolver um análogo que tem uma longa duração de ação em relação ao GLP-1 nativo e fragmentos dos mesmos e pode ser administrado com efeitos colaterais mínimos. No caso de análogos para uso *in vitro*, análogos exemplares não devem ser excepcionalmente tóxicos para células em cultura, não devem ser mutagênicos para células em cultura, e não devem ser carcinogênicos para células em cultura. No caso de análogos para uso *in vivo*, análogos exemplares não devem ser excepcionalmente tóxicos (por exemplo, devem ter somente efeitos colaterais toleráveis quando administrados em pacientes), não devem ser mutagênicos e não devem ser carcinogênicos.

Por perfil de toxicidade entende-se a avaliação de efeitos colaterais potencialmente perigosos que podem ocorrer quando uma quantidade eficaz de um preparado farmacêutico é administrada. Um efeito colateral pode ser prejudicial ou não, e a determinação de se um efeito

colateral associado a um preparado farmacêutico é um efeito colateral aceitável é feita pela Food and Drug Administration durante o processo de aprovação regulador. Essa determinação não segue regras rígidas e rápidas, e o 5 que é considerado um efeito colateral aceitável varia devido a fatores incluindo: (a) a gravidade da condição sendo tratada, e (b) a disponibilidade de outros tratamentos e os efeitos colaterais atualmente associados a esses tratamentos disponíveis. Por exemplo, o termo câncer 10 abrange uma família complexa de estados de doença relacionados ao crescimento regulado erroneamente proliferação, e diferenciação de células. Muitas formas de câncer são doenças particularmente devastadoras que causam dor severa, perda de função do tecido afetado e morte. 15 Drogas quimioterapêuticas são uma parte importante da terapia padrão para muitas formas de câncer. Embora a própria quimioterapia possa ter efeitos colaterais graves incluindo perda de cabelo, náusea severa, perda de peso, e esterilidade, tais efeitos colaterais são considerados 20 aceitáveis dada a gravidade da doença que tem como objetivo o tratamento. No contexto da presente invenção, o fato de se um efeito colateral é considerado significativo dependerá da condição a ser tratada e a disponibilidade de outros métodos para tratar essa condição.

25 Testes de toxicidade podem ser realizados em tandem com testes de eficácia, e camundongos administrados com doses eficazes do preparado farmacêutico podem ser monitorados em relação a reações adversas ao preparado.

Um ou mais análogos, que provaram ser seguros e 30 eficazes em estudos de animais, podem ser formulados em um

preparado farmacêutico. Tais preparados farmacêuticos podem ser então comercializados, distribuídos e vendidos. Os análogos exemplares e preparado farmacêutico desses análogos podem ser comercializados e vendidos 5 individualmente, ou podem ser vendidos como um pacote farmacêutico e/ou kit. Além disso, em qualquer um dos aspectos acima, um método de conduzir um negócio com base no desenho de um ou mais análogos pode incluir opcionalmente um sistema para faturar um paciente e/ou o 10 provedor de seguro do paciente, bem como um sistema para cobrar reembolso apropriado a partir do paciente e/ou do provedor de seguro do paciente.

Exemplos

Os seguintes exemplos são mostrados como ilustração e 15 não como limitação.

Exemplo 1

Duração de ação de análogos GLP-1

DPP-IV cliva o dipeptídeo terminal-N a partir de peptídeos com Pro ou Ala na penúltima posição (P2). A 20 inserção do aminoácido não natural terc-leucina (Tle), que tem uma cadeia lateral terciária β -carbono, reduz em muito a taxa de clivagem. Isso é demonstrado na figura 1A com três peptídeos homólogos, Ala-Pro-Leu-Ser-Trp-Ser-NH₂, Ala-Pro-Ile-Ser-Trp-Ser-NH₂ e Ala-Pro-Tle-Ser-Trp-Ser-NH₂, que 25 diferem somente no arranjo dos átomos de cadeia lateral do resíduo P3. Há pouca diferença entre a taxa de clivagem para os peptídeos contendo Leu e Ile (meia-vida 49 e 41 min. respectivamente). Nenhuma reação foi observada com o peptídeo contendo Tle durante uma digestão de 30 minutos.

30 DPP IV é conhecido por clivar GLP-1 que tem um Ala em

P2 e Glu em P3. Um análogo de GLP-1 com Tle substituindo o resíduo Glu P3 é estável à degradação por DPP IV (figura 1B). O resíduo Glu é conhecido como sendo importante para ativação e ligação de receptor GLP-1. Sintetiza-se portanto 5 outro análogo com β -dimetil Asp (DMA) em P3. Essa modificação mantém o grupo acídico encontrado na seqüência nativa porém introduz um β -carbono terciário. Como mostrado na figura 1B, os análogos de GLP-1 substituídos por β -DMA e Tle eram resistentes à degradação por DPP IV com meias-10 vidas maiores do que 1000 min. em comparação com uma meia-vida de 96 min. para Glp-1 nativo.

Embora a modificação do resíduo P3 de GLP-1 estabilizou o peptídeo, as modificações também reduziram a afinidade de receptor. Não obstante, a ligação de resíduos 15 de aminoácido a partir de exendin-4 à extremidade carbóxi dos peptídeos melhora a afinidade dos peptídeos modificados para o receptor de GLP-1 e compensa muito a perda causada pelas modificações de P3 (figura 2). A alteração do resíduo Glu em P3 de GLP-1 para Tle, para produzir o peptídeo 20 mencionado como TPA144, resultou em uma diminuição de 20 vezes na afinidade para o receptor GLP-1 comparado com GLP-1. O IC_{50} aumentou de 1.5 nM para GLP-1 para 36.3 nM para TPA144. Quando o resíduo P3 era β -dimetil Asp, para formar TPA1B4, a diminuição em afinidade era somente 25 aproximadamente 5 vezes. TPA1B4 tinha um IC_{50} de 7.6 nM. A adição de carbóxi terminal 9 resíduos de exendin-4 à extremidade da seqüência de TPA1B4, para formar P1732, compensou a perda de afinidade a partir do resíduo DMA P3. A afinidade de P1732 não é significativamente diferente 30 daquele de GLP-1 (IC_{50} para P1732 era 2.5 nM versus 1.5 nM

para GLP-1). A ligação de exendin-4 ao receptor de GLP-1 foi medida para comparação. Esse peptídeo liga-se com aumento pequeno porém significativo em afinidade em comparação com GLP-1, visto que o valor IC_{50} para ligação de exendin-4 ao receptor de GLP-1 era 0.4 nM.

As modificações de GLP-1 não afetam a eficácia de peptídeo (figura 3). Em uma concentração elevada de peptídeo, a quantidade de ativação de receptor de GLP-1, como medido por produção de cAMP, foi igual para GLP-1, 10 TPA144, TPA1B4 e P1732. Desse modo, os análogos GLP-1 P3 com modificações de P3 atuam como agonistas totais do receptor de GLP-1. Extensão adicional da extensão de terminal carbóxi não diminuiu essa atividade agonista. A 15 potência in vitro de P1732 foi medida e comparada com GLP-1 e exendin-4 pelas medições de valores de EC_{40} para ativação de receptor (figura 4). O análogo de GLP-1 com modificações de amino e carbóxi-terminal combinadas mantém potência normal com um EC_{50} de 0.4 - 1.1 nM, em comparação com GLP-1, que tinha um EC_{50} de 0.3 - 0.8 nM. Exendin-4 tinha um 20 EC_{50} que foi levemente mais baixo do que GLP-1 (0.1 - 0.5 nM).

Os análogos de GLP-1 resistentes a DPP IV estenderam a duração de ação em comparação com GLP-1 (figura 5A). GLP-1 diminui a glicose de sangue em camundongos db em 30 minutos 25 após injeção porém esse efeito desaparece em 60 minutos. Ao contrário, o análogo resistente a DPP IV TPA1B4 mostra um efeito similar em 30 minutos porém a glicose de sangue continua a diminuir por 60 minutos após injeção. Os valores de glicose de sangue em 60 minutos estão compreendidos na 30 faixa observada para camundongos normais. Esse efeito

persiste por pelo menos 90 minutos. Em 4 horas, os valores de glicose de sangue retornam aos valores hiperglicêmicos observados nos animais de controle.

Exendin-4 tem uma duração de ação significativamente 5 mais longa do que GLP-1 ou o análogo resistente a DPP IV TPA1B4. Valores de glicose de sangue são reduzidos em camundongos db por pelo menos 4 horas após injeção (figura 5B). Pela adição da extensão terminal-C de 9 resíduos para formar P1732, o efeito sobre glicose de sangue é 10 equivalente àquele de exendin-4. Para testar se a extensão de 9 resíduos inteira é necessária para esse efeito na duração de ação, o análogo GLP-1 DGS65 foi preparado com um β -DMA P3 e uma extensão terminal carbóxi de 3 resíduos correspondendo aos resíduos 31-33 de exendin-4 (Pro-Ser- 15 Ser). Como com exendin-4 e P1732, esse peptídeo diminuiu a glicose do sangue para valores normais em camundongos db por pelo menos 4 horas com um retorno a níveis hiperglicêmicos em 8 horas.

Exendin-4 e os análogos GLP-1 resistentes a DPP IV 20 P1732 e TPA1B4 foram administrados a camundongos db em doses que variam de 0,008 μ g a 80 μ g para determinar a dependência de dose do efeito de redução de glicose. Glicose de sangue foi medida em 60 minutos após injeção, o que corresponde ao tempo de efeito máximo na dose de 8 μ g. 25 Todos os três peptídeos mostraram dependência de dose (figura 6), com valores EC₅₀ similares de 0,5 μ g para exendin-4, 1,1 μ g para P1732 e 0,4 μ g para TPA1B4.

Os resultados do Exemplo 1 são resumidos na Tabela 2.

Tabela 2

Composto	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	P3 substituição	Extensão C- terminal
GLP-1	1.5	0.48	nenhuma	nenhuma
TPA144	36.3	-	Tle	nenhuma
TPA1B4	7.6	-	DMA	Nenhuma
P1732	2.5	0.64	DMA	PSSGAPPPS (SEQ ID NO. 5)
Exendin-4	0.4	0.23	- - - -	- - - -

Exemplo 2

Duração de ação de análogo GLP-1 com resíduo de aminoácido de ocorrência não natural terminal carbóxi

O peptídeo DGS69 é homólogo ao análogo GLP-1 resistente a DPP IV TPA1B4. Esses dois peptídeos contêm, 5 ambos, β-dimetil Asp na posição 3, que torna os mesmos resistentes à degradação por DPP IV. DGS69 difere de TPA1B4 em que um aminoácido incomum, Bifenil alanina (Bip) foi adicionado à extremidade carbóxi. Essa adição de resíduo 10 único aumentou significativamente a duração do efeito de redução de glicose de sangue em camundongos diabéticos. O curso de ação de tempo é comparado com aquele de TPA1B4 e Exendin-4 na figura 7. As estruturas dos peptídeos são mostradas abaixo.

15 GLP-1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂ (SEQ ID NO: 3) Exendin-4 HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-[NH₂]
(SEQ ID NO: 8)

TPA1B4 HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂ (SEQ ID NO: 12)

DGS69 HAXGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRZ-NH₂ (SEQ ID NO: 13)

X=β-dimetil Asp (DMA) Z=Bifenil alanina (Bip)

Em resumo, verificou-se que a adição de um aminoácido não natural único, Bip, à extremidade carbóxi de um análogo GLP-1 resistente a DPP IV transmite uma longa duração de 5 ação, essencialmente igual aquela de Exendin-4.

Todas as publicações, patentes e pedidos de patente são aqui incorporadas a título de referência na íntegra até o mesmo ponto como se cada publicação individual, patente ou pedido de patente fosse específica e individualmente 10 indicada como sendo incorporada por referência na íntegra.

Equivalentes

Aqueles versados na técnica reconhecerão ou serão capazes de determinar utilizando não mais do que experimentação de rotina, inúmeros equivalentes aos 15 compostos e métodos de uso dos mesmos descritos aqui. Tais equivalentes são considerados como compreendidos no escopo da presente invenção e são abrangidos pelas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Análogo de polipeptídeo caracterizado por compreender:

5 a) uma seqüência de aminoácido de base pelo menos 80% idêntica a uma de GLP-1 (7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1(7-36) e GLP-1(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4); e

b) um a quinze resíduos de aminoácidos ligados à extremidade carboxi da seqüência de aminoácido de base,

10 onde o análogo tem atividade semelhante a GLP-1 de duração mais longa in vivo em seres humanos do que GLP-1 nativo.

2. Análogo de polipeptídeo caracterizado por compreender:

15 a) uma seqüência de aminoácido de base pelo menos 80% idêntica a uma de GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS. 1-4); e

b) um a quinze resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base,

20 onde o receptor de GLP-1 tem maior afinidade com o análogo do que GLP-1 nativo.

3. Análogo de polipeptídeo caracterizado por compreender:

25 a) uma seqüência de aminoácido de base pelo menos 50% idêntica a uma de GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS. 1-4) na qual o resíduo de aminoácido na seqüência de aminoácido de base correspondendo ao resíduo P₁ de GLP-1 é um análogo de aminoácido tendo um carbono C_β tetrassubstituído; e

30 b) um a quinze resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base,

onde o análogo tem atividade semelhante a GLP-1 de duração mais longa in vivo em seres humanos do que GLP-1 nativo.

4. Análogo de polipeptídeo caracterizado por 5 compreender:

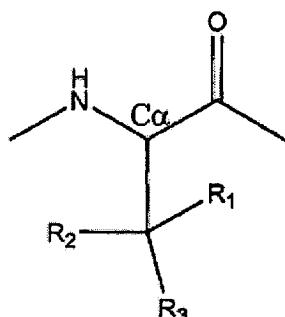
a) uma seqüência de aminoácido de base pelo menos 50% idêntica a uma de GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS. 1-4) na qual o resíduo de aminoácido na seqüência de aminoácido de base 10 correspondendo ao resíduo P'₁ de GLP-1 é um análogo de aminoácido tendo um carbono C_β tetrassubstituído; e

b) um a quinze resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base,

onde o receptor de GLP-1 tem atividade maior para o 15 análogo do que para GLP-1 nativo.

5. Análogo, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato do resíduo correspondendo ao resíduo P'₁ reduzir a suscetibilidade do análogo à clivagem por uma proteinase em relação a GLP-1.

6. Análogo resistente à proteinase da reivindicação 5, caracterizado pelo fato do resíduo correspondendo ao resíduo P'₁ ser representado pela seguinte fórmula:



onde:

R₁ e R₂ representam cada um independentemente uma 30 alquila inferior, heteroalquila, cicloalquila,

hetrocicloalquila, arila, alcoxila, carboxamida, carbonila, halogênio, hidroxila, amina ou ciano, ou R_1 e R_2 tomados juntos formam um anel de 4-7 átomos;

R_3 representa uma alquila inferior, heteroalquila, 5 cicloalquila, heterocicloalquila, arila, amino, alcoxila, halogênio, carboxamida, carbonila, ciano, tiol, tioalquila, acilamino, um amido, ciano, nitro, azido, sulfato, sulfonato, sulfonamido, $-(CH_2)_m-R_4$, $-(CH_2)_m-OH$, $-(CH_2)_m-COOH$, $-(CH_2)_m-O$ -alquila inferior, $-(CH_2)_m-O$ -alquenila 10 inferior, $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-R_4$, $-(CH_2)_m-S$ -alquila inferior, $-(CH_2)_m-S$ -alquenila inferior, $-(CH_2)_n-S-(CH_2)_m-R_4$, $-(CH_2)_m-N-C(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_m-C(=O)NH_2$, ou $-(CH_2)_m-NH_2$,;

R_4 representa independentemente para cada ocorrência, 15 uma arila, aralquila, cicloalquila, cicloalquenila ou um heterociclo não aromático; e

$m = 0, 1$ ou 2 .

7. Análogo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de R_1 e R_2 representarem cada um independentemente uma alquila inferior ou um halogênio; e 20 R_3 representar uma alquila, inferior, arila, um grupo hidroxila, $-(CH_2)_m-COOH$, $-(CH_2)_m-NH_2$, $-(CH_2)_m-N-C(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_m-C(=O)NH_2$, $-SH$, ou $-(CH_2)_m-S-CH_3$.

8. Análogo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de R_1 e R_2 representarem cada um 25 independentemente uma metila, etila ou propila.

9. Análogo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de R_1 e R_2 representarem individualmente metila.

10. Análogo, de acordo com a reivindicação 8, 30 caracterizado pelo fato de R_3 representar uma alquila

inferior, fenila, hidróxi fenila indol, imidazol, hidroxila, -COOH, -CH₂COOH, -CH₂-CH₂-N-C(=NH)NH₂, -CH₂-C(=O)NH₂, -CH₂-CH₂-C(=O)NH₂, -SH, ou -CH₂-S-CH₃.

11. Análogo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato do análogo reter pelo menos 50 por cento da atividade biológica de GPL-1.

12. Análogo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de um ou mais resíduos de aminoácido de ocorrência não natural serem ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base.

13. Análogo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato do resíduo de aminoácido de ocorrência não natural ter uma cadeia lateral contendo arila.

14. Análogo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato do aminoácido de ocorrência não natural ser bifenil alanina.

15. Análogo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base serem selecionados dos resíduos de aminoácido 31-39 de exendin-4.

16. Análogo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base serem três ou mais resíduos de aminoácido consecutivos selecionados entre resíduos de aminoácido 31-39 de exendin-4.

17. Análogo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base serem Pro-Ser-Ser.

5 18. Análogo, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base serem Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 5).

10 19. Análogo, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato do análogo ter uma seqüência de aminoácidos de base pelo menos 80% idêntica a uma de GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4).

15 20. Análogo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato do análogo ter uma seqüência de aminoácidos de base pelo menos 90% idêntica a uma de GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) e GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4).

20 21. Análogo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do análogo ter uma seqüência de aminoácido de base pelo menos 95% idêntica a uma de GLP-1-(7-34), GLP-1-(7-35), GLP-1-(7-36) and GLP-1-(7-37) (SEQ ID NOS: 1-4).

25 22. Análogo, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato do análogo ter a seguinte seqüência de aminoácido de base:

His-Ala-Xaa-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 (SEQ ID NO: 12),

30 em que Xaa é beta-dimetil aspartato ou terc-leucina.

23. Análogo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato do análogo ter uma seqüência de aminoácidos de base diferindo em não mais do que um resíduo a partir da seqüência de GLP-1-(7-36) (SEQ ID NO: 3).

5 24. Análogo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato do análogo ter uma seqüência de aminoácido de base idêntica a GLP-1-(7-36) (SEQ ID NO: 3).

10 25. Composição farmacêutica caracterizada por compreender o análogo de qualquer uma das reivindicações de 1-24 e um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

15 26. Preparado farmacêutico embalado caracterizado por compreender o análogo de qualquer uma das reivindicações de 1-24 e um veículo farmaceuticamente aceitável, e um rótulo, instruções ou ambos para administrar a um paciente.

27. Preparado veterinário embalado caracterizado por compreender o análogo de qualquer uma das reivindicações de 1-24, e um veículo aceitável; e um rótulo, instruções ou ambos para administrar a um animal.

20 28. Método de tratar uma ou mais entre resistência à insulina, intolerância a glicose, hiperglicemias, hiperinsulinemia, obesidade, hiperlipidemia e complicações diabéticas em um paciente necessitando do mesmo, caracterizado por compreender administrar uma quantidade eficaz de um análogo de qualquer uma das reivindicações de 1-24.

29. Método de aumentar a meia-vida in vivo em seres humanos de um peptídeo pelo menos 80% idêntico a GLP-1, caracterizado por compreender ligar um a quinze resíduos de 30 aminoácido à extremidade carbóxi do peptídeo.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácido serem de ocorrência não natural.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, 5 caracterizado pelo fato de pelo menos os resíduos de aminoácido de ocorrência não natural terem uma cadeia lateral contendo arila.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, 10 caracterizado pelo fato de pelo menos um dos aminoácidos de ocorrência não natural ser bifenil alanina.

33. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácidos serem selecionados de resíduos de aminoácido 31-39 de exendin-4.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, 15 caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácidos serem três ou mais resíduos de aminoácido consecutivos selecionados de resíduos de aminoácido 31-39 de exendin-4.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, 20 caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácido serem Pro-Ser-Ser.

36. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato dos resíduos de aminoácidos serem Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO. 5).

37. Método, de acordo com a reivindicação 29, 25 caracterizado pelo fato do peptídeo diferir em não mais do que um resíduo de aminoácido a partir de GLP-1-(7-36) (SEQ ID NO. 3).

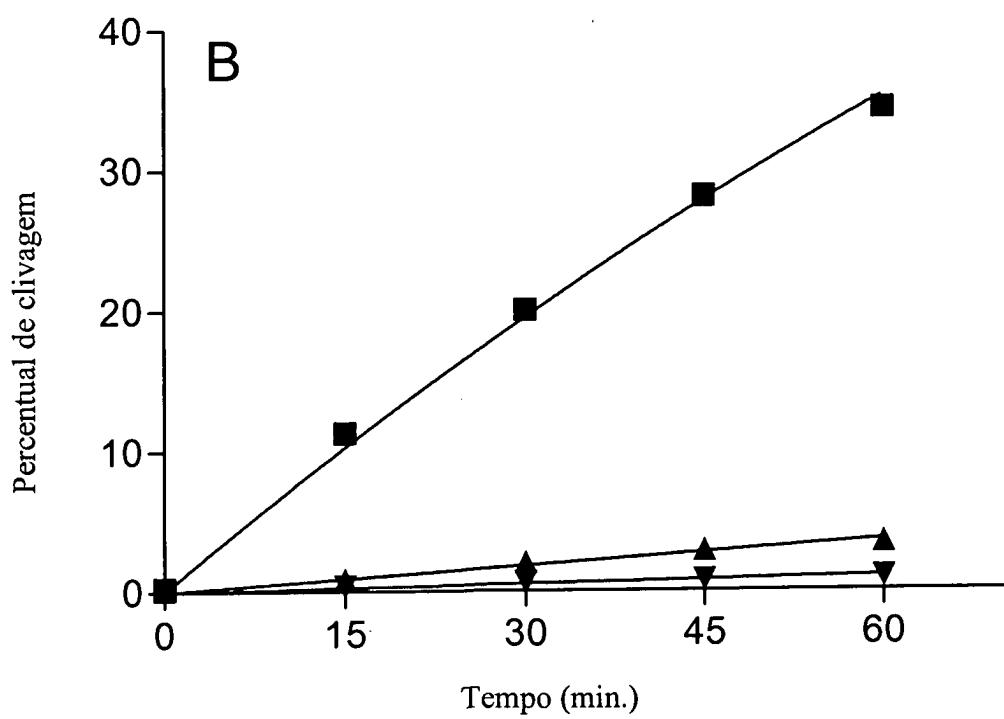
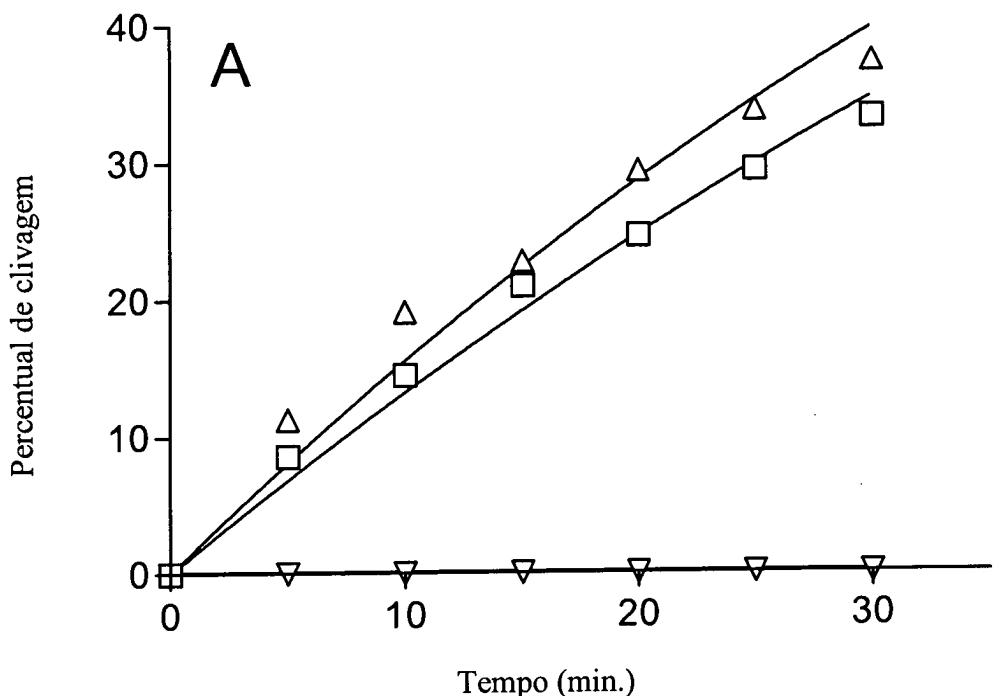
Figura 1

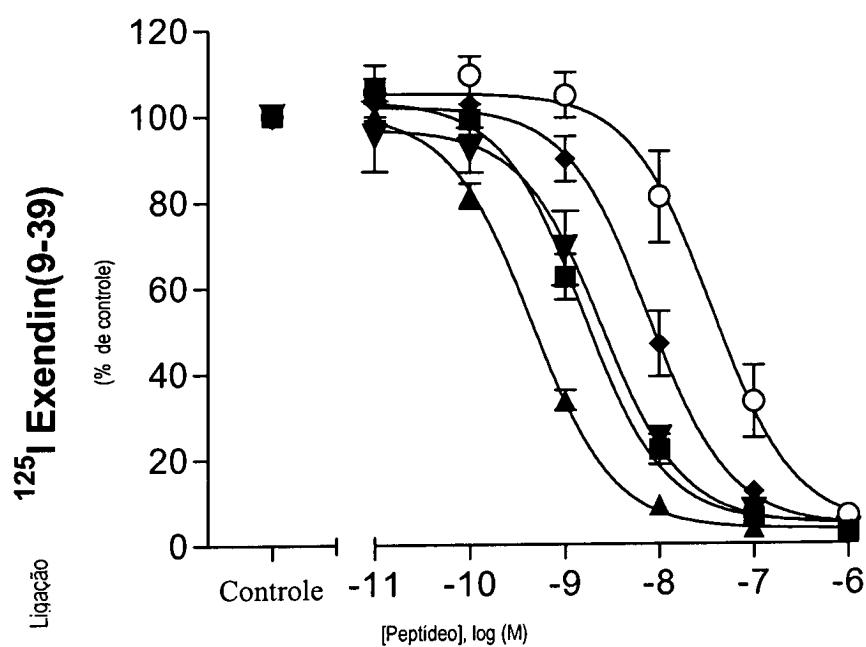
Figura 2

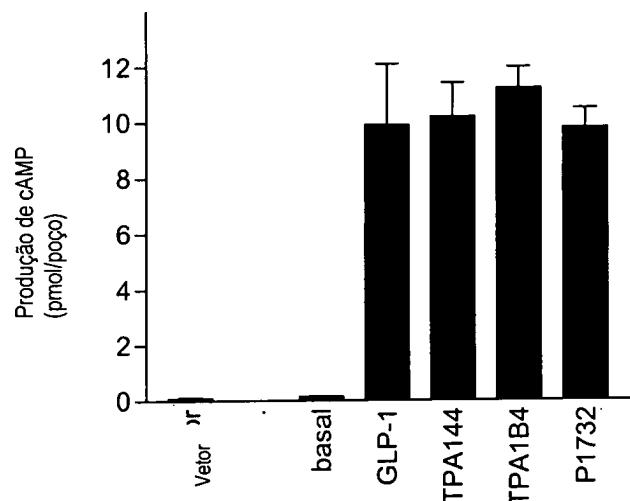
Figura 3

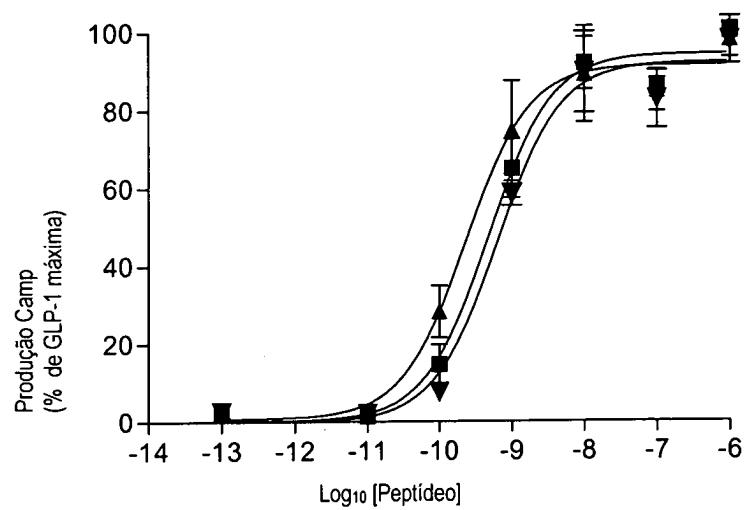
Figura 4

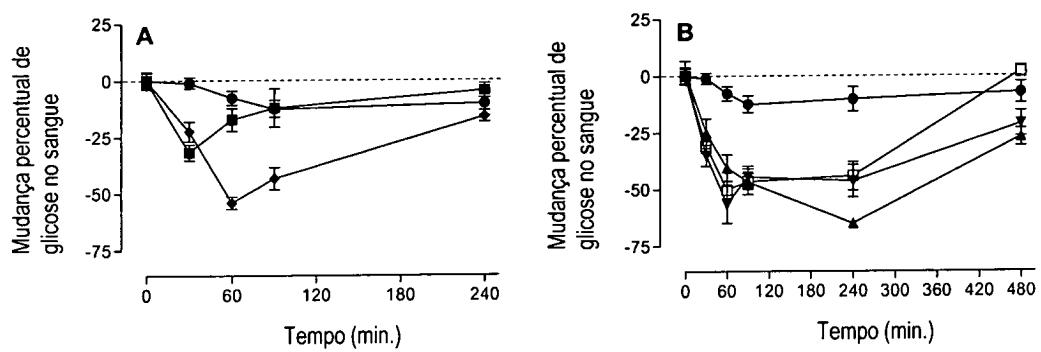
Figura 5

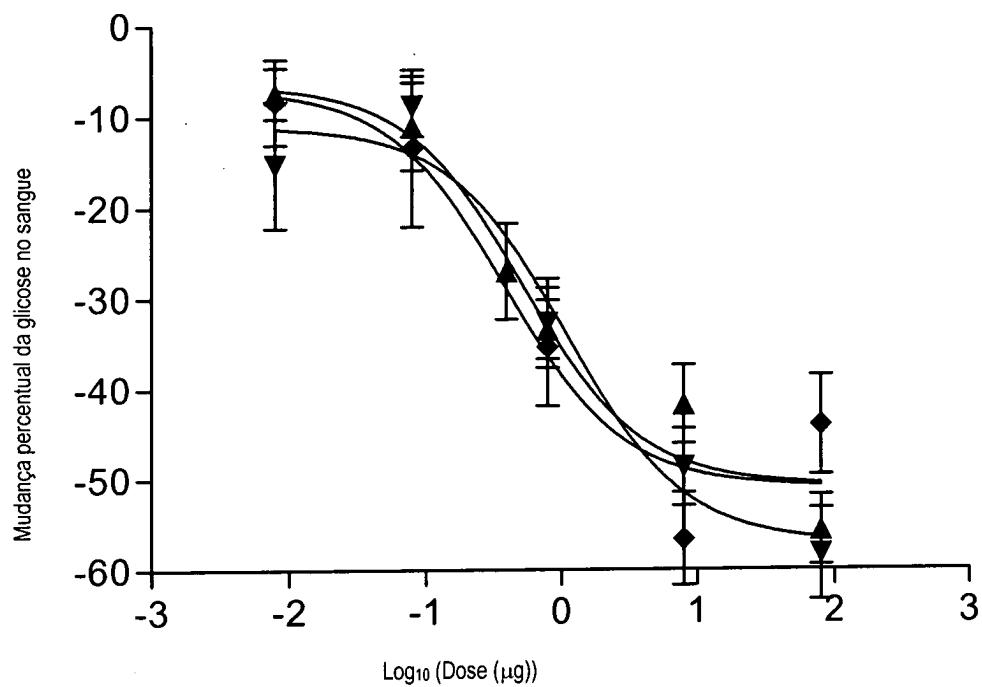
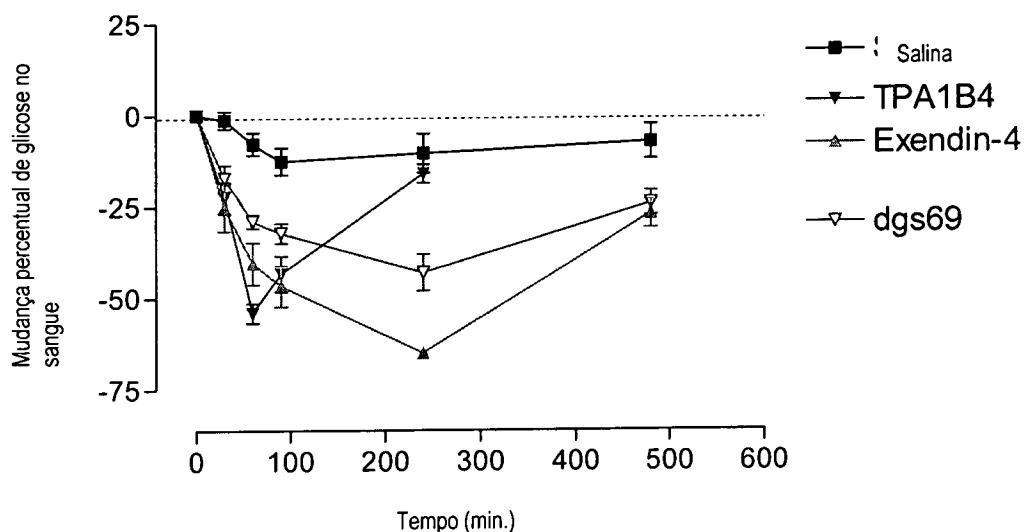
Figura 6

Figura 7

ANÁLOGOS DE GLP-1 ESTABILIZADOS

Análogos de polipeptídeo da invenção que incluem: a) uma seqüência de aminoácido de base pelo menos 80% idêntica a uma de um fragmento de GLP-1; e b) resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base, onde os análogos têm atividade semelhante à GLP-1 de duração mais longa do que GLP-1 nativo e/ou receptor de GLP-1 tem uma afinidade maior para os análogos do que GLP-1 nativo. Outros análogos de polipeptídeo da invenção incluem a) uma seqüência de aminoácido de base de pelo menos 50% idêntico a um fragmento de GLP-1 no qual o resíduo de aminoácido na seqüência de aminoácido base correspondendo a resíduo P'_1 de GLP-1 é um análogo de aminoácido tendo um carbono C_B tetrassubstituído; e b) resíduos de aminoácido ligados à extremidade carbóxi da seqüência de aminoácido de base, onde os análogos têm as propriedades indicadas acima. A invenção também inclui métodos de tratamento onde esses análogos são administrados.