

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 1999.12.07	(73) Titular(es): SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES S.A.S. 51, 53, RUE DU DOCTEUR BLANCHE 75016 PARIS FR
(30) Prioridade(s): 1998.12.07 US 111186 P 1998.12.07 US 206833	THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND US
(43) Data de publicação do pedido: 2001.10.04	(72) Inventor(es): DAVID H. COY US ZHENG XIN DONG US
(45) Data e BPI da concessão: 2008.05.07 107/2008	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANÁLOGOS DE GLP-1**

(57) Resumo:

RESUMO
"ANÁLOGOS DE GLP-1"

A presente invenção diz respeito a análogos peptídicos do péptido-1 do tipo do glucagon, aos sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos, a métodos para a utilização de tais análogos para o tratamento de mamíferos e a composições farmacêuticas úteis para tal, compreendendo os referidos análogos.

DESCRIÇÃO
"ANÁLOGOS DE GLP-1"

Fundamento da invenção

A presente invenção refere-se a análogos peptídicos do péptido-1 do tipo do glucagon, aos sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos, a métodos para a utilização de tais análogos para tratar mamíferos e a composições farmacêuticas úteis para tal, compreendendo os referidos análogos.

A amida do péptido-1 do tipo do glucagon (7-36) (GLP-1) é sintetizada nas células intestinais L por processamento pós-traducional em tecidos específicos do precursor de glucagon, pré-proglucagon (Vamdell, J.M., *et al.*, J. Histochem. Cytochem, 1985:33:1080-6) e é libertada para a circulação em resposta a uma refeição. A concentração plasmática de GLP-1 aumenta de um nível em jejum de aproximadamente 15 pmol/L para um nível de pico pós-refeição de 40 pmol/L. Foi demonstrado que, para um determinado aumento da concentração de glucose no plasma, o aumento de insulina plasmática é aproximadamente três vezes maior quando glucose é administrada por via oral, comparativamente à via intravenosa (Kreymann, B., *et al.*, Lancet 1987:2,1300-4). Este aumento da libertação de insulina alimentar, conhecido como o efeito de incretina, é essencialmente hormonal e pensa-se, presentemente, que o GLP-1 é a incretina mais potente em humanos. Para além do efeito insulino-trófico, o GLP-1 suprime a secreção de glucagon, retarda o esvaziamento gástrico (Wettergren A., *et al.*, Dig Dis Sci 1993:38:665-73) e pode aumentar eliminação de glucose periférica (D'Alessio, D.A. *et al.*, J. Clin. Invest 1994:93:2293-6).

Em 1994, foi sugerido o potencial terapêutico do GLP-1, após a observação de que uma única dose subcutânea (s/c) de GLP-1 podia normalizar completamente os níveis de glucose pós-refeição em pacientes com diabetes mellitus não dependente de insulina (NIDDM) (Gutniak, M.K., *et al.*, Diabetes Care 1994:17:1039-44). Pensou-se que este efeito era mediado quer pela libertação aumentada de insulina, quer pela redução na secreção de glucagon. Para além disso, mostrou-se que uma infusão intravenosa de GLP-1 era capaz de atrasar o esvaziamento gástrico pós-refeição em pacientes com NIDDM (Williams, B., *et al.*, J. Clin. Endo Metab 1996:81:327-32). Ao contrário das sulfonilureias, a acção insulínica da GLP-1 depende da concentração de glucose no plasma (Holz, G.G 4^a, *et al.*, Nature 1993:361:362-5). Assim, a perda da libertação de insulina mediada por GLP-1 a baixas concentrações de glucose no plasma, protege contra hipoglicémia severa.

Esta combinação de acções confere ao GLP-1 potenciais vantagens terapêuticas únicas, comparativamente a outros agentes presentemente utilizados para o tratamento de NIDDM.

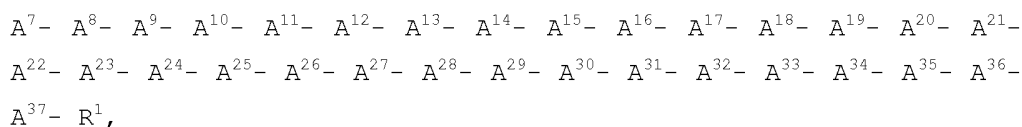
Numerosos estudos demonstraram que quando administrado a sujeitos saudáveis, o GLP-1 influencia potencialmente os níveis glicémicos, bem como as concentrações de insulina e glucagon (Orskov, C. Diabetologia 35:701-711, 1992; Holst, J.J., *et al.*, Potencial of GLP-1 in diabetes management em Glucagon III, Handbook of Experimental Pharmacology, Lefevbre PJ, Ed. Berlim, Springer Verlag, 1996, p. 311-326), efeitos esses que são dependentes da glucose (Kreymann, B., *et al.*, Lancet ii: 1300-1304, 1987; Weir, G.C., *et al.*, Diabetes 38:338-342, 1989). Para além disso,

é também eficaz em pacientes com diabetes (Gutniak, M., N. Engl J Med 226:1316-1322, 1992; Nathan, D.M., et al., Diabetes Care 15:270-276, 1992), normalizando os níveis de glucose no sangue em sujeitos com diabetes do tipo 2 (Nauck, M.A., et al., Diabetologia 36:741-744, 1993), e melhorando o controlo glicémico em pacientes do tipo 1 (Creutzfeldt, W.O., et al., Diabetes Care 19:580-586, 1996), aumentando a possibilidade de ser utilizada como agente terapêutico.

No entanto, o GLP-1 é metabolicamente instável, possuindo um tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) plasmático de apenas 1-2 min. *in vivo*. Quando administrado exogenamente, o GLP-1 é também rapidamente degradado (Deacon, C.F., et al., Diabetes 44:1126-1131, 1995). Esta instabilidade metabólica limita o potencial terapêutico do GLP-1 nativo. Por conseguinte, existe uma necessidade de análogos de GLP-1 que sejam mais activos e metabolicamente mais estáveis, do que a GLP-1 nativa. Foram descritos análogos de GLP-1 no estado da técnica (vide por exemplo WO 91/11457). No entanto, existe uma necessidade de novos análogos de GLP-1.

Sumário da invenção

Num dos aspectos, a presente invenção diz respeito a um composto de fórmula (I)



(I)

em que

A^7 é Ura, Paa, Pta ou Hppa;

- A⁸ é Ala, D-Ala, Aib, Acc, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala, Arg ou N-Me-Gly;
- A⁹ é Glu, N-Me-Glu, N-Me-Asp ou Asp;
- A¹⁰ é Gly, Acc, Ala, D-Ala, Phe ou Aib;
- A¹¹ é Thr ou Ser;
- A¹² é Phe, Acc, Aic, Aib, 3-Pal, 4-Pal, β-Nal, Cha, Trp ou X¹-Phe;
- A¹³ é Thr ou Ser;
- A¹⁴ é Ser, Thr, Ala ou Aib;
- A¹⁵ é Asp, Ala, D-Asp ou Glu;
- A¹⁶ é Val, D-Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Abu, Ala, D-Ala, Tba ou Cha;
- A¹⁷ é Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc ou Thr;
- A¹⁸ é Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc ou Thr;
- A¹⁹ é Tyr, D-Tyr, Cha, Phe, 3-Pal, 4-Pal, Acc, β-Nal, Amp ou X¹-Phe;
- A²⁰ é Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Val, Phe ou X¹-Phe;
- A²¹ é Glu, Ala ou Asp;
- A²² é Gly, Acc, Ala, D-Ala, β-Ala ou Aib;
- A²³ é Gln, Asp, Ala, D-Ala, Aib, Acc, Asn ou Glu;
- A²⁴ é Ala, Aib, Val, Abu, Tle ou Acc;
- A²⁵ é Ala, Aib, Val, Abu, Tle, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn, HN-CH((CH₂)_n-NR¹⁰R¹¹)-C(O) ou HN-CH((CH₂)_e-X³)-C(O);
- A²⁶ é Lys, Ala, 3-Pal, 4-Pal, Arg, hArg, Orn, Amp, HN-CH((CH₂)_n-NR¹⁰R¹¹)-C(O) ou HN-CH((CH₂)_e-X³)-C(O);
- A²⁷ é Glu, Ala, D-Ala ou Asp;
- A²⁸ é Phe, Ala, Pal, β-Nal, X¹-Phe, Aic, Acc, Aib, Cha ou Trp;
- A²⁹ é Ile, Acc, Aib, Leu, Nle, Cha, Tle, Val, Abu, Ala, Tba ou Phe;
- A³⁰ é Ala, Aib, Acc ou inexistente;
- A³¹ é Trp, Ala, β-Nal, 3-Pal, 4-Pal, Phe, Acc, Aib, Cha, Amp ou inexistente;
- A³² é Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Phe, X¹-Phe, Ala ou inexistente;
- A³³ é Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Cha, Ala, Phe, Abu, X¹-Phe, Tba, Gaba ou inexistente;

A^{34} é Lys, Arg, hArg, Orn, Amp, Gaba, $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NR}^{10}\text{R}^{11})\text{-C(O)}$, $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_e\text{-X}^3)\text{-C(O)}$ ou inexistente;

A^{35} é Gly ou inexistente;

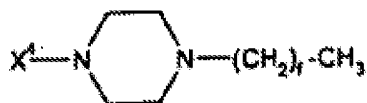
A^{36} é L- ou D-Arg, D- ou L-Lys, D- ou L-hArg, D- ou L-Orn, Amp, $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NR}^{10}\text{R}^{11})\text{-C(O)}$, $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_e\text{-X}^3)\text{-C(O)}$ ou inexistente;

A^{37} é Gly ou inexistente;

X^1 , para cada ocorrência, é independentemente seleccionado do grupo consistindo de $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ -alquilo, OH e halo;

R^1 é OH, NH_2 , $(\text{C}_1\text{-C}_{12})$ alcoxi ou $\text{NH-X}^2\text{-CH}_2\text{-Z}^0$, em que X^2 é um agrupamento $(\text{C}_1\text{-C}_{12})$ hidrocarboneto, e Z^0 é H, OH, CO_2H ou CONH_2 ;

X^3 é

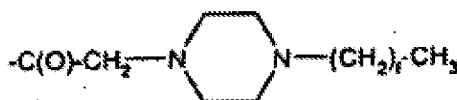


ou -C(O)-NHR^{12} , em que X^4 , para cada ocorrência, é independentemente -C(O)- , -NH-C(O)- ou $\text{-CH}_2\text{-}$ e f, para cada ocorrência, é independentemente um número inteiro de 1 a 29;

e, para cada ocorrência, é independentemente um número inteiro de 1 a 4;

n, para cada ocorrência, é independentemente um número inteiro de 1-5; e

R^{10} e R^{11} , para cada ocorrência, são cada um, independentemente, H, $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alquilo, $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ acilo, $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alquilsulfonilo, $\text{-C}((\text{NH})(\text{NH}_2))$ ou



desde que, quando R^{10} é (C_1-C_{30}) acilo, (C_1-C_{30}) alquilsulfonylo, $-C((NH)(NH_2))$ ou



R^{11} é H ou (C_1-C_{30}) alquilo; e

R_{12} é (C_1-C_{30}) alquilo;

ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

Um composto preferido do composto de fórmula (I) imediatamente precedente é um em que A^{11} é Thr; A^{13} é Thr; A^{14} é Ser, Aib ou Ala; A^{17} é Ser, Ala, Aib ou D-Ala; A^{18} é Ser, Ala, Aib, ou D-Ala; A^{21} é Glu ou Ala; A^{23} é Gln, Glu, ou Ala; e A^{27} é Glu ou Ala; ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

Um composto preferido do composto de fórmula (I) imediatamente precedente é um em que A^9 é Glu, N-Me-Glu ou N-Me-Asp; A^{12} é Phe, Acc ou Aic; A^{16} é Val, D-Val, Acc, Aib, Ala, Tle ou D-Ala; A^{19} é Tyr, 3-Pal, 4-Pal ou D-Tyr; A^{20} é Leu, Acc, Cha, Ala ou Tle; A^{24} é Ala, Aib ou Acc; A^{25} é Ala, Aib, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn, $HN-CH((CH_2)_n-NH-R^{10})-C(O)$; A^{28} é Phe ou Ala; A^{29} é Ile, Acc ou Tle; A^{30} é Ala, Aib ou inexistente; A^{31} é Trp, Ala, 3-Pal, 4-Pal ou inexistente; A^{32} é Leu, Acc, Cha, Ala ou inexistente; A^{33} é Val, Acc, Ala, Gaba, Tle ou inexistente; ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

Um composto preferido do composto de fórmula (I) imediatamente precedente é um em que A^8 é Ala, D-Ala, Aib, A6c, A5c, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala ou N-Me-Gly; A^{10} é Gly, Ala, D-Ala ou Phe; A^{12} é Phe, A6c ou A5c; A^{16} é Val, Ala, Tle, A6c, A5c ou D-Val; A^{20} é Leu, A6c, A5c, Cha, Ala ou Tle; A^{22}

é Gly, Aib, β -Ala, L-Ala ou D-Ala; A²⁴ é Ala ou Aib; A²⁹ é lle, A6c, A5c ou Tle; A³² é Leu, A6c, A5c, Cha, Ala ou inexistente; A³³ é Val, A6c, A5c, Ala, Gaba, Tle ou inexistente; ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

Um composto preferido do composto de fórmula (I) imediatamente precedente é um em que R¹ é OH ou NH₂ ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

Um composto de fórmula (I) mais preferido é um em que o referido composto é [Hppa⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂ ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

Outro composto de fórmula (I) mais preferido é um em que o referido composto é [Ura⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; [Paa⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; [Pta⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; ou um sal farmacêuticamente aceitável dos mesmos.

Noutro aspecto, a presente invenção disponibiliza uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de um composto de fórmula (I), como definido anteriormente na presente, ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo e um veículo ou um diluente farmacêuticamente aceitáveis.

Ainda noutro aspecto, a presente invenção disponibiliza uma utilização de um composto de fórmula (I), como definido anteriormente na presente, ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, na preparação de um medicamento para desencadear um efeito agonista de um receptor de GLP-1, num sujeito necessitado do mesmo.

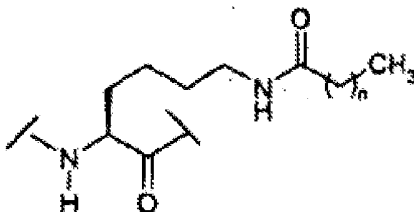
Ainda noutro aspecto adicional, a presente invenção disponibiliza a utilização de um composto de fórmula (I), como definido anteriormente na presente, ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, na preparação de um medicamento para tratar uma doença seleccionada do grupo consistindo de diabetes do tipo I, diabetes do tipo II, obesidade, glucagonomas, perturbações secretoras das vias respiratórias, perturbação metabólica, artrite, osteoporose, doença do sistema nervoso central, restenose e doença neurodegenerativa, falha renal, falha cardíaca congestiva, síndrome nefrótico, cirrose, edema pulmonar e hipertensão, num sujeito necessitado do mesmo, o que compreende a administração de uma quantidade eficaz ao referido sujeito. A utilização preferida de entre as anteriores é aquela em que a doença é diabetes do tipo I ou diabetes do tipo II.

Com a excepção do aminoácido N-terminal, todas as abreviaturas (por exemplo, Ala) de aminoácidos representam, nesta publicação, a estrutura -NH-CH(R)-CO- , em que R é a cadeia lateral de um aminoácido (por exemplo, CH_3 para Ala). Para o aminoácido N-terminal, a abreviatura representa a estrutura $(\text{R}^2\text{R}^3)\text{-N-CH(R)-CO-}$, em que R é uma cadeia lateral de um aminoácido e R^2 e R^3 são como definidos acima, excepto no caso em que A^7 é Ura, Paa, Pta ou Hppa, sendo que neste caso R^2 e R^3 não estão presentes, uma vez que Ura, Paa, Pta e Hppa são considerados, na presente, como aminoácidos desamino. As abreviaturas: β -Nal, Nle, Cha, Amp, 3-Pal, 4-Pal e Aib representam os seguintes α -aminoácidos: β -(2-naftil)alanina, norleucina, ciclo-hexilalanina, 4-amino-fenilalanina, β -(3-piridinil)alanina, β -(4-piridinil)alanina e ácido α -aminoisobutírico, respectivamente. Outras definições de

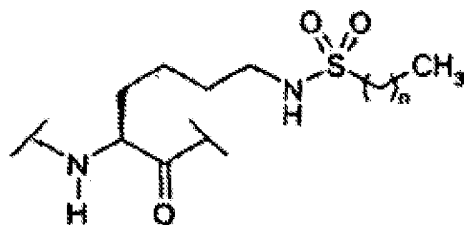
aminoácidos são: Ura é ácido urocânico; Pta é ácido (4-piridiltio)acético; Paa é ácido *trans*-3-(3-piridil)acrílico; Tma-His é N,N-tetrametilamidino-histidina; N-Me-Ala é N-metil-alanina; N-Me-Gly é N-metil-glicina; N-Me-Glu é ácido N-metil-glutâmico; Tle é *terc.*-butilglicina; Abu é ácido α -aminobutírico; Tba é *terc.*-butilalanina; Orn é ornitina; Aib é ácido α -aminoisobutírico; β -Ala é β -alanina; Gaba é ácido γ -aminobutírico; Ava é ácido 5-aminovalérico; e Aic é ácido 2-aminoindano-2-carboxílico.

Por Acc entende-se um aminoácido seleccionado do grupo de ácido 1-amino-1-ciclopropanocarboxílico (A3c); ácido 1-amino-1-ciclobutanocarboxílico (A4c); ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (A5c); ácido 1-amino-1-ciclohexancarboxílico (A6c); ácido 1-amino-1-cicloheptancarboxílico (A7c); ácido 1-amino-1-ciclooctancarboxílico (A8c); e ácido 1-amino-1-ciclononanocarboxílico (A9c). Na fórmula anterior, hidroxialquilo, hidroxifenilalquilo e hidroxinaftilalquilo podem conter 1-4 substituintes hidroxí. COX⁵ representa -C=O·X⁵. Exemplos de -C=O·X⁵ incluem, mas se limitam a, acetilo e fenilpropionilo.

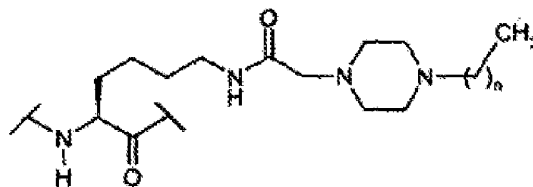
O que se entende por Lys(N^e-alcanoilo) é representado pela seguinte estrutura:



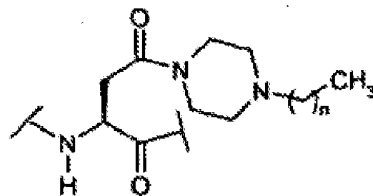
O que se entende por Lys(N^e-alquilsulfonilo) é representado pela seguinte estrutura:



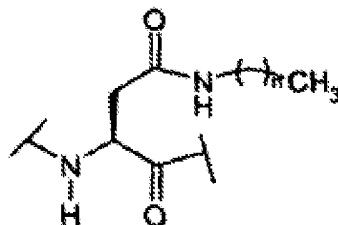
O que se entende por Lys(N^ε-(2-(4-alkil-1-piperazino)acetil)) é representado pela seguinte estrutura:



O que se entende por Asp(1-(4-alkil-piperazina)) é representado pela seguinte estrutura:



O que se entende por Asp(1-alkilamino) é representado pela seguinte estrutura:



Nas estruturas anteriores, a variável n é 1 a 30.

Os nomes completos de outras abreviaturas utilizadas na presente são como se segue: Boc para t-butiloxicarbonilo, HF para fluoreto de hidrogénio, Fm para formilo, Xan para xantilo, Bzl para benzilo, Tos para tosilo, DNP para 2,4-dinitrofenilo, DMF para dimetilformamida, DCM para diclorometano, HBTU para hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio, DIEA para di-isopropiletilamina, HOAc para ácido acético, TFA para ácido trifluoroacético, 2CIZ para 2-clorobenziloxicarbonilo e OcHex para O-cilco-hexilo.

Um péptido desta invenção é também denotado, na presente, noutra formato, por exemplo, [A5c⁸]hGLP-1(7-36)NH₂, com os aminoácidos substituídos da sequência natural posicionados entre o conjunto de parênteses (por exemplo, A5c⁸ para Ala⁸ em hGLP-1). A abreviatura GLP-1 significa péptido-1 do tipo do glucagon, e hGLP-1 significa péptido-1 do tipo do glucagon humano. Os números entre parênteses referem-se ao número de aminoácidos presentes no péptido (por exemplo, hGLP-1(7-36) corresponde aos aminoácidos 7 a 36 da sequência peptídica para o GLP-1 humano). A sequência para hGLP-1(7-37) encontra-se listada em Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40, 1992, pp 333-342. A designação "NH₂" em hGLP-1(7-36)NH₂ indica que o terminal C do péptido se encontra aminado. hGLP-1(7-36) significa que o terminal C é o ácido livre.

Descrição detalhada da invenção

Os péptidos desta invenção podem ser preparados por meio de síntese de péptidos em fase sólida standard. *Vide*, por exemplo, Stewart, J.M., *et al.*, *Solid Phase Synthesis* (Pierce Chemical Co., 2^a edição, 1984).

Quando R^1 é $NH-X^2-CH_2-CONH_2$ (isto é, $Z^0=CONH_2$), a síntese do péptido inicia-se com $BocHN-X^2-CH_2-COOH$, o qual é ligado à resina MBHA. Se R^1 é $NH-X^2-CH_2-COOH$ (isto é, $Z^0=COOH$), então a síntese do péptido inicia-se com $Boc-HN-X^2-CH_2-COOH$, o qual é ligado à resina PAM.

O seguinte descreve um método sintético para preparar um péptido desta invenção, método esse que é bem conhecido por aqueles peritos na técnica. São também conhecidos outros métodos por aqueles peritos na técnica.

A resina de benzidrilamina-poliestireno (Advanced ChemTech, Inc., Louisville, KY) (0,9 g, 0,3 mmol), sob a forma de ião cloreto, é colocada num recipiente de reacção de um Advanced ChemTech Peptide Synthesizer Modelo 200, programado para realizar o seguinte ciclo de reacção: (a) cloreto de metileno; (b) 33% de ácido trifluoroacético em cloreto de metileno (2 vezes, durante 1 e 15 min. cada); (c) cloreto de metileno; (d) etanol; (e) cloreto de metileno; (f) 10% de di-isopropiletilamina em cloreto de metileno.

A resina neutralizada é agitada com aminoácido protegido com Boc, o qual é para ser o aminoácido C-terminal do péptido pretendido a ser sintetizado, e di-isopropilcarbodiimida (3 mmol cada) em cloreto de metileno, durante 1 hora, sendo, subsequentemente, a resina de aminoácido resultante feita circular através dos passos (a) a (f), no programa de lavagem anterior. Os outros aminoácidos (3 mmol) do péptido pretendido são, em seguida, acoplados sucessivamente pelo mesmo procedimento. O péptido acabado é clivado da resina por mistura do mesmo com anisole (5 mL), ditiotretitol (100 mg) e fluoreto de

hidrogénio anidro (35mL), a cerca de 0 °C e agitação durante cerca de 45 min. O excesso de fluoreto de hidrogénio é rapidamente evaporado sob uma corrente de azoto seco e o péptido livre é precipitado e lavado com éter. O péptido em bruto é, subsequentemente, dissolvido num volume mínimo de ácido acético diluído e eluído numa coluna (2,5 x 25 cm) de VYDAC® octadecilsilano sílica (10 mM) e eluído com um gradiente linear de 20-60% de acetonitrilo, durante cerca de 1 h em 0,1% de ácido trifluoroacético em água. As fracções são examinadas por cromatografia em camada fina e por cromatografia líquida analítica de elevada performance (40-70% B a 1%/min, solução B corresponde a 80% de acetonitrilo/água contendo 0,1% de TFA) e juntas para dar um máximo de pureza, em vez de rendimento. A liofilização repetida da solução em água origina o produto como um pó branco fofo.

O péptido resultante é analisado por HPLC. Uma análise de aminoácidos de um hidrolisado ácido do péptido resultante pode confirmar a composição do péptido. MS de dessorção com laser é utilizado para determinar a massa molecular do péptido.

O aminoácido protegido, ácido 1-[N-terc.-butoxicarbonil-amino]-1-ciclo-hexanocarboxílico (Boc-A6c-OH) foi sintetizado como se segue. 19,1 g (0,133 mol) de ácido 1-amino-1-ciclo-hexanocarboxílico (Acros Organics, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) foram dissolvidos em 200 mL de dioxano e 100 mL de água. A isto foram adicionados 67 mL de NaOH 2N. A solução foi arrefecida num banho de água gelada. 32,0 g (0,147 mol) de dicarbonato de di-terc.-butilo foram adicionados a esta solução. A mistura de reacção foi agitada durante a noite, à temperatura ambiente.

Subsequentemente, o dioxano foi removido sob pressão reduzida. Foram adicionados 200 mL de acetato de etilo à restante solução aquosa. A mistura foi arrefecida num banho de água gelada. O pH da camada aquosa foi ajustado para cerca de 3, por meio da adição de HCl 4N. A camada orgânica foi separada. A camada aquosa foi extraída com acetato de etilo (1 x 100 mL). As duas camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água (2 x 150 mL), secas em MgSO₄ anidro, filtradas e concentradas até à secura sob pressão reduzida. O resíduo foi recristalizado em acetato de etilo/hexanos. Foram obtidas 9,2 g de produto puro. 29% de rendimento.

Boc-A5c-OH foi sintetizado de forma análoga à de Boc-A6c-OH. Podem ser preparados outros aminoácidos Acc protegidos de uma forma análoga por uma pessoa de competência comum na técnica, tal como possibilitado pelos ensinamentos da presente.

Na síntese de um péptido desta invenção, contendo A5c, A6c e/ou Aib, o tempo de acoplamento é de cerca de 2 horas para estes resíduos e para o resíduo que imediatamente os sucede. Para a síntese de [Tma-His⁷]hGLP-1(7-36)NH₂, foram utilizados HBTU (2 mmol) e DIEA (1,0 mL) em 4 mL de DMF para reagir com a amina livre do N terminal da resina peptídica na última reacção de acoplamento; o tempo de acoplamento é de cerca de 2 horas.

Os nomes completos para as abreviaturas utilizadas acima são como se segue: Boc para t-butiloxicarbonilo, HF para fluoreto de hidrogénio, Fm para formilo, Xan para xantilo, Bzl para benzilo, Tos para tosilo, DNP para 2,4-dinitrofenilo, DMF para dimetilformamida, DCM para

diclorometano, HBTU para hexa-fluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio, DIEA para di-isopropiletilamina, HOAc para ácido acético, TFA para ácido trifluoroacético, 2ClZ para 2-clorobenziloxicarbonilo, 2BrZ para 2-bromobenziloxicarbonilo e OcHex para O-cilco-hexilo.

Um composto da presente invenção pode ser testado relativamente à actividade como um composto ligante de GLP-1, de acordo com o procedimento seguinte.

Cultura de células:

Células de insulinoma de rato RIN 5F (ATCC-# CRL-2058, American Type Culture Collection, Manassas, VA), que expressam o receptor de GLP-1, foram cultivadas em meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino, e mantidas a cerca de 37 °C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂/95% de ar.

Ligação do radioligando:

Foram preparadas membranas para estudos de ligação de radioligando por meio de homogeneização de células RIN em 20 mL de Tris-HCl 50 mM gelado, com um Brinkman Polytron (Westbury, NI), (posição 6, 15 s). Os homogenatos foram lavados duas vezes por centrifugação (39 000g/10 min), e os peletes finais foram ressuspensos em Tris-HCl 50 mM, contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mg/ml de bacitracina (Sigma Chemical, St. Louis, MO), e 0,1% de BSA. Para o ensaio, alíquotas (0,4 mL) foram incubadas com 0,05 nM de [¹²⁵I]GLP-1(7-36) (~2200 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA), com e sem 0,05 mL de péptidos de teste competidores não marcados. Após uma incubação de 100 min. (25 °C), o [¹²⁵I]GLP-1(7-36) ligado foi separado do livre por filtração

rápida através de filtros GF/C (Brandel, Gaithersburg, MD), os quais foram previamente ensopados em polietilenoimina 0,5%. Os filtros foram, em seguida, lavados três vezes com alíquotas de 5 mL de Tris-HCl 50 mM gelado, e a radioactividade ligada retida nos filtros foi contada por espectrometria gama (Wallac LKB, Gaithersburg, MD). A ligação específica foi definida como o total de [¹²⁵I]GLP-1(7-36) ligado menos o ligado na presença de GLP-1(7-36) 1000 nM (Bachem, Torrence, CA).

Os péptidos da presente invenção podem ser disponibilizados sob a forma de sais farmacologicamente aceitáveis. Exemplos de tais sais incluem, mas não se limitam àqueles formados com ácidos orgânicos (por exemplo, ácido acético, láctico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzóico, metanossulfónico, toluenossulfónico ou pamóico), ácidos inorgânicos (por exemplo, ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico) e ácidos poliméricos (por exemplo, ácido tânico, carboximetilcelulose, ácidos polilácticos, poliglicólicos ou copolímeros de ácidos poliláctico-glicólico). Um método típico para preparar um sal de um péptido da presente invenção é bem conhecido na técnica e pode ser realizado por meio de métodos standard de troca salina. Por conseguinte, o sal TFA de um péptido da presente invenção (o sal TFA resulta da purificação do péptido utilizando HPLC preparativo, eluindo com TFA contendo soluções tampão), pode ser convertido noutra sal, tal como um sal acetato, por meio da dissolução do péptido numa pequena quantidade de solução aquosa de ácido acético 0,25 N. A solução resultante é aplicada a uma coluna de HPLC semi-prep (Zorbax, 300 SB, C-8). A coluna é eluída com (1) solução aquosa de acetato de amónio 0,1 N, durante 0,5 h, (2) solução aquosa de ácido acético 0,25 N, 0,5 h, e (3)

um gradiente linear (20% a 100% de solução B, durante 30 min.), a uma velocidade de fluxo de 4mL/min. (a solução A é uma solução aquosa de ácido acético 0,25 N; a solução B é ácido acético 0,25 N em acetonitrilo/água, 80:20). As fracções contendo o péptido são colhidas e liofilizadas até à secura.

Como é bem conhecido daqueles peritos na técnica, as utilizações conhecidas e potenciais do GLP-1 são variadas e multifacetadas [vide, Todd, J.F., et al., Clinical Science, 1998, 95, pp. 325-329; e Todd, J.F., et al., European Journal of Clinical Investigation, 1997, 27, pp. 533-536]. Assim, a administração dos compostos desta invenção com o fim de desencadear um efeito agonista pode ter os mesmos efeitos e utilizações que o próprio GLP-1. Estas variadas utilizações de GLP-1 podem ser sumarizadas como se segue, tratamento de: diabetes do tipo I, diabetes do tipo II, obesidade, glucagonomas, perturbações secretoras das vias respiratórias, perturbação metabólica, artrite, osteoporose, doenças do sistema nervoso central, restenose e doenças neurodegenerativas. Os análogos de GLP-1 da presente invenção, que desencadeiam um efeito antagonista num sujeito, podem ser utilizados para tratar o seguinte: hipoglicémia e o síndrome de malabsorção associado a gastrectomia ou recessão do intestino delgado.

Por conseguinte, a presente invenção inclui no seu âmbito composições farmacêuticas compreendendo, como ingrediente activo, pelo menos um dos compostos de fórmula (I), em associação com um agente veicular ou diluente farmacêuticamente aceitáveis.

A dosagem de ingrediente activo nas composições da presente invenção pode ser variada; no entanto, é necessário que a quantidade do ingrediente activo seja tal que possibilite a obtenção de uma forma de dosagem apropriada. A dosagem seleccionada depende do efeito terapêutico pretendido, da via de administração, da duração do tratamento. Em geral, uma dosagem eficaz para as actividades da presente invenção encontra-se no intervalo de 1×10^{-7} a 200 mg/kg/dia, de preferência, 1×10^{-4} a 100 mg/kg/dia, a qual pode ser administrada como uma dose única ou dividida em doses múltiplas.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados por vias de administração oral, parentérica (por exemplo, injeção intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, ou implante), nasal, vaginal, rectal, sublingual ou tópica e podem ser formulados com agentes veiculares farmacologicamente aceitáveis, para originar formas de dosagem apropriadas para cada uma das vias de administração.

Formas de dosagem sólidas para administração oral incluem cápsulas, comprimidos, pílulas, pós e grânulos. Nas formas de dosagem sólidas deste tipo, o composto activo é misturado com pelo menos um agente veicular inerte farmacologicamente aceitável, tal como sucrose, lactose ou amido. Tais formas de dosagem compreendem, igualmente, como é prática corrente, substâncias adicionais, diferentes de tais diluentes inertes, por exemplo, agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio. No caso das cápsulas, comprimidos e pílulas, as formas de dosagem podem também compreender agentes tamponantes. Os comprimidos e as

pílulas podem, adicionalmente, ser preparados com revestimentos entéricos.

Formas de dosagem líquidas para administração oral incluem emulsões, soluções, suspensões, xaropes farmacologicamente aceitáveis, contendo os elixires diluentes inertes comumente utilizados na técnica, tais como água. Para além de tais diluentes inertes, as composições podem também incluir adjuvantes, tais como agentes molhantes, agentes emulsionantes e de suspensão, e agentes edulcorantes, aromáticos e perfumantes.

As preparações de acordo com a presente invenção para administração parentérica incluem soluções aquosas e não aquosas, suspensões ou emulsões estéreis. Exemplos de solventes não aquosos ou veículos são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, tais como azeite e óleo de milho, gelatina, e ésteres orgânicos injectáveis, tais como oleato de etilo.

Tais formas de dosagem podem, igualmente, conter adjuvantes, tais como agentes conservantes, molhantes, emulsionantes e dispersantes. Podem ser esterilizadas, por exemplo, por meio de filtração através de um filtro de retenção bacteriana, por meio da incorporação de agentes esterilizantes na composição, por meio de irradiação das composições ou por meio de aquecimento das composições. As mesmas podem, também, ser preparados sob a forma de composições sólidas estéreis, que podem ser dissolvidas em água estéril ou outro meio estéril injectável, imediatamente antes da sua utilização.

Composições para administração rectal ou vaginal são preferencialmente supositórios, os quais podem conter, para além da substância activa, excipientes, tais como manteiga de coca ou uma cera supositória.

As composições para administração nasal ou sublingual são, igualmente, preparadas com excipientes standard bem conhecidos na técnica.

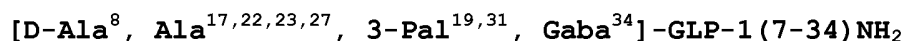
Para além disso, um composto da presente invenção pode ser administrado numa composição de libertação controlada, como as descritas nas seguintes patentes e pedidos de patente. A patente U.S. nº 5 672 659 divulga composições de libertação controlada compreendendo um agente bioactivo e um poliéster. A patente U.S. nº 5 595 760 divulga composições de libertação prolongada compreendendo um agente bioactivo numa forma gelificante. O pedido de patente U.S. nº 08/929 363, depositado a 9 de Setembro, 1997, divulga composições de libertação controlada poliméricas, compreendendo um agente bioactivo e um quitosano. O pedido de patente U.S. nº 08/740 778, depositado a 1 de Novembro, 1996, divulga composições de libertação controlada, compreendendo um agente bioactivo e uma ciclodextrina. O pedido de patente U.S. nº 09/015 394, depositado a 29 de Janeiro, 1998, divulga composições de libertação controlada absorvíveis de um agente bioactivo. O pedido de patente U.S. nº 09/121 653, depositado a 23 de Julho, 1998, divulga um processo para a preparação de micropartículas compreendendo um agente terapêutico, tal como um péptido num processo óleo-em-água. O pedido de patente U.S. nº 09/131 472, depositado a 10 de Agosto, 1998, divulga complexos compreendendo um agente terapêutico, tal como um péptido e um polímero fosforilado. O pedido de patente U.S. nº 09/184 413,

depositado a 2 de Novembro, 1998, divulga complexos compreendendo um agente terapêutico, tal como um péptido e um polímero possuindo uma lactona não polimerizável.

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos utilizados na presente possuem o mesmo significado que é usualmente entendido por alguém de competência comum na técnica a que esta invenção pertence.

Os exemplos que se seguem descrevem métodos sintéticos para a preparação de um péptido da presente invenção, métodos esses que são bem conhecidos daqueles peritos na técnica. Outros métodos são, igualmente, conhecidos daqueles peritos na técnica. Os exemplos são fornecidos para fins ilustrativos.

Exemplo 1



A resina de benzil-hidrilamina-poliestireno (Advanced Chem Tech, Inc. Louisville, KY) (0,9 g, 0,3 mmole) na forma de ião cloreto foi colocada num recipiente de reacção de um Advanced ChemTech peptide synthesizer Modelo 200, programado para realizar o seguinte ciclo de reacção: (a) cloreto de metileno; (b) 33% de ácido trifluoroacético em cloreto de metileno (2 vezes, durante 1 e 15 min. cada); (c) cloreto de metileno; (d) etanol; (e) cloreto de metileno; (f) 10% de di-isopropiletilamina em cloreto de metileno.

A resina neutralizada foi agitada com Boc-Gaba e di-isopropilcabodiimida (3 mmole cada) em cloreto de

metileno, durante 1 hora e a resina de aminoácido resultante foi, subsequentemente, feita circular através dos passos (a) a (f), no programa de lavagem anterior. Os seguintes aminoácidos (3 mmole) foram, então, acoplados sucessivamente, pelo mesmo procedimento: Boc-Val; Boc-Leu, Boc-3-Pal, Boc-Ala, Boc-Ile, Boc-Phe, Boc-Ala, Boc-Lys(2-Cl-Z), Boc-Ala, Boc-Ala, Boc-Ala, Boc-Ala, Boc-Glu(Bzl), Boc-Leu, Boc-3-Pal, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ala, Boc-Val, Boc-Asp(Bzl), Boc-Ser(Bzl), Boc-Thr(Bzl), Boc-Phe, Boc-Thr(Bzl), Boc-Gly, Boc-Glu(Bzl), Boc-D-Ala, Boc-His(Bom).

A resina com a sequência peptídica completa foi misturada com anisole (5 mL), ditiotretitol (100 mg) e fluoreto de hidrogénio anidro (35 mL), a cerca de 0 °C e agitada durante cerca de 45 min. O excesso de fluoreto de hidrogénio foi rapidamente evaporado sob uma corrente de azoto seco e o péptido livre precipitado e lavado com éter. O péptido em bruto foi, subsequentemente, dissolvido num volume mínimo de ácido acético diluído e eluído numa coluna (2,5 x 25 cm) de VYDAC® octadecilsilano sílica (10 mM) e eluído com um gradiente linear de 20-60% de acetonitrilo, durante cerca de 1 h em 0,1% de ácido trifluoroacético em água. As fracções foram examinadas por cromatografia em camada fina e cromatografia líquida analítica de elevada performance (40-70% de B a 1%/min; t.r.: 14,1 min) e reunidas para originar um máximo de pureza, em vez de rendimento. Liofilizações repetidas da solução a partir de água originam o produto (49,9 mg) como um pó branco fofo.

O produto mostrou ser homogéneo por HPLC e TLC. A análise de aminoácidos de um hidrolisado ácido confirma a

composição do péptido. MS de dessorção com laser originou uma massa molecular de 2880 (Calc. M+H 2873).

Exemplo 2

Síntese de alquilamidas inferiores peptídicas

Os péptidos são construídos numa resina de O-benzil-poliestireno (frequentemente referida como resina de Merrifield), utilizando o protocolo de aminoácidos Boc descrito no Exemplo 1, excepto que as cadeias laterais carboxilo dos aminoácidos Asp e Glu são protegidas com um grupo Fm (éster de fluorenilmetilo). As resinas peptídicas completas são suspensas em soluções de DMF diluídas de uma alquilamina apropriada (tal como, etilamina, propilamina, feniletilamina, 1,2-diaminoetano etc.) e agitadas a cerca de 60 °C (durante cerca de 18 horas), em que após filtração, remoção de solventes sob pressão reduzida e trituração do óleo peptídico clivado com éter, resulta um péptido de alquilamida protegido sólido. Este é, em seguida, sujeito a clivagem em HF para remoção de grupos protectores da cadeia lateral adicionais e a purificação por HPLC como descrito no Exemplo 1.

Exemplo 11

O Exemplo 11 foi realizado essencialmente de acordo com o procedimento descrito para o Exemplo 1, mas utilizando o aminoácido protegido apropriado, para originar o péptido indicado. MS foram obtidos por MS de dessorção com laser (NA significa não disponível).

Exemplo 11: **[Hppa⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; MS = NA**

Exemplo 12**[Aib⁸, A6c³²]hGLP-1(7-36)NH₂**

O péptido do título foi sintetizado num Applied Biosystems (Foster City, CA) modelo 430A peptide synthesizer, o qual foi modificado para fazer síntese de péptidos em fase sólida com química Boc acelerada. Vide Schnolzer, *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40:180 (1992). Foi utilizada resina de 4-metilbenzidrilamina (MBHA) (Peninsula, Belmont, CA) com a substituição de 0,91 mmol/g. Os aminoácidos Boc (Bachem, CA, Torrance, CA; Nova Biochem, LaJolla, CA) foram utilizados com a seguinte protecção da cadeia lateral: Boc-Ala-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, Boc-His(DNP)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Lys(2ClZ)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-A6c-OH, Ser(Bzl)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH e Boc-Trp(Fm)-OH. A síntese foi realizada a uma escala de 0,20 mmol. Os grupos Boc foram removidos por tratamento com 100% de TFA durante 2 x 1 min. Os aminoácidos Boc (2,5 mmol) foram pré-activados com HBTU (2,0 mmol) e DIEA (1,0 mL) em 4 mL de DMF e acoplados sem neutralização prévia da resina peptídica do sal TFA. Os tempos de acoplamento foram de cerca de 5 min., excepto para os resíduos Boc-Aib-OH e Boc-A6c-OH e os seguintes resíduos, Boc-Trp(Fm)-OH e Boc-His(DNP)-OH, em que os tempos de acoplamento foram de cerca de 2 horas.

No final da construção da cadeia peptídica, a resina foi tratada com uma solução de 20% de mercaptoetanol/10% de DIEA em DMF, durante 2 x 30 min., para remover o grupo DNP na cadeia lateral da His. O grupo Boc N-terminal foi, em seguida, removido, por tratamento com 100% de TFA, durante

2 x 2 min. Após a neutralização da resina peptídica com 10% de DIEA em DMF (1 x 1 min.), o grupo formilo na cadeia lateral do Trp foi removido por tratamento com uma solução de 15% de etanolamina/15% de água/70% de DMF, durante 2 x 30 min. A resina peptídica parcialmente desprotegida foi lavada com DMF e DCM e seca sob pressão reduzida. A clivagem final foi realizada por agitação da resina peptídica em 10 mL de HF, contendo 1 mL de anisole e ditiotreitol (24 mg), a 0 °C, durante cerca de 75 min. O HF foi removido com um fluxo de azoto. O resíduo foi lavado com éter (6 x 10 mL) e extraído com HOAc 4N (6 x 10 mL).

A mistura peptídica no extracto aquoso foi purificada numa cromatografia líquida preparativa de elevada pressão de fase reversa (HPLC), utilizando uma coluna de fase reversa VYDAC® C₁₈ (Nest Group, Southborough, MA). A coluna foi eluída com um gradiente linear (20% a 50% de solução B, durante 105 min), a uma velocidade de fluxo de 10mL/min. (Solução A = água contendo 0,1% de TFA; Solução B = acetonitrilo, contendo 0,1% de TFA). As fracções foram colhidas e analisadas em HPLC analítico. Aquelas contendo o produto puro foram combinadas e liofilizadas até a secura. Foram obtidos 92 mg de um sólido branco. A pureza foi >99%, com base numa análise de HPLC analítico. Uma análise de espectrometria de massa de electrospray originou a massa molecular de 3324,2 (a massa molecular calculada é de 3323,7).

A síntese de outros compostos da presente invenção pode ser realizada do mesmo modo como descrito para a síntese de [Aib⁸, A6c³²]hGLP-1(7-36)NH₂ no Exemplo 12 anterior, mas utilizando os aminoácidos protegidos apropriados, dependendo do péptido pretendido.

[$(N^{\alpha}\text{-HEPES-His})^7$]hGLP-1(7-36)NH₂ (HEPES é (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino-etanossulfónico)) pode ser sintetizado como se segue: após construção da cadeia peptídica longa em resina de MBHA (0,20 mmol), a resina peptídica é tratada com 100% de TFA (2 x 2 min.) e lavada com DMF e DCM. A resina é, subsequentemente, neutralizada com 10% de DIEA em DMF, durante cerca de 2 min. Após lavagem com DMF e DCM, a resina é tratada com 0,23 mmol de cloreto de 2-cloro-1-etanossulfonilo e 0,7 mmol de DIEA em DMF, durante cerca de 1 hora. A resina é lavada com DMF e DCM e tratada com 1,2 mmol de 2-hidroxietilpiperazina, durante cerca de 2 horas. A resina é lavada com DMF e DCM e tratada com diferentes reagentes ((1) 20% de mercaptoetanol/10% de DIEA em DMF e (2) 15% de etanolamina/15% de água/70% de DMF), para remover o grupo DNP da cadeia lateral da His e o grupo formilo da cadeia lateral de Trp, como descrito anteriormente, antes da clivagem final do péptido da resina com HF.

[$(N^{\alpha}\text{-HEPA-His})^7$]hGLP-1(7-36)NH₂, ([4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoacetil)-His⁷]hGLP-1(7-36)NH₂), pode ser preparada essencialmente de acordo com o procedimento descrito imediatamente acima para preparar [$(N^{\alpha}\text{-HEPES-His})^7$]hGLP-1(7-36)NH₂, excepto que é utilizado anidrido 2-bromoacético em vez de cloreto de 2-cloro-1-etanossulfonilo.

Exemplo 13-15

Os Exemplos 13-15 foram realizados essencialmente de acordo com o Exemplo 12, mas utilizando o aminoácido protegido apropriado.

Exemplo 13:

[Ura⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; MS = 3279,5; Calc. MW =3280,7.

Exemplo 14:

[Paa⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; MS = 3290,9; Calc. MW =3291,8.

Exemplo 15:

[Pta⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; MS = 3311,2; Calc. MW =3311,8.

Exemplo 16

[Aib⁸, A6c³², Lys³⁶(N^ε-tetradecanoil)]hGLP-1(7-36)NH₂

Os aminoácidos Boc a serem utilizados são os mesmos que para a síntese de [Aib⁸, A6c³²]hGLP-1(7-36)NH₂ (Exemplo 12), excepto que neste caso é utilizado Fmoc-Lys(Boc)-OH para o resíduo de Lys³⁶(N^ε-tetradecanoilo). O primeiro resíduo de aminoácido é acoplado à resina manualmente num agitador. 2,5 mmol de Fmoc-Lys(Boc)-OH são dissolvidos em 4 mL de HBTU 0,5N em DMF. À solução adiciona-se 1 mL de DIEA. A mistura é agitada durante cerca de 2 min. Subsequentemente, adiciona-se à solução 0,2 mmol de resina MBHA (substituição = 0,91 mmol/g). A mistura é agitada durante cerca de 1 h. A resina é lavada com DMF e tratada com 100% de TFA por 2x2 min., para remover o grupo protector Boc. A resina é lavada com DMF. Ácido mirístico (2,5 mmol) é pré-activado com HBTU (2,0 mmol) e DIEA (1,0 mL) em 4 mL de DMF, durante 2 min. e acoplado à resina Fmoc-Lys. O tempo de acoplamento é de cerca de 1 h. A resina é lavada com DMF e tratada com 25% de piperidina em DMF, por 2x20 min., para remover o grupo protector Fmoc. A resina é lavada com DMF e transferida para um recipiente de reacção do sintetizador peptídico. O restante da síntese e os procedimentos de purificação do péptido são os mesmos que para a síntese de [Aib⁸, A6c³²]hGLP-1(7-36)NH₂.

As sínteses de outros compostos contendo o resíduo Lys[N^ε-alcanoilo) são realizadas de um modo análogo ao descrito para a síntese de [Aib⁸, A6c³², Lys³⁶(N^ε-octanoil)]hGLP-1(7-36)NH₂. O aminoácido Fmoc-Lys(Boc)-OH é utilizado para o resíduo de Lys(N^ε-alcanoilo) no péptido, enquanto que o aminoácido Boc-Lys(2ClZ)-OH é utilizado para o resíduo de Lys. Caso o resíduo Lys[N^ε-alcanoilo) não se encontrar no terminal C, é primeiro construído na resina, no sintetizador peptídico, o fragmento peptídico imediatamente antes ao resíduo Lys[N^ε-alcanoilo).

Exemplo 17

[Aib⁸, Arg^{26,34}, A6c³², Lys³⁶(N^ε-tetradecanoil)]hGLP-1(7-36)-OH

Os aminoácidos Boc a serem utilizados são os mesmos que os utilizados na síntese de [Aib⁸, A6c³², Lys³⁶(N^ε-tetradecanoil)]hGLP-1(7-36)NH₂ (Exemplo 16). Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,5 mmol) é pré-ativado com HBTU (2,0 mmol), HOBT (2,0 mmol) e DIEA (2,5 mL) em DMF (4 mL), durante cerca de 2 min. Este aminoácido é acoplado a 235 mg de resina PAM (Chem-Impex, Wood Dale, IL; substituição = 0,85 mmol/g) manualmente, num agitador. O tempo de acoplamento é de cerca de 8 horas. O restante da síntese e os procedimentos de purificação para preparar o péptido são os mesmos que os descritos no Exemplo 52.

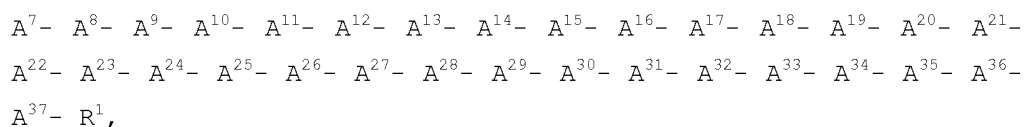
As sínteses de outros análogos de hGLP-1(7-36)-OH e hGLP-1(7-37)-OH, que contêm o resíduo Lys[N^ε-alcanoilo) são realizadas de um modo semelhante ao descrito para a síntese de [Aib⁸, Arg^{26,34}, A6c³², Lys³⁶(N^ε-tetradecanoil)]hGLP-1(7-

36)-OH. O aminoácido Fmoc-Lys(Boc)-OH é utilizado para o resíduo Lys[N^ε-alcanoilo) no péptido, enquanto que o aminoácido Boc-Lys(2-ClZ)-OH é utilizado para o resíduo Lys.

Lisboa, 20 de Maio de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto de fórmula (I),



(I)

em que

A^7 é ácido urocânico (Ura), ácido *trans*-3-(3-piridil)acrílico (Paa), ácido (4-piridiltioacético (Pta) ou ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (Hppa);

A^8 é Ala, D-Ala, Aib, Acc, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala, Arg ou N-Me-Gly;

A^9 é Glu, N-Me-Glu, N-Me-Asp ou Asp;

A^{10} é Gly, Acc, Ala, D-Ala, Phe ou Aib;

A^{11} é Thr ou Ser;

A^{12} é Phe, Acc, Aic, Aib, 3-Pal, 4-Pal, β -Nal, Cha, Trp ou X^1 -Phe;

A^{13} é Thr ou Ser;

A^{14} é Ser, Thr, Ala ou Aib;

A^{15} é Asp, Ala, D-Asp ou Glu;

A^{16} é Val, D-Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Abu, Ala, D-Ala, Tba ou Cha;

A^{17} é Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc ou Thr;

A^{18} é Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc ou Thr;

A^{19} é Tyr, D-Tyr, Cha, Phe, 3-Pal, 4-Pal, Acc, β -Nal, Amp ou X^1 -Phe;

A^{20} é Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Val, Phe ou X^1 -Phe;

A^{21} é Glu, Ala ou Asp;

A^{22} é Gly, Acc, Ala, D-Ala, β -Ala ou Aib;

A^{23} é Gln, Asp, Ala, D-Ala, Aib, Acc, Asn ou Glu;

A^{24} é Ala, Aib, Val, Abu, Tle ou Acc;

A^{25} é Ala, Aib, Val, Abu, Tle, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn, HN-CH((CH₂)_n-NR¹⁰R¹¹)-C(O) ou HN-CH((CH₂)_e-X³)-C(O);

A^{26} é Lys, Ala, 3-Pal, 4-Pal, Arg, hArg, Orn, Amp, HN-CH((CH₂)_n-NR¹⁰R¹¹)-C(O) ou HN-CH((CH₂)_e-X³)-C(O);

A^{27} é Glu, Ala, D-Ala ou Asp;

A^{28} é Phe, Ala, Pal, β-Nal, X¹-Phe, Aic, Acc, Aib, Cha ou Trp;

A^{29} é lle, Acc, Aib, Leu, Nle, Cha, Tle, Val, Abu, Ala, Tba ou Phe;

A^{30} é Ala, Aib, Acc ou inexistente;

A^{31} é Trp, Ala, β-Nal, 3-Pal, 4-Pal, Phe, Acc, Aib, Cha, Amp ou inexistente;

A^{32} é Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, lle, Cha, Tle, Phe, X¹-Phe, Ala ou inexistente;

A^{33} é Val, Acc, Aib, Leu, lle, Tle, Nle, Cha, Ala, Phe, Abu, X¹-Phe, Tba, Gaba ou inexistente;

A^{34} é Lys, Arg, hArg, Orn, Amp, Gaba, HN-CH((CH₂)_n-NR¹⁰R¹¹)-C(O), HN-CH((CH₂)_e-X³)-C(O) ou inexistente;

A^{35} é Gly ou inexistente;

A^{36} é L- ou D-Arg, D- ou L-Lys, D- ou L-hArg, D- ou L-Orn, Amp, HN-CH((CH₂)_n-NR¹⁰R¹¹)-C(O), HN-CH((CH₂)_e-X³)-C(O) ou inexistente;

A^{37} é Gly ou inexistente;

X¹, para cada ocorrência, é independentemente seleccionado do grupo consistindo de (C₁-C₆)-alquilo, OH e halo;

R¹ é OH, NH₂, (C₁-C₁₂)alcoxi ou NH-X²-CH₂-Z⁰, em que X² é um agrupamento (C₁-C₁₂)hidrocarboneto, e Z⁰ é H, OH, CO₂H ou CONH₂;

X³ é



ou -C(O)-NHR¹², em que X⁴, para cada ocorrência, é independentemente -C(O)-, -NH-C(O)- ou -CH₂- e f, para cada

ocorrência, é independentemente um número inteiro de 1 a 29;

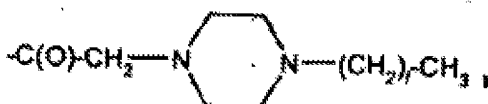
e, para cada ocorrência, é independentemente um número inteiro de 1 a 4;

n, para cada ocorrência, é independentemente um número inteiro de 1-5; e

R^{10} e R^{11} , para cada ocorrência, são cada um, independentemente, H, (C_1-C_{30}) alquilo, (C_1-C_{30}) acilo, (C_1-C_{30}) alquilsulfonilo, $-C((NH)(NH_2))$ ou



desde que, quando R^{10} é (C_1-C_{30}) acilo, (C_1-C_{30}) alquilsulfonilo, $-C((NH)(NH_2))$ ou



R^{11} é H ou (C_1-C_{30}) alquilo; e

R^{12} é (C_1-C_{30}) alquilo;

ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

2. Um composto de acordo com a reivindicação 1 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que A^{11} é Thr, A^{13} é Thr; A^{14} é Ser, Aib ou Ala; A^{17} é Ser, Ala, Aib ou D-Ala; A^{18} é Ser, Ala, Aib ou D-Ala; A^{21} é Glu ou Ala; A^{23} é Gln, Glu ou Ala; e A^{27} é Glu ou Ala.

3. Um composto de acordo com a reivindicação 2 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que A^9 é Glu, N-Me-Glu ou N-Me-Asp; A^{12} é Phe, Acc ou Aic; A^{16} é Val,

D-Val, Acc, Aib, Ala, Tle ou D-Ala; A¹⁹ é Tyr, 3-Pal, 4-Pal ou D-Tyr; A²⁰ é Leu, Acc, Cha, Ala ou Tle; A²⁴ é Ala, Aib ou Acc; A²⁵ é Ala, Aib, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn, HN-CH((CH₂)_n-NHR¹⁰)-C(O); A²⁸ é Phe ou Ala; A²⁹ é lle, Acc ou Tle; A³⁰ é Ala, Aib ou inexistente; A³¹ é Trp, Ala, 3-Pal, 4-Pal ou inexistente; A³² é Leu, Acc, Cha, Ala ou inexistente; A³³ é Val, Acc, Ala, Gaba, Tle ou inexistente.

4. Um composto de acordo com a reivindicação 3 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que A⁸ é Ala, D-Ala, Aib, ácido 1-amino-1-ciclo-hexanocarboxílico (A6c), ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (A5c), N-Me-Ala, N-Me-D-Ala ou N-Me-Gly; A¹⁰ é Gly, Ala, D-Ala ou Phe; A¹² é Phe, ácido 1-amino-1-ciclo-hexanocarboxílico (A6c) ou ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (A5c); A¹⁶ é Val, Ala, Tle, ácido 1-amino-1-ciclo-hexanocarboxílico (A6c), ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (A5c) ou D-Val; A²⁰ é Leu, ácido 1-amino-1-ciclo-hexanocarboxílico (A6c), ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (A5c), Cha, Ala ou Tle; A²² é Gly, Aib, β-Ala, L-Ala ou D-Ala; A²⁴ é Ala ou Aib; A²⁹ é lle, ácido 1-amino-1-ciclo-hexanocarboxílico (A6c), ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (A5c) ou Tle; A³² é Leu, ácido 1-amino-1-ciclo-hexanocarboxílico (A6c), ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (A5c), Cha, Ala ou inexistente; A³³ é Val, ácido 1-amino-1-ciclo-hexanocarboxílico (A6c), ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (A5c), Ala, Gaba, Tle ou inexistente.

5. Um composto de acordo com a reivindicação 4 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que R¹ é OH ou NH₂.

6. Um composto de acordo com a reivindicação 1, em que o referido composto é [Hppa⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂ (SEQ ID NO: 87) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

7. Um composto de acordo com a reivindicação 1, em que o referido composto é
[Ura⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; SEQ ID NO: 125;
[Paa⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; SEQ ID NO: 126; ou
[Pta⁷]hGLP-1(7-36)-NH₂; SEQ ID NO: 127 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

8. Uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de um composto de acordo com a reivindicação 1 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e um agente veicular ou um diluente farmacologicamente aceitáveis.

9. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo na preparação de um medicamento para desencadear um efeito agonista de um receptor de GLP-1, num sujeito com necessidade do mesmo.

10. Utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1 ou de um sal farmacologicamente aceitável do mesmo na preparação de um medicamento para tratar uma doença seleccionada do grupo constituído por diabetes do tipo I, diabetes do tipo II, obesidade, glucagonomas, perturbações secretoras das vias respiratórias, perturbação metabólica, artrite, osteoporose, doença do sistema nervoso central, restenose e doença neurodegenerativa, falha renal, falha cardíaca congestiva, síndrome nefrótico, cirrose,

edema pulmonar e hipertensão, num sujeito necessitado do mesmo.

11. A utilização de acordo com a reivindicação 10, em que a referida doença é diabetes do tipo I ou diabetes do tipo II.

Lisboa, 20 de Maio de 2008