


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

02 089803 00

ATORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Indicación: 92005643 00000000 Folios: 123 acción
 Fecha (MM): 2002-10-04 17:39:09
 Trámite: 1 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAR
 Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1 SOLICITUD DE ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre BAYER CORPORATION sociedad constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Indiana, Estados Unidos de América. Dirección 100 Bayer Road Pittsburgh, Pennsylvania 15205, Estados Unidos de América Teléfono 548 09 70 E-mail clientes@camyp.com Fax 249 40 70 Domicilio Pittsburgh, Pennsylvania, Estados Unidos de América	IDENTIFICACION CC ☐ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Número _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre Emilio Ferrero Dirección Carrera 4ª No 72-35 Teléfono 347 38 11 E-mail caveller@caveller.com Fax 217 92 11 Domicilio Bogotá, Colombia	IDENTIFICACION CC ☒ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Número <u>438.019</u> TP <u>31.929</u>	
4 INVENTOR(ES) (72)	1- Clark PAN 22362 Princeton Place Castro Valley, California 94552 Estados Unidos de América 2- James WHELAN 210 Summer Hill Road, Madison, Connecticut 06443 Estados Unidos de América		IDENTIFICACION CC ☐ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Número _____
5 TITULO (54) PEPTIDOS QUE ACTUAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGON Y SUS METODOS DE USO FARMACOLOGICO			
6 Clasificación Internacional (51) C07K 007/010 A61K 38/00			
7 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen US US	(32) Fecha 5 de octubre de 2001 6 de septiembre de 2002	(31) Número de Solicitud 60/327 730 / 1900 60/408 288
8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ Otro ☐			
9 Comprobante de pago No 02-63.529 Fecha 23 de septiembre de 2002 Comprobante de pago No 02-63.483 Fecha 23 de septiembre de 2002 Comprobante de pago No 02-63.484 Fecha 23 de septiembre de 2002			

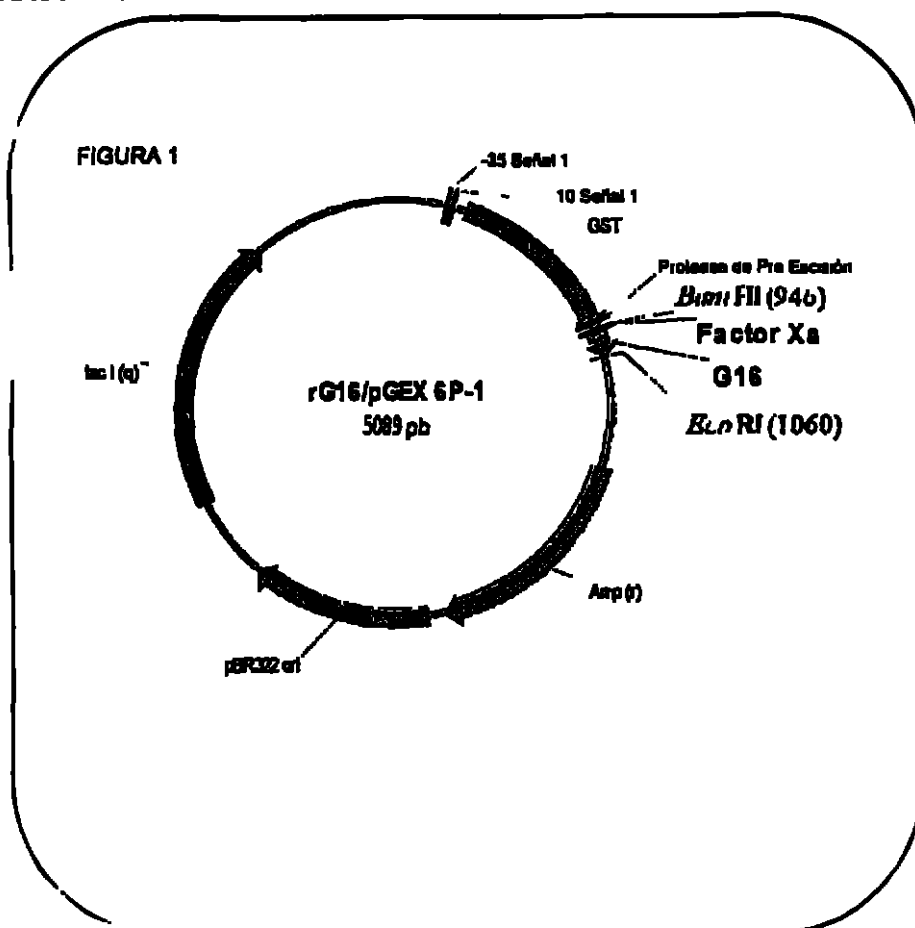
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud \$378000=-
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad \$106 000 9/10
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Copia certificada de la primera solicitud si se reivindica prioridad No 69323730
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12

11

FIGURA CARACTERISTICA.



12

NOMBRE EMILIO FERRERO

FIRMA *Emilio Ferrero*
C C 438 019 de Usaquén T.P.A. 31 929



CONSULADO DE COLOMBIA
WASHINGTON, D C

9597
5786

No. 1040

EL CONSULADO DE COLOMBIA
CERTIFICA

Que es auténtica la firma de PATRICK O HATCHETT
quien el día 19 DE ABRIL DEL 2000
desempeñaba las funciones de OFICIAL DE AUTENTICACIONES DEPARTAMENTO DE ESTADO
la cual aparece al pie de los documentos anexos relacionados con REPRESENTACION Y PODER.

Dado en Washington, D.C. a los VEINTICINCO (25) días del mes de
ABRIL del año dos mil (2000)

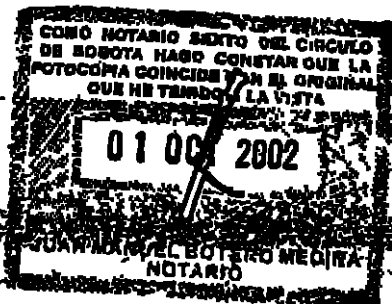
Pagado Impuesto de Timbre 7=

Pagado Derecho Consular 15=

Total 22=

(El Consulado no asume ninguna
responsabilidad por el contenido de los
documentos anexos)

Jaqueline Espitia Arias
JACQUELINE ESPITIA ARIAS
Vicecónsul



41996
8931

00034295-4

United States of America



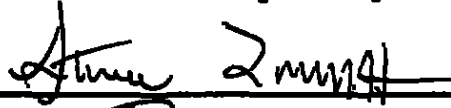
DEPARTMENT OF STATE

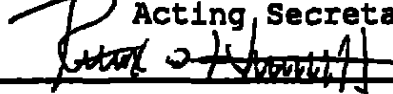
To all to whom these presents shall come, Greetings:



I Certify That the document hereunto annexed is under the Seal of the State(s) of Connecticut, and that such Seal(s) is/are entitled to full faith and credit *

In testimony whereof, I, Strobe Talbott, Acting Secretary of State, have hereunto caused the seal of the Department of State to be affixed and my name subscribed by the Assistant Authentication Officer, of the said Department, at the city of Washington, in the District of Columbia, this nineteenth day of April, 2000



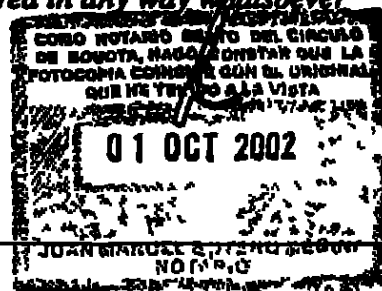
Acting Secretary of State
By 

Assistant Authentication Officer,
Department of State

Issued pursuant to CIOIV Stat. of
Sept. 15, 1789, 1 Stat. 68-69; 22
USC 2657-22 USC 2651a; 5 USC
301-28 USC 1733 et. seq.; 8 USC
1443(f); RULE 44 Federal Rules of
Civil Procedure.

*For the contents of the annexed document, the Department assumes no responsibility

This certificate is not valid if it is removed or altered in any way whatsoever

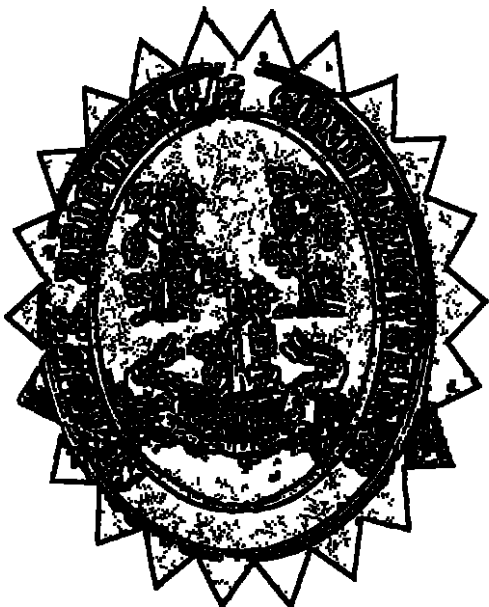




**STATE OF CONNECTICUT
OFFICE OF THE SECRETARY OF THE STATE**

I, **SUSAN BYSIEWICZ**, Secretary of the State of Connecticut and keeper of the seal thereof,

DO HEREBY CERTIFY, that DEBORAH COLLINS, was duly elected or appointed to the office of ASSISTANT CITY AND TOWN CLERK, for the town of WEST HAVEN in the County of NEW HAVEN in said state, for the term of DECEMBER 5, 1999 to DECEMBER 2, 2001.



and that to his/her acts and attestations as such, full faith and credit are and ought to be given in and out of Court

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the Great Seal of the State of Connecticut, at Hartford, on April 14, 2000

Susan Bysiewicz

Secretary of the State



6



STATE OF CONNECTICUT
COUNTY OF New Haven

} ss. West Haven

I, Deborah Collins Asst., Clerk of the Town of West Haven

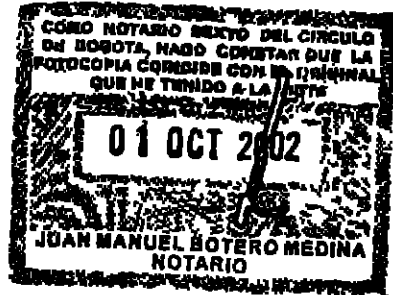
in said County do hereby certify that Elaine Porter
by and before whom the foregoing (or annexed) acknowledgment was taken, was at the time of taking the same
a notary public (or other officer) residing (or authorized to act) in said County, and was authorized by the laws
of said State to take and certify acknowledgments in said State, and, further, that I believe that the signature to
the certificate of acknowledgment is genuine.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the State and Town this

13th day of April 1902000

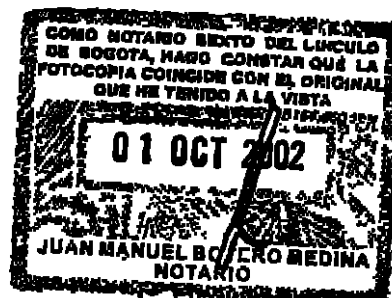
Deborah Collins
Asst. Town Clerk

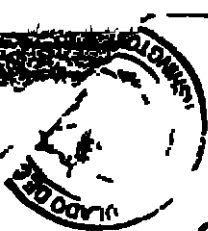
ADKINS FORM 202



Subscribed and sworn to before me this 10th day of April, 2000

Elaine Porter
ELAINE PORTER
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES JUNE 30, 2001





CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72-38
BOGOTÁ, COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)

BAYER CORPORATION

of/domiciliado (s) en 100 BAYER ROAD, PITTSBURGH PENNSYLVANIA 15205,

UNITED STATES OF AMERICA

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31828; GONZALO PERDOMO, tpa. 831 LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23855 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-38, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1° del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (autorizo) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales, el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiales.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31828; GONZALO PERDOMO, tpa. 831 LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23855 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-38, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy 11th day of April,

in/en West Haven, Connecticut, United States of America

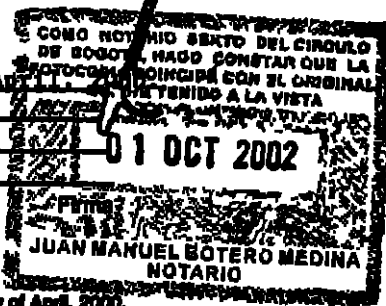
Signature

Name: Juan M. Botero Medina

Title: Vice President, Patents and Licensing

Subscribed and sworn to before me this 11th day of April, 2000.

CAVELIER ABOGADOS
(Minuta N° 12.11.2.8.USA)



ELAINA J. L. J.
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES JUNE 30, 2001

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de 19__

ante mí, Notario Público de _____

compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público _____

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

CERTIFICADO (PARA SOCIEDAD)

De conformidad con las leyes de Estados Unidos de América yo soy el funcionario que tiene la facultad legal de certificar acerca de la existencia y representación de la Sociedad/Compañía.

denominada BAYER CORPORATION

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:

Ver ABATO

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1 Que BAYER CORPORATION

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente

de acuerdo con las leyes de Estado de Indiana,

Estados Unidos de América

2.2 Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania

15205, Estados Unidos de América

2.3. Que el objeto u objeto de la presente es el poder están comprendidos dentro de las actividades de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr (Sra.) JEFFREY M. GREENMAN

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente poder

Ciudad West Haven

Estado Connecticut

Hoy 12 Abr / de 2000

Signature _____

Nombre del funcionario

Cargo

Firma _____

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

1. Artículos de Constitución de fecha 6 MARZO 1996 en Indianapolis, Indiana U.S.A.

2. Artículos de fusión de Bayer USA y Bayer Corporation

4. Miles Financial Services a Miles Inc. y

Cambio de nombre a Bayer Corporation, certificado

por el Secretario de Estado de Indiana en Indianapolis

9 CAVALIER ABOGADOS el 10 Abr / 1995

3. Estatutos de Bayer Corporation de 10 Abr / 1995

4. Resolución de la Junta Directiva de Miles Inc.

Antes Bayer Corporation de una reunión de la Junta

fecha 22 Nov. 1991 autorizando funciones para firmar documentos legales en nombre de la

Sociedad

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____, 19__

before me a Notary Public of _____

personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

Notary Public _____

* Documents must be identified with date and origin.

CERTIFICATE (FOR CORPORATION)

According to the laws of the United States of America I am the official who has the legal function to certify about the existence and representation of Corporation/Company

named BAYER CORPORATION

I Certify

1. That I have seen the following documents:

See below -

2. That the above documents duly prove the following:

2.1 That BAYER CORPORATION

is a Corporation/Company legally constituted and in existence

in accordance with the laws of the State of Indiana,

United States of America

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania 15205

United States of America

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company

2.4. That Mr (Messrs.) Jeffrey M. Greenman

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City West Haven

State Connecticut

This 12th day of April 2000.

Name of Attesting Officer: George J. Lykos
Position held: Vice President, Assistant General Counsel and Assistant Secretary

Signature _____

* Documents must be identified with date and origin

1. Articles of Incorporation of Miles Inc. filed and approved 6 March 1998, Indianapolis, Indiana, U.S.A.

2. Articles of Merger of Bayer U.S.A. Inc. and Bayer Corporation, and Miles Financial Services Inc. into Miles Inc. and change of name of the survivor to Bayer Corporation; certified by the Secretary of State of the State of Indiana, at Indianapolis, Indiana, 10 April 1998.

3. Bylaws of Bayer Corporation effective as of April 1 1998.

4. Resolution of the Board of Directors of Miles Inc., now Bayer Corporation, at a meeting of the Board held 22 November 1991, authorizing corporate officers to execute legal instruments on behalf of the corporation.

firmar documentos legales en nombre de la

Sociedad

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0806001 del inglés al español de los sellos y autenticaciones que aparecen en el documento de poder otorgado por BAYER CORPORATION, preparada por Jaime Armand Garavito Burgos, Traductor Oficial debidamente reconocido por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobado por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia mediante Resolución N° 034 de enero 11 de 1983

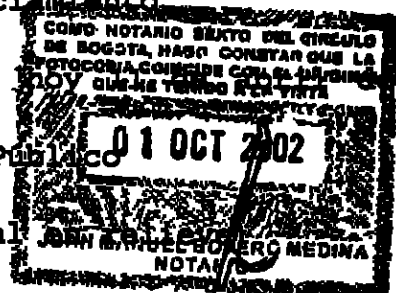
Documento escrito en inglés y español por medio del cual BAYER CORPORATION, otorga poder a favor de EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ y GERMÁN CAVELIER Dado y firmado el 11 de abril del 2000 en West Haven, Connecticut, Estados Unidos de América (firmado) Jeffrey M Greeman

Nombre Jeffrey M Greenman

Cargo Vicepresidente, Patentes y Licenciamiento

Suscrito y juramentado en mi presencia hoy 10 de abril del 2000 (firmado) ELAINE PORTER, Notario Público

(Sello notarial en tinta y sello notarial en relieve)



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y en español referente a la existencia legal de la sociedad BAYER CORPORATION y su representante autorizado Jeffrey M Greenman, expedida el 12 de abril del 2000 en West Haven, Connecticut, Estados Unidos de América

Suscrito y juramentado en mi presencia hoy 10 de abril del 2000 (firmado) ELAINE PORTER, Notario Público

(Sello notarial en tinta y sello notarial en relieve)

(Aparece escudo impreso)

ESTADO DE CONNECTICUT

)

declaración juramentada

West Haven

CONDADO DE New Haven

Yo, Deborah Collins, Subsecretario de la ciudad de West Haven en dicho condado, por medio del presente certifico que Elaine Porter por quien ante quien se hizo el reconocimiento anterior (anexo), era en el momento de hacerlo un notario público (u tro funcionario) residente (o autorizado para actuar) en dicho Condado y estaba autorizado por las leyes de dicho Estado para hacer y certificar reconocimientos en dicho Estado Certifico además que creo que la firma en dicho certificado de reconocimiento es auténtica

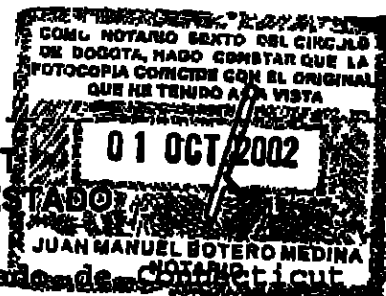
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he estampado mi firma y el sello del estado y ciudad hoy 13 de abril del 2000

(firmado) Deborah Collins, Subsecretaria del Poblado

(Aparece sello en relieve)

ADMS3 FORMATO 223

ESTADO DE CONNECTICUT
OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO



Yo, SUSAN BYSIEWICZ, Secretario del Estado de Connecticut

guardián de su sello,

POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO que DEBORAH COLLINS, fue debidamente electa o nombrada al cargo de SUBSECRETARIA DE CIUDAD Y DE PUEBLO, para la población de WEST HAVEN en el Condado de NEW HAVEN en dicho estado, por el período comprendido entre DICIEMBRE 5. 1999 y DICIEMBRE 2. 2001.

(Aparece adherido sell dorado)

y que se da y deberá darse plena fe y crédito a sus actos y testimonios como tales, tanto procesal como extraprocesalmente
En testimonio de lo cual, he estampado mi firma y el Gran Sello del Estado de Connecticut en Hartford el 14 de abril del 2000
(firmado) Susan Bysiewicz, Secretaria del Estado

N° 00034295-4

Estados Unidos de America
(Aparece escudo)

DEPARTAMENTO DE ESTADO

A todos aquellos a quienes los presentes llegaren, Saludos

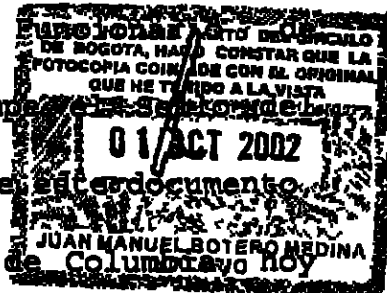
Certifico que el documento adjunto al presente se encuentra bajo el(los) Sello(s) del Secretario de Estado del Estado de Connecticut y que debe darse plena fe y crédito a dicho(s) Sello(s) *

En testimonio de lo cual, yo, Strobe Talbott, Secretario de Estado Encargado, he hecho que el
Autenticaciones de dicho Departamento estampe
Departamento de Estado y suscriba en mi nombre este documento
en la ciudad de Washington, en el Distrito de Columbia hoy
diecinueve de abril del 2000

(firmado) Strobe Talbott, Secretario de Estado

(Firmado) Patrick O Hatchett, Funcionario Asistente de Autenticaciones Departamento de Estado

*El Departamento no asume ninguna responsabilidad por el contenido del documento anexo



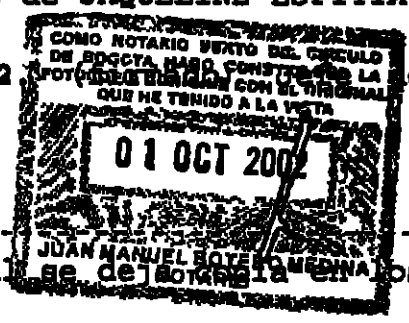
Este certificado no es válido si se le remueve o altera en cualquier forma

(Sello en relieve del Departamento de Estado de los Estados Unidos de América)

(El formulario detalla las disposiciones legales bajo las cuales fue emitido e impreso)

N° 1040 EL CONSULADO DE COLOMBIA en Washington, D C Estados Unidos de América, certifica las funciones y firma de PATRICK O HATCHETT, el 25 de abril del 2000 Pagado impuesto de timbre y derechos consulares (firmado) JAQUELINE ESPITIA ARIAS, Vicecónsul

EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES en Santa Fe de Bogotá, D C certifica la firma y las funciones de JAQUELINE ESPITIA, el 07 de junio del 2000 N° 276352 Legalizaciones



Es traducción fiel y completa de la cual se dejó en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito

Santa Fe de Bogotá, D C , junio 08 del 2000

Jaime A. Garavito B
JAIME A GARAVITO B
TRANSLADOR E INTERPRETE OFICIAL
En 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

NOISE ABATE

1. FETILLANIZACIONES
SANESE DE BOTA D.C.



NOTARIA SEXTA
PABLO MEJIDEZ
BARAJAS

COMO NOTARIO SEYTO DEL CIRCUITO
 DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
 FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
 QUE HE TENIDO A LA VISTA
 01 OCT 2002
 JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
 NOTARIO

**PÉPTIDOS QUE ACTUAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y
COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGÓN Y SUS MÉTODOS
DE USO FARMACOLÓGICO**

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a polipéptidos recientemente identificados que actúan al mismo tiempo como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón y al uso de dichos polipéptidos con fines terapéuticos. Más particularmente, los polipéptidos de la presente invención son útiles en la estimulación de la liberación de la insulina de las células beta pancreáticas en respuesta a la glucosa y en la reducción de la secreción glucagón-mediada de la glucosa del hígado, brindando de este modo una opción de tratamiento para aquellos individuos afectados de un trastorno metabólico tal como la diabetes, la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa en ayunas, la intolerancia a la glucosa, los estados prediabéticos y la obesidad.

ANTECEDENTES DEL ARTE RELACIONADO

La diabetes se caracteriza por una secreción deficiente de insulina que se manifiesta, entre otras cosas, por un nivel elevado de glucosa en sangre en el paciente diabético. Los defectos subyacentes conducen a una clasificación de la diabetes en dos grupos principales: la diabetes tipo 1 (o diabetes mellitus insulino dependiente, DMID), que surge cuando los pacientes carecen de células beta productoras de insulina en sus glándulas pancreáticas y la diabetes tipo 2 (o diabetes mellitus no insulino dependiente, DMNID), que ocurre en pacientes con secreción deficiente de insulina de las células beta y/o alteraciones en la acción de la insulina.

Los pacientes con diabetes tipo 1 se tratan actualmente con insulina, mientras que la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 pueden tratarse con agentes que estimulan la función de las células beta o con agentes que

intensifican la sensibilidad de los tejidos de los pacientes hacia la insulina. Con el correr del tiempo, casi la mitad de los sujetos diabéticos tipo 2 pierden su capacidad de respuesta a estos agentes y entonces deben someterse a terapia insulínica. Las drogas utilizadas actualmente para tratar la diabetes tipo 2 incluyen los inhibidores de alfa-glucosidasa (PRECOSE[®], VOGLIBOSE[™] y MIGLITOL[®]), insulino-sensibilizantes (por ej., Avandia[™], Actos[™] y Rezulin[™]), secretagogos de insulina (sulfonilureas "SFUs") y otros agentes que actúan a través del canal de K⁺ ATP-dependiente, y GLUCOPHAGE[™] (metformina clorhidrato).

Inhibidores de alfa-glucosidasa Los inhibidores de la alfa-glucosidasa reducen la excursión de la glucosa postprandial al demorar la absorción de la glucosa del intestino. Estas drogas son seguras y proporcionan tratamiento para sujetos diabéticos afectados entre leve y moderadamente. Sin embargo, se ha informado acerca de efectos colaterales gastrointestinales en la literatura que limitan su efectividad.

Insulino-sensibilizantes Los insulino-sensibilizantes son drogas que intensifican la respuesta del organismo a la insulina. Las tiozolidindionas tales como Avandia[™] (rosiglitazona) y Actos[™], activan al receptor gamma activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR) y modulan la actividad de un conjunto de genes que no han sido bien descritos. Los efectos hepáticos (por ej., la hepatotoxicidad inducida por drogas y los niveles elevados de enzimas hepáticas) no parecen ser un problema significativo en pacientes que utilizan Avandia[™] y Actos[™]. Aún así, se recomienda el análisis de las enzimas hepáticas cada dos meses en el primer año de terapia y en forma periódica con posterioridad. Los tratamientos con Avandia[™] y Actos[™] se asocian a retención de fluidos, edema y aumento de peso. Avandia[™] no está indicada para usar con la insulina debido a la preocupación por la insuficiencia cardíaca congestiva. Rezulin[™] (troglitazona),

la primera droga de esta clase, se abandonó debido a los elevados niveles de las enzimas hepáticas y a la hepatotoxicidad inducida por drogas

Secretagogos de insulina Las sulfonilureas (SFUs) y las no-sulfonilureas, Nateglinida y Pepaglinida, actúan a través del canal de potasio ATP-dependiente provocando la secreción de insulina glucosa-dependiente. Estas drogas son una terapia estándar para los diabéticos de tipo 2 que sufren hiperglucemia entre leve y moderada. Los secretagogos de insulina tienen limitaciones que incluyen la inducción potencial de hipoglucemia, el aumento de peso y las tasas elevadas de fracaso primario y secundario. Entre un diez y un 20% de los pacientes tratados inicialmente no logran demostrar un efecto significativo en el tratamiento (fracaso primario). El fracaso secundario se demuestra por una pérdida adicional del 20-30% del efecto en el tratamiento luego de seis meses de tratamiento con secretagogos de insulina. Se requiere tratamiento con insulina en el 50% de los pacientes que responden a los secretagogos de insulina después de 5-7 años de terapia (Scheen *et al*, *Diabetes Res Clin Pract* 6 533-543, 1989). La Nateglinida y la Pepaglinida son drogas de corta acción que deben tomarse tres veces por día. Se utilizan sólo para el control de la glucosa post-prandial y no para el control de la glucosa en ayunas.

GLUCOPHAGE™ es una biguanida que reduce la glucosa sanguínea disminuyendo la producción de glucosa hepática e incrementando la captación y utilización de la glucosa periférica. La droga es efectiva para la reducción de la glucosa sanguínea en sujetos afectados entre leve y moderadamente y no posee un efecto colateral de aumento de peso o inducción potencial de hipoglucemia. Sin embargo, el GLUCOPHAGE™ tiene una cantidad de efectos colaterales, incluyendo trastornos gastrointestinales y acidosis láctica. El GLUCOPHAGE™ está contraindicado en diabéticos por encima de los 70 años de edad y en sujetos con deterioro de la función renal o hepática. Finalmente, el GLUCOPHAGE™

posee las mismas tasas de fracaso primario y secundario que los secretagogos de insulina

El tratamiento con insulina se establece después que la dieta, el ejercicio y las medicaciones orales han fracasado en el control adecuado de la glucemia. Este tratamiento tiene varios inconvenientes: es inyectable, puede causar hipoglucemia y puede causar aumento de peso. La posibilidad de inducir hipoglucemia con la insulina limita la medida en que se puede controlar la hipoglucemia.

Los problemas con los actuales tratamientos requieren de nuevas terapias para tratar la diabetes de tipo 2. En particular, se necesitan nuevos tratamientos para mantener la secreción de insulina normal (es decir, glucosa-dependiente). Dado el papel de los péptidos similares al glucagón ("GLP-1") en la promoción de la secreción insulínica regulada por glucosa en el páncreas, los agonistas del receptor de GLP-1 son potencialmente valiosos en el tratamiento de dichas enfermedades. Es más, los antagonistas del receptor del glucagón deberían demostrar ser valiosos en el tratamiento de la diabetes de tipo 2, dado el papel del glucagón en la elevación de la glucosa plasmática por estimulación de la glucogenólisis y la gluconeogénesis.

Los GLP-1 y el glucagón son miembros de una familia de hormonas peptídicas relacionadas desde el punto de vista estructural: la familia glucagón/secretina. Dentro de esta familia, el GLP-1(7-36) y el GLP-1(7-37) (30 aminoácidos y 31 aminoácidos, respectivamente) y el glucagón (30 aminoácidos) constituyen un conjunto de péptidos altamente homólogos. Además, estas dos hormonas se originan a partir de un precursor común, el preglucagón, el cual, al procesarse en tejidos específicos, conduce a la producción de GLP-1 en forma predominante en el intestino y de glucagón en el páncreas. Los receptores de

estos dos péptidos son homólogos (58% de identidad) y pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína-G

El GLP-1 y el glucagón desempeñan, ambos, papeles principales en la homeostasis global de la glucosa. El GLP-1 reduce las concentraciones de glucosa plasmática mediado por la secreción de insulina glucosa-dependiente, mientras que el glucagón aumenta las concentraciones de glucosa plasmática. Dados los importantes papeles del GLP-1 y el glucagón en el mantenimiento de las concentraciones normales de glucosa sanguínea, ha habido un interés considerable por la identificación de los agonistas del receptor del GLP-1 y de los antagonistas del receptor del glucagón. Estudios clínicos han demostrado la capacidad de la infusión de GLP-1 para promover la secreción de insulina y normalizar la glucosa plasmática en sujetos diabéticos. Sin embargo, el GLP-1 se degrada rápidamente y tiene una vida media muy corta en el organismo. Asimismo, el GLP-1 produce efectos colaterales de motilidad intestinal en o en las cercanías de sus dosis terapéuticas. Por ende, el propio GLP-1 tiene limitaciones significativas como agente terapéutico y se están buscando versiones modificadas del péptido con estabilidad mejorada. No se han descrito hasta la fecha agonistas no peptídicos del receptor del GLP-1.

Se han identificado análogos peptídicos del glucagón que actúan como antagonistas del glucagón y reducen la hiperglucemia en ratas diabéticas. Sin embargo, ningún antagonista peptídico del glucagón ha avanzado más allá del desarrollo preclínico. Una cantidad de antagonistas no peptídicos del receptor del glucagón de estructuras diversas se han informado en la literatura científica y de patentes. Sin embargo, los intentos por identificar inhibidores del receptor del glucagón molecularmente pequeños han encontrado limitado éxito *in vivo*. El único antagonista de la acción del glucagón que se sabe activo en un estudio

clínico es un compuesto identificado como BAY 27-9955. Un efecto colateral potencial del antagonismo frente al glucagón es la hipoglucemia.

Debido a los efectos colaterales potenciales asociados con la administración tanto de un agonista del receptor de GLP-1 como de un antagonista del receptor del glucagón solos, una terapia combinada tendría la ventaja de mantener la disminución buscada de la glucemia reduciendo los efectos colaterales. La co-administración, sin embargo, requiere una formulación única y un enfoque de administración que brinde perfiles farmacocinéticos apropiados para ambos péptidos. Este podría ser un obstáculo fundamental para el desarrollo de semejante terapia.

Sobre la base de lo anterior, existe un considerable potencial para un péptido de terapia única que funcione tanto como agonista del GLP-1 como antagonista del glucagón *in vivo*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta invención provee polipéptidos novedosos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón y que son efectivos en el tratamiento de enfermedades y condiciones que pueden aliviarse por agentes que tengan actividad de agonistas del receptor del GLP-1 y de antagonistas del receptor del glucagón. Los polipéptidos de la presente invención proveen una nueva terapia para pacientes con, por ejemplo, trastornos metabólicos tales como los resultantes de la secreción disminuida de insulina endógena, en particular los diabéticos de tipo 2, o para pacientes con intolerancia a la glucosa, un estado prediabético que tiene una leve alteración de la secreción de insulina, o la intolerancia a la glucosa en ayunas, u obesidad.

Un aspecto de la invención es un polipéptido seleccionado del grupo integrado por las SEC ID NOS 6-32, como así también fragmentos, derivados y variantes de polipéptidos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y

como antagonistas del receptor del glucagón a un nivel sustancialmente igual al de los polipéptidos que se muestran en las SEC ID NOS 6-32 (colectivamente, "polipéptidos de la invención")

Otras realizaciones de la invención incluyen a polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención y los vectores y células huésped concurrentes necesarios para expresar en forma recombinante los polipéptidos

Otras realizaciones más de la invención proporcionan métodos para el tratamiento de la diabetes y/u otras enfermedades o condiciones afectadas por polipéptidos de la invención en mamíferos, incluyendo a los humanos. Los métodos implican la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los polipéptidos de la presente invención a un mamífero

La invención también proporciona métodos recombinantes y de síntesis para preparar polipéptidos de la invención

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La Figura 1 es un mapa de restricción de un plásmido típico que contiene una secuencia codificadora de un polinucleótido de fusión de un péptido GST

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La invención proporciona polipéptidos novedosos, como así también fragmentos, derivados y variantes de los mismos que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón. Los polipéptidos de la invención funcionan in vivo como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón en la prevención y/o tratamiento de enfermedades o condiciones tales como la diabetes, la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa, la intolerancia a la glucosa en ayunas y la obesidad

El GLP-1 y el glucagón son miembros de una familia de hormonas peptídicas relacionadas desde el punto de vista de la estructura. La familia

glucagón/secretina La alineación acumulada siguiente muestra as relaciones estructurales primarias

Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEC ID NO 1)
GLP-1 (7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂ (SEC ID NO 2)
GLP-1 (7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 3)

Las abreviaturas de una sola letra de los aminoácidos se pueden encontrar en Zubay, Biochemistry 2da Edición, 1988, MacMillan Publishing, New York, pág 33 estos polipéptidos desempeñan un papel en la homeostasis global de la glucosa el GLP-1 reduce las concentraciones plasmáticas de glucosa mientras que el glucagón incrementa las concentraciones plasmáticas de glucosa

Dado el papel de los GLP-1s en la promoción de la secreción insulínica regulada por glucosa en el páncreas, los agonistas del receptor de GLP-1 son potencialmente valiosos en el tratamiento de trastornos metabólicos y otras enfermedades Es más, los antagonistas del receptor del glucagón deberían demostrar también ser valiosos en el tratamiento de las enfermedades, dado el papel del glucagón en la elevación de la glucosa plasmática por estimulación de la glucogenolisis y la gluconeogenesis Sin embargo, estos hechos por sí solos no garantizan la reducción de la glucosa *in vivo* sin inducir significativos efectos colaterales

La invención proporciona polipéptidos nuevos que son agonistas del receptor de GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagón Sin ceñimos a la teoría, creemos que los polipéptidos de la invención son capaces de reducir los niveles de glucosa *in vivo* por estimulación de la liberación de insulina de las células beta pancreáticas de manera glucosa-dependiente, reduciendo al mismo tiempo la secreción de glucosa del hígado mediada por glucagón

Polipéptidos agonistas del receptor del GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagón

Los polipéptidos de la invención funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón. El componente agonista del receptor del GLP-1 de dichos polipéptidos activa al receptor del GLP-1 en uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* de activación del receptor del GLP-1. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos *in vitro* de inducción del cAMP en células RINm5F, ensayos *in vitro* de inducción de la secreción de insulina de las células β pancreáticas, ensayos *in vivo* de reducción de los niveles plasmáticos de glucosa y ensayos *in vivo* de elevación de los niveles plasmáticos de insulina, según se describe en los ejemplos específicos más adelante.

Los polipéptidos de la invención también demuestran actividad antagonista del receptor del glucagón en uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo* de inhibición de la activación del receptor del glucagón. Ejemplos de dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos *in vitro* de inhibición del aumento del cAMP celular mediado por glucagón, ensayos *in vitro* para medir la inhibición de la liberación de glucosa mediada por glucagón de, por ejemplo, hepatocitos cultivados, o ensayos *in vivo* de producción de glucosa estimulada por glucagón, según se describe en los ejemplos específicos más adelante.

Los polipéptidos preferidos de la invención se seleccionan del grupo integrado por (1) SEC ID NOS 6-32 y (2) sus fragmentos, derivados, variantes y análogos que funcionen como antagonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón sustancialmente al mismo nivel que cualquiera de los polipéptidos que se muestran en SEC ID NOS 6-32.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos naturales, polipéptidos recombinantes o polipéptidos sintéticos.

Los polipéptidos fragmentarios, derivados, variantes y análogos retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que, por ejemplo, los polipéptidos que se muestran en la SEC ID NOS 6-32. "Sustancialmente la misma

función o actividad biológica" es aproximadamente del 30% al 100% (es decir, el 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%) o más de la misma actividad biológica del polipéptido de extensión completa con el cual se compara

Derivados

Los derivados incluyen a polipéptidos de la invención que han sido modificados químicamente para otorgarles una estructura y/o función adicional. Por ejemplo, puede agregarse polietilenglicol (PEG) o un ácido graso a un polipéptido para mejorar su vida media. Se pueden construir también polipéptidos de fusión que confieran una especificidad de blanco o una actividad adicional, según se describe con mayor detalle más adelante.

Los derivados se pueden modificar ya sea por medio de un proceso natural, tal como el procesamiento postraduccional, como por medio de técnicas de modificación química, siendo ambos bien conocidos en el arte. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte del polipéptido, incluida la cadena peptídica, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminales. Se podrá apreciar que puede estar presente el mismo tipo de modificación en la misma o diversa medida en varios sitios de un dado polipéptido. También, una variante puede contener uno o más tipos diferentes de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser, por ejemplo, ramificados, por ejemplo, como consecuencia de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación.

Otras modificaciones químicas incluyen la acetilación, acilación, n-bosilación con ADP, amidación, unión covalente de la flavina, unión covalente de un grupo hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente del fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de

piroglutamato, formulación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de un ancla de GPI, hidroxilación, iodación, metilación, nitrilación, oxidación, incorporación de un resto de PEG, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas, tal como la arginilación, mediada por ARN de transferencia y ubiquitinación (Ver, por ejemplo, T E Creighton, *PROTEINS, STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2da Edición, W H Freeman and Company, New York (1993), POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B C Jonson, ed , Academic Press, New York, páginas 1-12 (1983), Seifter *et al* , *Meth Enzymol* 182 626-48 (1990), Ratan *et al* , *Ann N Y Acad Sci* 663 48-62, 1992)

Los derivados incluyen también a polipéptidos que se han fusionado con otro polipéptido, como por ejemplo la albúmina sérica humana, para mejorar su perfil farmacocinético. La fusión de dos polipéptidos se puede lograr por cualquier medio conocido por un experto en el arte. Por ejemplo, pueden clonarse un ADN que codifica la albúmina sérica humana y una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la invención en cualquier vector de expresión de mamífero conocido por un experto en el arte. Se prefiere la localización de un polipéptido de la invención en posición N-terminal respecto del otro polipéptido pues parece que se requiere una histidina N-terminal para la actividad del receptor del GLP-1 (Kawa, *Endocrinology* Aproximadamente, 124(49) 1768-73, 1989). La proteína de fusión recombinante resultante puede entonces expresarse transformando una línea celular adecuada, tal como HKB o CHO, con el vector y expresando la proteína de fusión.

Los derivados preferidos incluyen a polipéptidos de la invención (SEC ID NOS 6-32) a los cuales se ha unido un resto de PEG o un resto de ácido graso. El resto de PEG puede ser, por ejemplo, un PEG de peso molecular mayor de 22

kDa, con preferencia un peso molecular de entre 25 kDa y 100 kDa (por ej , 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 kDa), y con mayor preferencia un peso molecular de entre 35 kDa y 45 kDa (por ej , 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 ó 45 kDa) Ejemplos de dichos polipéptidos unidos a PEG son aquellos que contienen un resto de PEG de 22 kDa unido al residuo de cisteína de la posición 31 de las SEC ID NOS 19 ó 25 Ver las SEC ID NOS 20 y 26 y la Tabla 2 como alternativa, puede estar unido un resto de PEG de 43 kDa al residuo de cisteína de la posición 31 de la SEC ID NO 25 Ver la SEC ID NO 27 y la tabla 2 Puede agregarse un resto de PEG a un residuo de cisteína de polipéptidos de la invención por métodos bien conocidos en el arte, ver, por ejemplo, el Ejemplo 19

Otros derivados preferidos tienen un resto de ácido graso unido al polipéptido El resto de ácido graso puede ser, por ejemplo, un ácido graso de entre C₁₂ y C₂₀, con preferencia un ácido graso de entre C₁₄ y C₁₈ y, por sobre todo, con mayor preferencia, de C₁₆ ejemplos de dichos polipéptidos son las SEC ID NOS 28-32, que contienen un resto de ácido graso de C₁₆ (palmitato) unido a un residuo de lisina dentro del péptido Ver la Tabla 2 puede agregarse un resto de ácido graso a un residuo de lisina de polipéptidos de la invención por métodos bien conocidos en el arte como, por ejemplo, la acilación de ácidos grasos (Knudsen *et al* , *J Med Chem* 43 1664-1669, 2000)

Variantes

Las variantes son polipéptidos de la invención que poseen uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEC ID NOS 6-32 las variantes también pueden tener aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos modificados, es decir isómeros de péptidos, y pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos naturales

Con preferencia, las variantes contienen una o más sustituciones de aminoácidos conservativas (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones), con preferencia en residuos de aminoácidos no esenciales. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse a partir de una secuencia de proteína de tipo salvaje sin alterar su actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para la actividad biológica. Una sustitución de aminoácido conservativa es aquella en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en el arte las familias de residuos de aminoácidos que poseen cadenas laterales similares: estas familias incluyen a aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ej. alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ej. treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ej. tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Las sustituciones no conservativas no se harían para residuos de aminoácidos conservados o para residuos de aminoácidos con localización en un dominio de proteína conservado.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos se realizan con preferencia en las posiciones 11, 12, 16, 17 ó 18 del polipéptido de consenso que se muestra en la SEC ID NO 34. La posición 11 es con preferencia R, S, A, K, G o T, y con mayor preferencia R, A, G o S. La posición 12 es con preferencia K, N, R, H, A, S o Q, y con mayor preferencia K, A, S o N. La posición 16 es con preferencia K, R, V, I, L, M, F, W, Y, A, S, T, N, Q, G o H, y con mayor preferencia K, V, I, F, A, S o N. La posición 17 es con preferencia D, E, H, K, R, F, I, L, M, Y, V, W, A, S, T, N, Q o G, y con mayor preferencia R, A, L, M, V, S, H, E o Q. La posición 18 es con

preferencia K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G o H, y con mayor preferencia K, R, F, I, L, Y o A. Todas las posibles combinaciones de sustituciones en las posiciones 11, 12, 16, 17 y 18, incluyendo la no sustitución en cualquiera, en dos, en tres o en cuatro de estas posiciones, quedan previstas en forma específica.

Las variantes también incluyen a polipéptidos que difieren en su secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las variantes que funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón pueden identificarse detectando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, los mutantes de polipéptidos con sustituciones conservativas en 1 o más posiciones (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 posiciones) pueden ensayarse para detectar la actividad agonista del receptor del GLP-1 y la actividad antagonista del receptor del glucagón utilizando métodos bien conocidos en el arte y que se describen en los ejemplos específicos más adelante.

Análogos

Un análogo incluye a un propolipéptido, en donde el propolipéptido incluye a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención. Los polipéptidos activos de la invención pueden sufrir ruptura de los aminoácidos adicionales de la molécula del propolipéptido por procesos naturales in vivo o por procedimientos bien conocidos en el arte, tales como ruptura enzimática o química.

Fragmentos

Un fragmento es un polipéptido menor que uno de extensión total de la invención, que incluye un derivado, variante o análogo de extensión total, que posee actividad agonista del receptor del GLP-1 y antagonista del receptor del glucagón.

Cualquier secuencia de polinucleótido que codifique un polipéptido de la invención se puede utilizar para expresar el polipéptido. Los polinucleótidos

pueden consistir sólo en una secuencia codificadora para un polipéptido o pueden incluir secuencias codificadoras y/o no-codificadoras adicionales

Las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención se pueden sintetizar en todo o en parte utilizando métodos químicos bien conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Caruthers *et al*, *Nucl Acids Res Symp Ser* 215-23, 1980, Horn *et al*, *Nucl Acids Res Symp Ser* 225-32, 1980) El polinucleótido que codifica el polipéptido puede luego clonarse en un vector de expresión para expresar el polipéptido o en un vector de clonación, para propagar el polinucleótido

Como comprenderán aquellos con experiencia en el arte, puede resultar ventajoso producir las secuencias codificadoras de polipéptidos que posean codones no naturales. Por ejemplo, se pueden seleccionar codones preferidos por un huésped procarionota o eucarionota para aumentar la velocidad de expresión de un polipéptido o para producir un transcripto de ARN que posea propiedades deseables, tales como la vida media, que sea mayor que la de un transcripto generado a partir de la secuencia natural

Las secuencias nucleotídicas descritas aquí pueden prepararse mediante ingeniería genética utilizando métodos generalmente conocidos en el arte para alterar las secuencias codificadoras de polipéptidos por una variedad de razones, que incluyen, sin ser limitativos, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del polipéptido o del mRNA producto. La transposición del ADN mediante fragmentación aleatoria y el reensamblado de fragmentos de genes y de oligonucleótidos por PCR pueden usarse para preparar secuencias nucleotídicas mediante ingeniería genética. Por ejemplo, puede utilizarse la mutagénesis de sitio dirigido para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, cambiar la preferencia por codones, producir variantes de corte, introducir mutaciones, etc

Vectores

La presente invención también incluye a vectores de clonación y de expresión que comprenden una o más secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido de la invención. La secuencia nucleotídica puede insertarse con orientación hacia delante o hacia atrás. Una secuencia de ADN puede insertarse en un vector por una variedad de procedimientos. En general, una secuencia de ADN se inserta en un sitio de endonucleasa de restricción apropiado por procedimientos conocidos en el arte y descritos en Sambrook et al., **MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL**, 2da Edición (Cold Spring Harbor, N Y, 1989). Se considera a estos procedimientos y a otros incluidos en el alcance de los expertos en el arte.

Ejemplos de vectores de clonación incluyen, sin ser limitativos, a pBR322, pUC18, pUC19, pSport y pCRII.

En un aspecto preferido de esta realización, un vector de expresión comprende además secuencias regulatorias, que incluyen, por ejemplo, a un promotor, ligadas operativamente a la secuencia codificadora. Los expertos en el arte conocen un gran número de vectores y promotores de expresión apropiados y se pueden adquirir en el comercio. Los vectores de expresión siguientes se presentan a modo de ejemplo. Los vectores de expresión bacterianos incluyen, sin ser limitativos, a pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene), pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, PRIT5 (Pharmacia). Los vectores de expresión eucariotas incluyen, sin ser limitativos, a pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede utilizarse cualquier otro vector de clonación o expresión en la medida que sea replicable y viable en el huésped deseado. Las regiones de promotor se pueden seleccionar de cualquier gen deseado utilizando vectores de expresión.

CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son el pKK232-8 y el pCM7. Promotores bacterianos con nombres particulares incluyen a *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, λ P_R , P_L y *trp*. Los promotores eucariotas incluyen al CMV temprano inmediato, HSV timidina quinasa, SV40 temprano y tardío, LTRs de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. La selección de un vector y un promotor adecuados está dentro del nivel común de la capacidad de un experto del arte.

Un vector de expresión también puede contener un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción, un terminador de transcripción y secuencias adecuadas para amplificar la expresión. Los vectores de expresión pueden contener un gen que confiera un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, tal como la dihidrofolato reductasa o la resistencia a la neomicina para un cultivo de células eucariotas, o tal como la resistencia a las tetraciclinas o la ampicilina para un cultivo de *E. coli*.

Bibliotecas

En una realización, se genera una biblioteca de variantes por mutagénesis combinatoria a nivel de los ácidos nucleicos y es codificada por una biblioteca genética variegada. Puede producirse una biblioteca de variantes, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias genéticas tales que un conjunto degenerado de secuencias de aminoácidos variantes potenciales sea expresable como polipéptidos individuales, o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para despliegue de fagos) que contengan el conjunto de secuencias en las mismas.

Existe una variedad de métodos que se pueden utilizar para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia genética degenerada puede

realizarse en un sintetizador automático de ADN, y luego ligarse a un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias análogas potenciales. Se conocen en el arte métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (ver, por ejemplo, Narang, *Tetrahedron* 39 3 (1983), Itakura *et al*, *Annu Rev Biochem* 53 323 (1984), Itakura *et al*, *Science* 198 1056 (1984), Ike *et al*, *Nucleic Acid Res* 11 477, 1983)

Se conocen en el arte diversas técnicas para detectar productos génicos de bibliotecas combinatorias preparados mediante mutaciones puntuales o truncamiento y para detectar bibliotecas de cADN para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para la detección rápida de las bibliotecas génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos de la invención. Las técnicas más utilizadas, que se pueden adaptar al análisis de alto rendimiento para detectar grandes bibliotecas génicas, incluyen típicamente la clonación de la biblioteca génica a vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de ensamblado recursivo (REM), una técnica que intensifica la frecuencia de los mutantes funcionales de las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con los ensayos de detección para identificar las variantes deseadas.

Células huésped

La presente invención también proporciona células huésped que contienen los vectores descritos anteriormente. La célula huésped puede ser una célula

eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura. En forma alternativa, la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana.

Las células huésped se pueden procesar mediante ingeniería genética (transducidas, transformadas o transfectadas) con los vectores de clonación o expresión de la invención. El vector puede encontrarse, por ejemplo, en forma de plásmido, de partícula viral o de fago. Las células huésped tratadas mediante ingeniería genética pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para la activación de los promotores o la selección de los transformantes. La selección de las condiciones apropiadas de cultivo, tales como la temperatura y el pH, está dentro del nivel común de la capacidad de un experto del arte.

Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados se incluyen, sin ser limitativos, células bacterianas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*, células fúngicas, tales como levaduras, células de insectos tales como la *Drosophila S2* y la *Spodoptera Sf9*, células de mamífero tales como las CHO, COS o de melanoma de Bowes. La selección de un huésped apropiado se considera dentro del alcance de los expertos del arte a partir de las enseñanzas contenidas en la presente.

La introducción del constructo en la célula huésped puede efectuarse, por ejemplo, mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por Dextrano DEAE o por electroporación (Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986). Los constructos de las células huésped pueden usarse de modo convencional para producir el producto genético codificado por la secuencia recombinante.

Expresión de Proteínas

Pueden expresarse proteínas maduras en células de mamífero, de levaduras, de bacterias o en otras células bajo el control de promotores apropiados. Pueden emplearse también sistemas de traducción libres de células para producir dichas proteínas utilizando ARNs derivados de constructos de ADN e la presente invención. Se describen vectores de clonación y expresión adecuados para utilizar con huéspedes procariontes y eucariotas, según se mencionó extensamente y en Sambrook et al., **MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL**, 2da Edición (Cold Spring harbor, N Y, 1989).

La transcripción de un ADN que codifica polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores puede incrementarse insertando una secuencia amplificadora en el vector de expresión. Los amplificadores son elementos de ADN que actúan en forma *cis*, habitualmente de entre aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen al amplificador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pares de bases 100 a 270), a un amplificador del promotor temprano del citomegalovirus, a un amplificador de poliovirus del lado tardío del origen de replicación y a los amplificadores de adenovirus. Por lo general, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de la célula huésped, por ej. el gen de la resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural como se indica abajo. Dichos promotores pueden derivar de operones que codifiquen enzimas glicolíticas tales como la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), el factor α , la fosfatasa ácida o las proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en fase apropiada con las secuencias de traducción, iniciación y terminación y, con

preferencia, con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida al espacio periplásmico o al medio extracelular. En forma opcional, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluya un péptido de identificación de aminoácidos N-terminales que imparta características deseadas, como por ej., la estabilización o la purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Después de la transformación de una cepa adecuada del huésped y del crecimiento de la cepa del huésped hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se desreprime por medios apropiados (por ej. cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan por un período adicional. Las células se cosechan típicamente por centrifugación y se desgarran por medios físicos o químicos. El extracto bruto resultante se conserva para su posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden desgarrarse por cualquier método conveniente, incluyendo los ciclos congelación-descongelación, la sonicación, la disrupción mecánica o el uso de agentes de lisado celular.

Pueden utilizarse también diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar proteínas recombinantes. Ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen a las líneas COS-7 de los fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, *Cell* 23 175 (1981) y a otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, como, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y HBK.

Purificación de proteínas

Los polipéptidos de la presente invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos en el arte, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio o etanol, la extracción con ácidos, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía

sobre fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad, la cromatografía sobre hidroxapatita y la cromatografía de lectinas. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse como paso final de purificación.

Los polipéptidos de la invención pueden aislarse convenientemente según se describe en los ejemplos específicos más adelante. Un polipéptido purificado tiene por lo menos aproximadamente un 70% de pureza, o sea que el polipéptido aislado está sustancialmente libre de material celular y tiene menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de material no-polipeptídico. Con preferencia, los preparados tienen una pureza de entre el 85% y el 99% (es decir, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 96, 97, 98 y 99%). La pureza de los preparados puede determinarse por cualquier medio conocido en el arte, tal como la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, espectrometría de masa y cromatografía líquida.

Modificación post-traducciona

Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la invención se pueden glicosilar con hidratos de carbono de mamíferos u otros eucariotas o pueden ser no-glicosilados. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo inicial del aminoácido metionina.

Síntesis química

Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden producirse utilizando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tal como por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (ver, por ejemplo, Merrifield, *J Am Chem Soc* 85, 2149 – 2154, 1963, Roberge *et al*, *Science* 269, 202 – 204, 1995). La síntesis de polipéptidos puede realizarse utilizando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede

lograrse, por ejemplo, usando el Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) En forma opcional, los fragmentos de un polipéptido se pueden sintetizar separadamente y combinarse usando métodos químicos para producir una molécula de extensión completa

Un polipéptido recién sintetizado puede purificarse en forma sustancial por medio de cromatografía líquida de alta resolución (ver, por ejemplo, Creighton, *Proteins Structures And Molecular Principles*, WH Freeman and Co , New York, N Y , 1983) La composición de un polipéptido sintético de la presente invención se puede confirmar mediante análisis o secuenciación de aminoácidos, por ejemplo mediante el procedimiento de degradación de Edman (ver Creighton, más arriba) Además, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido se puede alterar durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con secuencias provenientes de otras proteínas para producir una variante de polipéptido o un polipéptido de fusión

Aplicaciones Farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse para tratar la diabetes de tipo 2 (diabetes mellitus no-insulino dependiente) y/o evitar que los sujetos con intolerancia a la glucosa, intolerancia a la glucosa en ayunas, hipoglucemia y/u obesidad, desarrollen una diabetes de tipo 2

Composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención pueden combinarse con un vehículo aceptable para uso farmacéutico para formar una composición farmacéutica para administración parenteral Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido y un vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico Los vehículos aceptables para uso farmacéutico incluyen, pero sin ser limitativos, la solución salina, la solución salina bufferizada,

la dextrosa, el agua, el glicerol, el etanol y sus combinaciones. La formulación debe adaptarse a la modalidad de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de manera conveniente, por ej., por vía oral, tópica, endovenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad que resulte efectiva para el tratamiento y/o profilaxis de la indicación específica. Las dosis adecuadas oscilan entre aproximadamente por lo menos 3,5 ng de polipéptido activo (es decir, sin incluir el peso de un resto de PEG o ácido graso)/kg de peso corporal y aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal por día. En la mayoría de los casos, la dosis es de entre aproximadamente 0,1 µg/kg y aproximadamente 35 µg/kg (es decir, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 µg/kg) de peso corporal por día, teniendo en cuenta las vías de administración, síntomas, etc. Estos números no tienen en cuenta la biodisponibilidad del péptido *in vivo*, en cuyo caso puede usarse mayor o menor cantidad para alcanzar la dosis efectiva deseada. La determinación de una dosis está dentro de la capacidad común del experto del arte y requiere sólo detección de rutina.

Los polipéptidos de la presente invención también pueden emplearse en combinación con otros agentes farmacéuticos útiles en el tratamiento de la diabetes, la intolerancia a la glucosa en ayunas, la intolerancia a la glucosa, la hiperglucemia y la obesidad. Los agentes apropiados incluyen a los secretagogos de insulina, los insulino-sensibilizantes y la metformina HCl.

La invención también provee envases o equipos farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Puede estar asociado al envase o equipo un aviso en forma prescripta por una agencia gubernamental que regule

la fabricación, uso o venta de fármacos o productos biológicos y que refleje la aprobación por parte de la agencia

Terapia génica

Un polipéptido de la invención también puede expresarse *in vivo*, lo cual con frecuencia se denomina "terapia génica". Así, por ejemplo, pueden obtenerse células mediante ingeniería genética con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifique el polipéptido *ex vivo* y luego administrarse esas células a un paciente para ser tratado con el polipéptido. Dichos métodos son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden obtener células mediante ingeniería genética por procedimientos conocidos en el arte usando una partícula retroviral que contenga un ARN que codifique los polipéptidos de la presente invención.

En una realización preferida, al ADN que codifica los polipéptidos de la invención se utiliza en terapia génica para trastornos tales como la diabetes. De acuerdo a esta realización, la terapia génica con el ADN que codifica los polipéptidos de la invención se provee a un paciente que la necesita en forma concurrente con o inmediatamente después del diagnóstico.

La administración local de polipéptidos que utiliza la terapia génica puede suministrar el agente terapéutico al área blanco, es decir el páncreas. Por ejemplo, se utilizó un promotor específico para crear un modelo de tumor pancreático en células beta de ratón (Hanahan, *Nature* 315 (6015) 115-22, 1985).

Se consideran tanto metodologías de terapia génica *in vitro* como *in vivo*. Se conocen varios métodos para transferir genes potencialmente terapéuticos a poblaciones celulares definidas. Ver, por ej., Mulligan, *Science* 260 926-31, 1993. Estos métodos incluyen:

1) Transferencia directa de genes. Ver, por ej., Wolf et al., "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle *In Vivo*", *Science* 247 1465-68, 1990,

2) Transferencia de ADN mediada por liposomas Ver, por ej , Caplen et al , "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis", *Nature Med* 3 39-46, 1995, Cristal, "The Gene As A Drug", *Nature Med* 1 15-17, 1995, Gao y Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", *Biochem Biophys Res Comm* 179 280-85, 1991,

3) Transferencia de ADN mediada por retrovirus Ver, por ej , Kay et al , "In Vivo gene Therapy Of Hemophilia B Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", *Science* 262 117-19, 1993, Anderson, "Human Gene Therapy", *Science* 256 808-13, 1992

4) Transferencia de ADN mediada por Virus del ADN Dichos virus del ADN incluyen a los adenovirus (con preferencia los vectores basados en Ad-2 ó Ad-5), los virus del herpes (con preferencia vectores basados en el virus del herpes simplex) y parvovirus (con preferencia vectores basados en parvovirus "defectuosos" o no autónomos, con mayor preferencia vectores basados en virus adeno-asociados y, por sobre todo, con mayor preferencia, vectores basados en AAV-2) Ver, por ej , Ali et al , "The Use Of DNA Viruses As vectors For Gene Therapy", *Gene Therapy* 1 367-84, 1994, Patente de los Estados Unidos 4 797 368 y Patente de los Estados Unidos 5 139 941

Sistemas de vectores para terapia génica

La elección de un sistema de vectores particular para transferir un gen de interés dependerá de una variedad de factores Un factor importante es la naturaleza de la población celular blanco Aunque los vectores retrovirales se han estudiado y usado extensamente en una cantidad de aplicaciones de terapia génica, estos vectores por lo general son inapropiados para infectar células que no están en división Además, los retrovirus tienen una oncogenicidad potencial Sin embargo, desarrollos recientes en el campo de los vectores lentivirales

pueden evitar algunas de estas limitaciones Ver Naldini et al , Science 272 263-7, 1996

El experto en el arte podrá apreciar que cualquier vector de terapia génica adecuado que codifique polipéptidos de la invención puede usarse de conformidad con esta realización Son conocidas las técnicas para construir dichos vectores Ver, por ej , Anderson, *Nature* 392 25-30, 1998, Verna y Somia, *Nature* 389 239-242, 1998 la introducción del vector al sitio blanco puede lograrse usando técnicas conocidas

Los vectores de terapia génica adecuados incluyen a uno o más promotores Los promotores adecuados que se pueden utilizar incluyen, sin ser limitativos, a los promotores virales (por ej el LTR retroviral, el promotor SV40, el promotor tardío principal del adenovirus, el promotor del virus sincitial respiratorio, el promotor del parvovirus B19 y el promotor del citomegalovirus humano (CMV) descrito en Miller et al , *Biotechniques* 7(9) 980-990, 1989), los promotores celulares (por ej los promotores de la histona, el polipéptido III y la β -actina) y los promotores inducibles (por ej el promotor MMT, el promotor de la metalotioneína y el promotor del choque térmico) La selección de un promotor adecuado será evidente para aquellos con experiencia en el arte a través de las enseñanzas contenidas en la presente

Retrovirus

Los retrovirus a partir de los cuales pueden derivar los vectores de los plásmidos retrovirales mencionados anteriormente incluyen, sin ser limitativos, al Virus de la Leucemia Murina Moloney, el virus de la necrosis del bazo, los retrovirus tales como el Virus del sarcoma Rous, el Virus del Sarcoma Harvey, el virus de la leucosis de las aves, el virus de la leucemia del mono gibbon, el virus de inmunodeficiencia humana, el Virus del Sarcoma Mieloproliferativo y el virus del

tumor de mama En una realización, el vector del plásmido retroviral se deriva del Virus de la Leucemia Murina Moloney

El vector del plásmido retroviral se utiliza para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras Ejemplos de células de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, sin ser limitativos, a las líneas celulares PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN, según se describe en Miller, *Human Gene Therapy*, 1 5-14, 1990 El vector puede transducir las células de empaquetamiento a través de cualquier medio conocido en el arte Dichos medios incluyen, sin ser limitativos, la electroporación, el uso de liposomas y la precipitación con CaPO_4 En una alternativa, el vector del plásmido retroviral puede estar encapsulado en un liposoma o acoplado a un lípido y luego administrarse a un huésped La línea celular productora genera partículas del vector retroviral que incluye a la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) los polipéptidos de la invención Luego dichas partículas de vector retroviral pueden usarse para transducir células eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo* Las células eucariotas transducidas expresarán la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) los polipéptidos de la invención Las células eucariotas que se pueden transducir incluyen, sin ser limitativos, las células germinales embrionarias, las células de carcinoma embrionario como así también las células germinales hematopoyéticas, los hepatocitos, los fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células del epitelio bronquial

Adenovirus y virus adeno-asociados

Los adenovirus tienen la ventaja de que tienen un amplio rango de huéspedes, pueden infectar células en reposo o diferenciadas en forma terminal, tal como las neuronas o hepatocitos y parecen ser esencialmente no-oncogénicos Ver, por ej., Ali *et al.*, 1994, en la página 367 Los adenovirus no

parecen integrarse al genoma del huésped. Dado que existen fuera del cromosoma, se reduce notoriamente el riesgo de mutagénesis insercional. Ali et al, 1994, en la página 373

Los virus adeno-asociados exhiben ventajas similares a las de los vectores de base adenoviral. Sin embargo, los AVVs exhiben una integración sitio-específica en el cromosoma humano 19 (Ali et al, 1994, en la página 377)

Terapia transcribótica

Una aproximación diferente a la terapia génica es la "terapia transcribótica", en la cual las células del paciente se tratan *ex vivo* para inducir a los genes latentes a producir la proteína de interés después de su reintroducción al paciente. La terapia transcribótica supone que el individuo tiene un complemento normal de genes necesarios para la activación. La terapia transcribótica implica introducir un promotor u otra secuencia reguladora exógena capaz de activar los genes incipientes en el ADN cromosómico de las células del paciente *ex vivo*, cultivar y seleccionar las células activas productoras de proteína y luego reintroducir las células activadas en el paciente con el propósito de que se tornen luego totalmente establecidas. Las células "con genes activados" fabrican luego la proteína de interés durante algún tiempo significativo, tal vez tanto como la vida entera del paciente. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.641.670 y 5.733.761 describen en detalle este concepto.

Con el fin de que esta invención sea mejor entendida, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son sólo a los propósitos de ilustración, y no han de considerarse de ningún modo como limitantes del alcance de la invención. Todas las patentes, solicitudes de patente y referencias citadas en esta presentación se incorporan a la misma a modo de referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Metodología de síntesis de péptidos

Se siguió el siguiente procedimiento general para sintetizar algunos de los polipéptidos de la invención. Se llevó a cabo la síntesis de péptidos por medio de la estrategia FMOC/ter-Butil (Peptide Síntesis Protocols (1994), Volumen 35, por Michael W Pennington & Ben M Dunn) en condiciones de flujo continuo utilizando resinas PEG-Poliestireno Rapp-Polymere (Rapp-Polymere, Tubingen, Alemania). Al completarse la síntesis, los péptidos se separaron por ruptura de la resina y se desprotegieron usando TFA/DTT/H₂O/Tnisopropil silano (88/5/5/2). Los péptidos se precipitaron del cóctel de ruptura utilizando dietil éter frío. El precipitado se lavó tres veces con el éter frío y luego se disolvió en ácido acético 5% antes de someterse a liofilización. La identidad de los péptidos se confirmó mediante cromatografía en fase reversa sobre una columna YMC-Pack ODS-AQ (YMC, Inc., Wilmington, NC) sobre un sistema Waters ALLIANCE® (Waters Corporation, Milford, MA) utilizando agua/acetonitrilo con TFA 3% como gradiente desde acetonitrilo 0% hasta 100%, y mediante espectrometría de masa MALDI en un Espectrómetro de Masa VOYAGER DE™ MALDI (modelo 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Se agregó la muestra del péptido en buffer de Matriz (d H₂O/acetonitrilo 50/50 con 3% de TFA) a buffer de Matriz 1/1. Aquellos péptidos que no reunieron el criterio de pureza de >95% se purificaron mediante cromatografía en fase reversa sobre un sistema de HPLC Waters Delta Prep 4000 (Waters Corporation, Milford, MA).

Ejemplo 2

Clonación de péptidos

Para establecer un método sólido para expresar los polipéptidos de la invención y sus mutantes, se clonaron las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de manera C-terminal a GST con un único sitio de reconocimiento del Factor Xa separando el péptido monomérico y el GST. El gen

que codifica el sitio de reconocimiento del Factor Xa fusionado a la secuencia de ADN del péptido a producir se ha sintetizado por hibndación de dos fragmentos de ADN mono-hebra superpuestos (70-90meros) conteniendo un sitio de enzima de restricción *Bam*HI o *Eco*RI inmediatamente 5' a la secuencia de ADN del polinucleótido a clonar, seguido de síntesis de ADN de las hebras opuestas a través del gran fragmento de la ADN polimerasa I (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)

La secuencia de ADN elegida para cada polinucleótido se basó en la traducción reversa de la secuencia de aminoácidos designada de cada péptido. En algunos casos, el polinucleótido que codifica al péptido se genera por mutagénesis de PCR (Picard et al, Nucleic Acids Res 22: 2587-91, 1994, Sambrook et al (1989) MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, 2da Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) de un polinucleótido ya preparado por el método descrito anteriormente. El producto de doble hebra se digiere luego por medio de *Bam*HI y *Eco*RI y se liga al pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech), que también se ha obtenido por ruptura con *Bam*HI y *Eco*RI.

Por ejemplo, cuando la secuencia de ADN del polipéptido identificado como SEC ID NO 7 se clonó en el pGEX-6P-1, se expresó la siguiente secuencia de polipéptido en forma de fusiones con glutatión S-transferasa (GST) IEGRHSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIWLVKGRG (SEC ID NO 33), en la cual los primeros 4 aminoácidos, IEGR, son el sitio de reconocimiento del factor Xa y los restantes 31 aminoácidos son la secuencia de aminoácidos identificada como SEC ID NO 7.

Los primeros y últimos seis nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico que codifica al polipéptido identificado como SEC ID NO 7, representan los sitios de la enzima de restricción (*Bam*HI y *Eco*RI) utilizados para la clonación al

plásmido pGEX-6P-1 (FIG 1) La secuencia "TAATGA" que precede inmediatamente al sitio *EcoRI* ("GAATTC") codifica dos codones de terminación. El resto de la secuencia de ADN codifica el Factor Xa-polipéptido identificado como secuencia de fusión de SEC ID NO 7.

Ejemplo 3

Expresión recombinante de péptidos y purificación

Células BL21 (DE3) (Stratagene) transformadas con un péptido GST de fusión que contenía plásmidos, se cultivaron a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de entre 0,6 y 1,0 y se indujeron mediante IPTG (Life Technologies) 1 mM durante 2 horas a 37°C. Se centrifugaron dos litros de células a 7 700xg durante 15 minutos y se conservaron a -20°C. El pellet de células se resuspendió en 80 ml de reactivo para extracción de proteínas bacterianas B-PER (Cat No 78248, Pierce) e Inhibidor de Proteasas Completo (Roche) 1x hasta que la suspensión de células se homogeneizó. La mezcla homogénea se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron lisosoma y Dnasa I hasta una concentración final de 200 µg/ml y 10 µg/ml para solubilizar más las proteínas y para reducir la viscosidad, respectivamente. La mezcla se incubó durante 5 minutos adicionales. Los restos de células se eliminaron por centrifugación a 27 000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se mezcló con 2 mL de resina Glutathión Sefarosa 4B (Pharmacia) en un agitador durante toda la noche a 4°C. La resina se separó por centrifugación a 1 500 g durante 15 minutos, se rellenó en Columnas de Cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad), se lavó con 30 mL de PBS seguido de 10 mL de buffer de Factor Xa ($CaCl_2$ 1 mM, NaCl 100 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Los péptidos se separaron de la columna con 60 unidades de Factor Xa (Pharmacia) en 1 mL de buffer de Factor Xa, durante toda la noche a 4°C. Estos eluatos se corrieron luego en HPLC de C18 (Beckman System Gold) usando un bucle de 2 mL y un caudal de flujo de 1 mL/minuto con el siguiente

programa 5 minutos de Buffer A (TFA/H2O 0,1%), 30 minutos de gradiente hasta 100% de Buffer B (TFA/ACN 0,1%), 10 minutos de Buffer A, 10 minutos de gradiente y 10 minutos de Buffer A. Las fracciones correspondientes a los picos (0,5 mL cada una) se recogieron y separaron mediante electroforesis en gel de Tricine-SDS 10-20%. La identidad de cada péptido se confirmó mediante espectrometría de masa utilizando la masa predicha a partir de la secuencia de aminoácidos. Los rendimientos típicos son de aproximadamente 50 µg de péptidos libres por litro de cultivo de *E. coli*. Se ha demostrado que los péptidos recombinantes tienen las mismas actividades que sus versiones sintéticas.

La siguiente tabla, Tabla 2, contiene algunos polipéptidos preparados de conformidad con el protocolo de síntesis de péptidos discutido más arriba (Ejemplo 1) o, en forma recombinante como se describió anteriormente.

Tabla 2

Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEC ID NO 1)
GLP-1(7-36)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 2)
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 3)
G1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 4)
G5	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 5)
G27	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 6)
G51	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 7)
G55	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 8)
G56	HSQGTFTSDYAAYLDAARRAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 9)
G57	HSQGTFTSDYAKYLDAAAKEFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 10)
G58	HSQGTFTSDYAKYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 11)
G59	HSQGTFTSDYARYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 12)
G60	HSQGTFTSDYAKYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 13)
G61	HSQGTFTSDYARYLDAKAKEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 14)

G71	HSQGTFTSDYAKYLDARRACEFIAWLVKGRG (SEC ID NO 115)
G74	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVCGRG (SEC ID NO 16)
G75	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKCRG (SEC ID NO 17)
G76	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGCG (SEC ID NO 18)
G77	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC (SEC ID NO 19)
G277	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRC (22 kD) (SEC ID NO 20)
G82	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVRGRG (SEC ID NO 21)
G83	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (SEC ID NO 22)
G84	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVKGRG (SEC ID NO 23)
G85	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIAWLVRGRGK (SEC ID NO 24)
G185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (SEC ID NO 25)
G2185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (22kD) (SEC ID NO 26)
G4185	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRG (43kD) (SEC ID NO 27)
G87	HSQGTFTSDYAKYLDARRAK(FA)EFIAWLVKGR-NH2 (SEC ID NO 28)
G88	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRK(FA) (SEC ID NO 29)
G90	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIK(FA)WLVRGRG (SEC ID NO 30)
G182	HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVGRGK(FA) (SEC ID NO 31)
G183	HSQGTFTSDYARYLDARRAK(FA)EFIKWLVGRG (SEC ID NO 32)

(FA) palmitato C₁₆ unido al residuo de lisina

(22kD) PEG de 22kD unido al residuo de cisteína

(43kD) PEG de 43kD unido al residuo de cisteína

Ejemplo 4

Preparación de membranas de células RINm5F

Matraces conteniendo células RINm5F se lavaron con PBS, se disgregaron en un buffer Hepes 20 mM-EDTA 1 mM-sacarosa 250 mM conteniendo inhibidores de proteasas (HES) y se homogeneizaron en un homogeneizador dounce, seguido de resuspensión repetida a través de una aguja de medida 23

las células y núcleos intactos se eliminaron por centrifugación a 500xg durante 5 minutos. El pélet se resuspendió en buffer HES usando una aguja de medida 23 y se repitió la centrifugación. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se combinaron y se centrifugaron a 40 000xg durante 20 minutos. El pélet de membranas plasmáticas resultante se resuspendió en buffer HES usando una aguja de medida 23, seguida de una aguja de medida 25. Las membranas se conservaron a -80°C hasta ser utilizadas.

Ejemplo 5

Preparación de membranas plasmáticas de hígado de rata

Se sacrificaron ratas y se extrajeron sus hígados colocándolos en buffer TES (Tns 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, sacarosa 255 mM conteniendo inhibidores de proteasas) enfriado con hielo. Se determinó el peso húmedo de los hígados y se molió el tejido en 5 volúmenes de buffer TES enfriado con hielo y se preparó una suspensión utilizando un politrón. Todos los buffers y agitadores se conservaron a 4°C . La suspensión se homogeneizó adicionalmente usando tres golpes de un homogeneizador dounce manual. El homogenato se pasó a través de varias capas de estopa y se centrifugó a 25 000 x g durante 10 minutos. Los pélets se homogeneizaron en 22,1 ml de buffer TES utilizando 10 golpes de un homogeneizador dounce manual. Se agregaron veintisiete mililitros y nueve décimas de sacarosa 2,4 M en TE y se mezcló bien. El homogenato se distribuyó en varios tubos y cada tubo se cubrió con 7 ml de buffer TES. Los tubos se centrifugaron a 120 000 x g durante 60 minutos. Las membranas plasmáticas se retiraron de la interfase que se formó durante el centrifugado, se diluyeron en TES y se concentraron usando una centrifugación de 15 minutos a 200 000 x g. El pélet resultante se homogeneizó otra vez en 9,8 ml de buffer TES, se combinó con 10,3 ml de sacarosa 2,4 M, se cubrió con 7 ml de TES y se centrifugó a 180 000 x g durante 30 minutos. Las membranas plasmáticas se retiraron de la

interfase, se diluyeron con TES y se recogieron por centrifugación a 200 000 x g durante 15 minutos. El pellet final se resuspendió en TES. Las membranas plasmáticas se conservaron a -80°C hasta estar listas para su uso.

Ejemplo 6

Preparación de hepatocitos de rata

Se aislaron hepatocitos de acuerdo con un procedimiento modificado de Berry y Friend (*J Cell Biol* 43:508, 1969). Se anestesió con pentobarbital sódico (55 mg/kg, i.p.) una rata Wistar macho. La rata se colocó sobre su lomo en la bandeja del aparato de perfusión hepática (37°C) y sus miembros se aseguraron con cinta de laboratorio. La superficie ventral se limpió con alcohol 70% y la cavidad abdominal se abrió con tijeras para exponer el hígado, la vena porta, la arteria hepática y la vena cava posterior. Se colocaron ligaduras holgadas alrededor de los tres vasos. Se insertó una cánula en la vena porta y se aseguró con la ligadura. La arteria hepática y la vena cava posterior por debajo del hígado se ataron con las ligaduras. La bomba de perfusión se encendió y la aorta descendente se seccionó inmediatamente para permitir que el buffer escapara y se desangrara la rata. La cavidad torácica se abrió rápidamente para exponer el corazón. Se insertó una cánula en la vena cava superior a través del corazón y se aseguró con una ligadura para completar la circulación del buffer a través del hígado. El hígado se perfundió con buffer Krebs-Henseleit conteniendo 5 – 10% de RBC de oveja y bajo un caudal constante de 95% de O_2 /5% de CO_2 *in situ* con un caudal de 14 ml/minuto. Se perfundió en un sistema no circulante durante 5 minutos y luego se continuó con un sistema de recirculación (con 30 mg de colagenasa) durante otros 30 minutos. Luego se extrajo el hígado, se molió con tijeras en un vaso de plástico y se filtró a través de un tamiz de nylon. Los hepatocitos se separaron del material de desecho mediante una serie de lavados con buffer y centrifugaciones (690 rpm, temperatura ambiente, 90 segundos). Se

diluyó con buffer una alícuota de células, se tiñó con Trypan Blue 0,4% y se hizo un recuento. El resto de las células se diluyó con buffer hasta una densidad apropiada para cada ensayo.

Ejemplo 7

Protocolo para aislamiento de islotes de rata

Se usaron ratas Sprague Dawley (275-320 g) como fuente donante de islotes. En resumen, el páncreas se llenó con 10 ml de Liberase RI (Boehringer Mannheim) reconstituida, se cosechó y se incubó con 5 ml adicionales de solución enzimática en un baño de agua durante 30 minutos. La suspensión de tejido se lavó dos veces con buffer FBS/Hanks (Gibco) 10% frío, se resuspendió en 8 ml de ficoll 25% (Sigma) y luego se dispuso en capas de 5 ml cada una de ficoll 23%, 20% y 11%. Los islotes de la capa de 20% después de la centrifugación se retiraron, se lavaron dos veces con buffer FBS/Hanks 10% frío y se resuspendieron en medio FBS/RPMI 10% (Sigma).

Ejemplo 8

Unión competitiva del péptido al receptor del GLP-1 en membranas plasmáticas de células RINm5F

Los valores de IC_{50} para la unión competitiva de los polipéptidos y de los fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención al receptor del GLP-1 en membranas de RINm5F están típicamente al menos entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 20 nM (es decir, 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nM). Los valores de IC_{50} para los derivados de polipéptidos de la invención están típicamente al menos entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 500 nM (es decir, 0,01, 0,1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ó 500 nM).

La unión competitiva de algunos polipéptidos de la invención a las membranas de células RINm5F se midió de la siguiente manera. Se bloquearon

placas de filtración GF/C de noventa y seis pocillos (Millipore, Bedford, MA) con PEI 0,3% durante al menos una hora y se lavaron dos veces con buffer de unión que consistía en Tns 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5, BSA 1 mg/ml y bacitracina 1 mg/ml. Se aplicaron a cada pocillo cinco microgramos de membranas plasmáticas de células RINm5F diluidas en buffer de unión junto con GLP-1 marcado con ^{125}I de 0,05 μCi y concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M. Luego de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo que contenía 1 mg/ml de BSA. Las placas se secaron, se agregó reactivo de centelleo a cada pocillo y se determinaron las cpm por pocillo usando un contador Wallac Microbeta.

El número de cuentas de ^{125}I unido a las membranas para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Pnzm para determinar los IC_{50} . Los polipéptidos expuestos en la tabla 2 se unieron al receptor del GLP-1 presente en las membranas plasmáticas aisladas de células RINm5F con valores de IC_{50} de entre 1,4 nM y 248 nM (determinados a partir de un mínimo de tres ensayos). IC_{50} es la concentración de un polipéptido para la cual la unión máxima del GLP-1 (7-36) (SEC ID NO 2) marcado se reduce en un 50%.

Ejemplo 9

Unión competitiva del péptido al receptor del glucagón en membranas plasmáticas de hígado de rata

Los valores de IC_{50} para la unión competitiva de los polipéptidos y de los fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención al receptor del glucagón en membranas de hígado de rata están típicamente al menos entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 1000 nM (es decir, 0,1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ó 1000 nM).

La unión competitiva de algunos polipéptidos de la invención a las membranas de hígado de rata se midió de la siguiente manera. Se bloquearon placas de filtración GF/C de noventa y seis pocillos (Millipore, Bedford, MA) con PEI 0,3% durante al menos una hora y se lavaron dos veces con buffer de unión que consistía en Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5, BSA 1 mg/ml y bacitracina 1 mg/ml. Se aplicaron a cada pocillo tres microgramos de membranas plasmáticas de hígado de rata diluidas en buffer de unión junto con glucagón marcado con ^{125}I de 0,05 μCi y concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M. Luego de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo que contenía 1 mg/ml de BSA. Las placas se secaron, se agregó reactivo de centelleo a cada pocillo y se determinaron las cpm por pocillo usando un contador Wallac Microbeta.

El número de cuentas de ^{125}I unido a las membranas para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Pnzm para determinar los IC_{50} . Los polipéptidos expuestos en la tabla 2 se unieron al receptor del glucagón presente en las membranas plasmáticas aisladas de hígado de rata con valores de IC_{50} de entre 11,7 nM y 726 nM (determinados a partir de un mínimo de tres ensayos). IC_{50} es la concentración de un polipéptido para la cual la unión máxima del glucagón marcado se reduce en un 50%.

Ejemplo 10

Medición de la señalización de péptidos a través del receptor del GLP-1 utilizando el ensayo de proximidad por centelleo (SPA) del AMP cíclico

Para polipéptidos y fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del GLP-1 en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 80% y aproximadamente 200% (es decir, 85, 90, 95, 100,

105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 ó 200 %) de la máxima actividad inducida por el GLP-1(7-36) (SEC ID NO 2) nativo, con una potencia relativa de al menos entre un 4% y aproximadamente 1000% (es decir, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000%) Para derivados de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del GLP-1 en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 80% y aproximadamente 200% (es decir, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 ó 200 %) de la máxima actividad inducida por el GLP-1(7-36) (SEC ID NO 2) nativo, con una potencia relativa de al menos entre un 0,5% y aproximadamente 1000% (es decir, 0,5, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000%) La "potencia relativa" es la EC_{50} del GLP-1(7-36) (SEC ID NO 2) nativo dividida por la EC_{50} de un polipéptido de la invención, multiplicado por 100 "EC₅₀" es la concentración de un polipéptido para la cual se alcanza el 50% de la actividad máxima

La señalización de péptidos del receptor del GLP-1 para algunos polipéptido de la invención utilizando el ensayo de proximidad por centelleo del cAMP, se midió de la siguiente manera Se plaquearon células RINm5F en placas de 96 pocillos (Costar) a razón de $1,5 \times 10^5$ células/pocillo y se cultivaron a 37°C durante 24 horas en RPMI 1640, FBS 5%, antibiótico/antimicótico (Gibco BRL) El medio se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS Las células se incubaron con concentraciones de péptidos que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M en Hepes-PBS que contenía BSA 1% e IBMX 100 μ M durante 15 minutos a 37°C Para probar los péptidos conjugados con ácido graso, se omitió el BSA del buffer de incubación Se retiró el buffer de incubación y las células se lisaron en el reactivo de lisado provisto con el sistema de ensayo de detección directa del

Ensayo de Proximidad por Centelleo del cAMP (SPA) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ) La cantidad de cAMP (en pmol) presente en los lisados se determinó siguiendo las instrucciones provistas con el equipo

La cantidad de cAMP (en pmol) producido para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Prism APRA determinar la EC_{50} para cada péptido El valor de potencia relativa promedio para la activación del receptor del GLP-1 para los polipéptidos expuestos en la Tabla 2 estuvo entre el 0,6% y el 76,1% La máxima actividad inducida osciló entre el 83% y el 132% del péptido nativo GLP-1(7-36) (SEC ID NO 2) (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos) Ver la Tabla 4

Ejemplo 11

Medición de la señalización de péptidos a través del receptor del glucagón utilizando el ensayo de proximidad por centelleo (SPA) del AMP cíclico

Para polipéptidos y fragmentos, variantes y análogos de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del glucagón en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 0% y aproximadamente 75% (es decir, 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, ó 75%) de la máxima actividad inducida por el glucagón nativo, con una potencia relativa de al menos entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 5% (es decir, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4 ó 5%) Para derivados de polipéptidos de la invención, la "activación" del receptor del glucagón en un ensayo de proximidad por centelleo del cAMP es la inducción de una actividad máxima que sea al menos entre aproximadamente 0% y aproximadamente 40% (es decir, 0, 1, 10, 20, 30 ó 40%) de la máxima actividad inducida por el glucagón nativo, con una potencia relativa de al menos entre aproximadamente un 0,001 y aproximadamente un 1% (es decir, 0,001, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ó 1%) La "potencia relativa" es la EC_{50} del

glucagón nativo (SEC ID NO 1) dividida por la EC_{50} de un polipéptido de la invención, multiplicado por 100 " EC_{50} " es la concentración de un polipéptido para la cual se alcanza el 50% de la actividad máxima

La señalización de péptidos del receptor del glucagón para algunos polipéptido de la invención utilizando el ensayo de proximidad por centelleo del cAMP, se midió de la siguiente manera. Se plaquearon hepatocitos de ratas aislados recientemente en placas de 96 pocillos a razón de $7,5 \times 10^4$ ó 2×10^5 células/pocillo en HEPES-bicarbonato que contenía 1% de BSA e IBMX $100 \mu M$ luego del equilibrado a $37^\circ C$ en un medio de 5% de CO_2 /95% de O_2 durante 10 minutos, se agregaron péptidos en concentraciones que oscilaban entre 1×10^{-12} y 1×10^{-5} M durante otros 15 minutos. Las placas se centrifugaron brevemente, se retiró el buffer de incubación y las células se lisaron en el reactivo de lisado provisto con el sistema de ensayo de detección directa del Ensayo de Proximidad por Centelleo del cAMP (SPA) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ)

La cantidad de cAMP (en pmol) presente en los lisados se determinó siguiendo las instrucciones provistas con este equipo. La cantidad de cAMP (en pmol) producido para cada concentración de péptido se graficó y analizó por regresión no lineal utilizando el programa Pnzm APRA determinar la EC_{50} para cada péptido. El valor de potencia relativa promedio (relación entre la concentración del glucagón y la concentración del polipéptido para una respuesta del 50% (EC_{50}) $\times 100$, determinado a partir de un mínimo de tres ensayos) para la activación del receptor del glucagón para los polipéptidos de la invención fue $<5\%$. La máxima actividad inducida osciló entre el 28,3% y el 71,3% del péptido nativo glucagón (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos)

La capacidad del péptido híbrido para inhibir la actividad del glucagón se midió de la siguiente manera. luego del equilibrado a $37^\circ C$ en un medio de 5% de

CO₂/95% de O₂ durante 10 minutos, se agregó péptido 10 μ M a las células, seguido inmediatamente de una concentración submáxima de glucagón durante 15 minutos. Luego las células se lisaron y se determinó el cAMP como se describió anteriormente.

Luego de restar la cantidad de cAMP producida en los hepatocitos no estimulados de cada punto tomado como dato, se calculó la inhibición porcentual de la siguiente manera: la inhibición porcentual es la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagón submáximo solo menos la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagón submáximo y péptido 10 μ M, dividido por la cantidad de cAMP producida en presencia de glucagón submáximo solo, y multiplicado por 100. La inhibición porcentual promedio de la actividad del glucagón por parte de los polipéptidos expuestos en la Tabla 2 se ubicó entre el 11,3% y el 59% (determinada a partir de un mínimo de tres ensayos). Ver la Tabla 4.

Ejemplo 12

Medición de la liberación de glucosa de hepatocitos de rata

La inhibición de la producción de glucosa mediada por glucagón, medida por la liberación de la glucosa de hepatocitos de rata, se ubica típicamente al menos entre aproximadamente un 20% de inhibición y aproximadamente un 100% de inhibición (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%).

La inhibición de la producción de glucosa mediada por glucagón por parte de algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera. Se agregaron hepatocitos de rata a una placa de fondo plano de 96 pocillos (2×10^5 /100 μ l/pocillo) y se pre-incubaron en una incubadora a 37°C con agitación constante y bajo un flujo de 95% de O₂/5% de CO₂ durante 10 minutos. Los hepatocitos se incubaron durante otros 30 minutos después del agregado de glucagón con o sin péptido. Las células se lisaron luego con ácido perclórico 15% y las placas se centrifugaron a 2600 rpm, a 4°C durante 15 minutos. El

sobrenadante se neutralizó con Tris-HCl 1M (pH 8,0) KOH 2,5 N (45 55) y se centrifugó otra vez. En el sobrenadante resultante se analizó la glucosa con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Methods of Enzymatic Analysis, H U Bernmeyer, Ed , Academic Press) y se leyó la A_{340} en un lector de placas fMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)

La liberación de glucosa se calculó después de restar la cantidad de glucosa producida en el hepatocito no estimulado de cada punto tomado como dato y se calculó la inhibición porcentual. La inhibición porcentual es la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagón 1nM solo menos la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagón 1 nM y péptido 100 nM, dividido por la cantidad de glucosa producida en presencia de glucagón 1nM solo, y multiplicado por 100. El polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 6 inhibió la producción de glucosa mediada por glucagón en un 47%, según se determinó en 3 ensayos. Ver la Tabla 2

Ejemplo 13

Medición de la secreción de insulina por islotes de ratas perfundidas

El incremento de la secreción de insulina por parte de los islotes de ratas perfundidas es un incremento de al menos 1,5 veces. El componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la invención incrementa la secreción de insulina de los islotes perfundidos al menos entre 1,5 veces y aproximadamente 10 veces (es decir, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ó 10 veces)

La secreción de insulina por parte de los islotes de ratas perfundidas mediada por algunos péptidos de la invención se midió de la siguiente manera. Las respuestas bifásicas de la liberación de insulina estimulada por estos polipéptidos se ensayaron mediante la perfusión de los islotes. Se cargaron cincuenta islotes en la cámara de perfusión y se perfundieron con HEPES-KRB que contenía glucosa 3 mM a 37°C. Después de 60 minutos, los islotes se

expusieron a un buffer que contenía glucosa 8 mM con o sin péptido (50 nM) y se perfundieron durante otros 30 minutos. Las fracciones del perfusato se recogieron a intervalos de 1 ó 5 minutos para la determinación de la insulina. La insulina se midió utilizando un equipo de ELISA (Alpco Diagnostics, Windham, NH). A una concentración de 50 nM, el polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 6 incrementó la secreción de insulina de los islotes perfundidos aproximadamente 2 veces, que es equivalente a lo logrado por el GLP-1 50 nM.

Ejemplo 14

Secreción de insulina de células dispersas de islotes de rata

El incremento de la secreción de insulina por parte de células dispersas de islotes de ratas, en este ensayo, es un incremento de al menos 1,5 veces. El componente agonista del receptor del GLP-1 de dichos polipéptidos de la invención incrementa la secreción de insulina de células dispersas de islotes al menos entre 1,5 veces y aproximadamente 10 veces (es decir, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ó 10 veces).

La secreción de insulina por parte de células dispersas de islotes de ratas mediada por una cantidad de péptidos de la invención se midió de la siguiente manera. Se aislaron islotes de Langerhans de ratas SD (200-250 g) a través de un procedimiento de digestión que utiliza colagenasa. Las células dispersas de los islotes se prepararon mediante tratamiento con tripsina, se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en forma de V y se pelletizaron. Las células se cultivaron durante toda la noche en un medio. El medio se aspiró y las células se pre-incubaron con buffer Krebs-Ringer-HEPES que contenía glucosa 3mM durante 30 minutos a 37°C. El buffer de pre-incubación se retiró y las células se estimularon con buffer Krebs-Ringer-HEPES que contenía la concentración de glucosa adecuada (por ej. 8 mM), con y sin péptidos, durante un tiempo adecuado a 37°C.

En algunos estudios, también se incluye una concentración apropiada de GLP-1. Se retiró una porción de sobrenadante y se midió su contenido en insulina por medio de SPA. Los resultados se expresan como factor por encima del control (FOC). A una concentración de 50 nM, el polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 27 incrementó la secreción de insulina de las células dispersas de los islotes en aproximadamente 3 veces. Ver Tabla 2.

Ejemplo 15

Medición de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratas Wistar alimentadas

La inhibición de la producción de glucosa estimulada por glucagón en este ensayo es una inhibición de por lo menos el 20%. El componente antagonista del receptor del glucagón de los polipéptidos de la invención inhibe la elevación de la glucosa sanguínea mediada por el glucagón, según se mide a través de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratas Wistar alimentadas, en al menos una inhibición entre el 20% y aproximadamente el 100% de inhibición (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%).

La producción de glucosa estimulada por glucagón en ratas Wistar alimentadas por algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera. Se anestesiaron por un breve lapso ratas Wistar macho con gas isoflurano, se les extrajo sangre de la cola para medir la glucemia utilizando un Glucometer y luego se les aplicó una inyección en la vena de la cola de cada vehículo (0,9% de solución salina + albúmina humana 1%), 0,29 nmol/kg de glucagón, 1 nmol/kg de polipéptidos de la invención o glucagón + polipéptido de la invención. Se retiró la anestesia y a las ratas conscientes se les extrajo sangre nuevamente después de 10, 20 y 30 minutos.

Se determinó la inhibición de la glucosa analizando el área bajo la curva de glucosa después de restar el nivel de glucosa basal (dABC). La inhibición porcentual se define como la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagón solo menos la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagón en presencia de 1 nmol/kg de péptido híbrido, dividido por la cantidad de glucosa producida por 0,3 nmol/kg de glucagón solo, y multiplicado por 100.

El glucagón solo elevó los niveles de glucosa sanguínea mientras que los polipéptidos de la invención solos no tuvieron efecto sobre los niveles de glucosa sanguínea. El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 6 inhibió la elevación de la glucosa sanguínea mediada por glucagón en un 63%. Ver la Tabla 2.

Ejemplo 16

Medición de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratones Balb/C alimentados

La inhibición de la producción de glucosa en este ensayo es una inhibición de por lo menos aproximadamente el 20%. Con preferencia, el componente antagonista del receptor del glucagón de los polipéptidos de la invención inhibe la elevación de la glucosa sanguínea mediada por el glucagón en ratones, según se mide a través de la producción de glucosa estimulada por glucagón en ratones Balb/C alimentados, entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 100% (es decir, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%).

La producción de glucosa estimulada por glucagón en ratones Balb/C alimentados por algunos polipéptidos de la invención, se midió de la siguiente manera. A ratones Balb/C machos se les suministró vehículo (0,9% de solución salina + albumina humana 1%) o 100 µg/kg de polipéptido derivatizado por inyección subcutánea 17 horas antes de la provocación con glucagón. Al día siguiente los ratones se sometieron a ayuno durante 2 horas antes de recibir una

inyección endovenosa de 10 µg/kg de glucagón o vehículo en la vena de la cola
Se extrajo a los ratones sangre de la cola para la determinación de glucosa utilizando un Glucometer justo antes de la inyección de glucagón y nuevamente 15 minutos después

Se calculó el cambio en la glucosa luego de los 15 minutos para cada ratón. Luego el cambio promedio en la glucosa del grupo tratado con vehículo se restó del cambio en la glucosa para cada ratón en los grupos tratados para obtener el cambio en la glucosa debido al glucagón. La inhibición porcentual se define como la cantidad de glucosa producida por 10 µg/kg de glucagón solo menos la cantidad de glucosa producida por µg/kg de glucagón en presencia de 100 µg/kg de péptido híbrido, dividido por la cantidad de glucosa producida por 100 µg/kg de glucagón solo, y multiplicado por 100. Ver la Tabla 3

Tabla 3

Grupo	Glucosa (mg/dl)				% de 10 µg/kg de Glucagón	% de Inhibición
	0 min	15 min	Delta (15-0)	-Vehículo delta		
Vehículo	92	108	16			
10 µg/kg de glucagón	95	195	100	84	100	
10 µg/kg de glucagón + 100 µg/kg de polipéptido (SEC ID NO 27)	75	150	75	59	69	31

Ejemplo 17

Medición de los aumentos en los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa in vivo (IVGTT) en ratas Wistar sometidas a ayuno

Un aumento en los niveles plasmáticos de insulina en este ensayo es de por lo menos un factor 2. Con preferencia, el componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la invención aumenta la secreción de insulina en

ratas, según se mide a través de un aumento en los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa *in vivo* en ratas Wistar sometidas a ayuno, en un factor entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, con mayor preferencia entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10, y , con mayor preferencia aún, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 (es decir, en un factor 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20)

Los niveles plasmáticos de insulina durante el ensayo de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar sometidas a ayuno por algunos polipéptidos de la invención, se midieron de la siguiente manera Ratas Wistar macho se sometieron a ayuno durante toda la noche y luego se anestesiaron con gas isoflurano A las ratas se les aplicó una inyección en la vena de la cola de 0,4 g/kg de glucosa más vehículo (0,9% de solución salina + albúmina humana 1%) ó 1 nmol/kg de GLP-1 (control positivo) ó 1 nmol/kg de polipéptidos de la invención Se extrajo sangre del ojo de las ratas un minuto después y se determinó la insulina en el plasma utilizando un equipo de ELISA (Alpco Diagnostics (Windham, NH)) A una concentración de 1 nmol/kg, el polipéptido que tenía la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID NO 6 promovió la secreción de insulina en un factor 3-4, lo cual es equivalente al logrado por 1 nmol/kg de GLP-1 Ver la Tabla 2

Ejemplo 18

Efecto de los péptidos de la invención en el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en ratas o ratones

Una disminución en los niveles de glucosa sanguínea medidos en este ensayo es una disminución de por lo menos aproximadamente un 10% Con preferencia, el componente agonista del receptor del GLP-1 de los polipéptidos de la invención disminuye los niveles de glucosa sanguínea, según se mide a través del ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratas o ratones, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 60%, con mayor preferencia

entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 80%, y , con mayor preferencia aun, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 100% (es decir, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100%)

Los niveles de glucosa sanguínea durante el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal por algunos polipéptidos de la invención, se midieron de la siguiente manera Se examinó en ratos o ratones la actividad *in vivo* de los polipéptidos de la invención cuando se los administra en forma subcutánea Las ratas o ratones mantenidos en ayunas toda la noche recibieron una inyección subcutánea de control o péptido (100 g/kg) Se midió la glucosa sanguínea basal antes de la administración de los péptidos o tres o 17 horas después de la administración de los péptidos denvatizados, y las ratas o ratones recibieron 2 g/kg de glucosa en forma intraperitoneal Se midió la glucosa sanguínea otra vez después de 15, 30 y 60 minutos en ratas o después de 30 y 60 minutos en ratones

Los péptidos de la invención redujeron en forma significativa los niveles de glucosa sanguínea con respecto al vehículo luego del IPGTT, con una reducción del 13%-54% en el ABC de la glucosa Esto demuestra que los péptidos tienen una prolongada actividad depresora de la glucosa y una prolongada vida media *in vivo* el GLP-1 tiene una vida media muy corta *in vivo* (< 10 min) La capacidad de los péptidos de la invención para disminuir la glucosa sanguínea 3 horas después de la administración del péptido es una clara indicación de que el péptido está presente en la circulación en este instante y por ello tiene una prolongada vida media respecto del GLP-1

Ejemplo 19

Incorporación de PEG a los péptidos

La incorporación de PEG puede efectuarse por cualquier método conocido por los expertos en el arte Sin embargo, en esta instancia, la incorporación de

PEG se llevó a cabo introduciendo una única mutación de cisteína en el péptido seguido de incorporación del PEG a la cisteína por medio de un enlace tioéter estable entre el sulfhidrilo del péptido y el grupo maleimida del reactivo metoxi-PEG-maleimida (Inhale/Shearwater). Es preferible introducir la única cisteína en el extremo C-terminal del péptido para minimizar la potencial reducción de la actividad por incorporación del PEG.

Específicamente, se agregó un exceso molar de 2 a 1 de reactivo mPEG-mal (PM 22 kD y 43 kD) a 1 mg de péptido (por ej. SEC ID NO 25 con una mutación de cisteína en el extremo C-terminal del péptido) y se disolvió en buffer de reacción a pH 6 (fosfato de Na 0,1 M/ NaCl 0,1 M/ EDTA 0,1 M) después de 0,5 hora a temperatura ambiente, la reacción se frenó con un exceso doble de moles de DTT o de cisteína libre respecto del mPEG-mal. La mezcla de reacción péptido-PEG-mal se aplicó a una columna de intercambio catiónico para eliminar los reactivos de PEG residuales seguido de una columna de gel filtrante para eliminar el péptido libre residual. Se determinaron la pureza, la masa molecular y el número de sitios con PEG incorporado por medio de SDS-PAGE y espectrometría de masa MALDI-TOF. La incorporación de PEG con un PEG de menor tamaño (por ej. un PEG de 22 kD lineal) reducirá la actividad del péptido con menor probabilidad mientras que un PEG de mayor tamaño (por ej. un PEG de 43 kD ramificado) reducirá la actividad con mayor probabilidad. Sin embargo, el PEG de mayor tamaño incrementará la vida media plasmática en mayor medida de modo que sea posible una inyección una vez a la semana (Harns, *et al*, PEGylation: A Novel Process for Modifying Pharmacokinetics, *Clin Pharmacokinet* 40 539-551, 2001).

Ejemplo 20

Potencia relativa de los polipéptidos agonistas del receptor del GLP-1 y antagonistas del receptor del glucagón

La unión del GLP-1 (valores de IC_{50}) para los polipéptidos que se listan en la tabla 4 se determinó como se describe en el Ejemplo 8. Los valores de potencia relativa y de actividad porcentual del GLP-1 se calcularon como se describe en el Ejemplo 10. Se suministró a ratas o ratones 100 g/kg de péptido y a las 3 horas posteriores a la dosificación se determinó la disminución de los niveles de glucosa mediante el ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT), según se describe en el Ejemplo 18. Ver la Tabla 4.

La unión a las membranas hepáticas (valores de IC_{50}) para los polipéptidos que se listan en la tabla 4 se determinó como se describe en el Ejemplo 9. La inhibición porcentual del aumento del cAMP estimulado por glucagón se determinó como se describe en el Ejemplo 11. Se suministró a ratas o ratones 100 g/kg de péptido y a las 17 horas posteriores a la dosificación se determinaron los niveles de glucosa mediante los métodos de los Ejemplos 15 y 16 y que se informan en la tabla 4. Los polipéptidos de la invención funcionan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón *in vivo*.

Péptido	GLP-1				Glucagón			
	IC50 de RIN (nM)	Potencia Relativa (%)	% GLP-1 máx	Disminución de ABC en IPGTT <i>in vivo</i> (%) ^a	IC50 de Hígado (nM)	% de Inhib del aumento del cAMP estimulado por glucagón	% de disminución de la glucosa sanguínea estimulada por glucagón ^b	
Glucagón					1,8			
GLP-1	0,4	100	100					
G1	6	6,9	112,1		6,6			
G5	0,5	69,9	109,4		243,1			
G27	2,2	13,4	98,1		69,3	31		
G51	8,2	58,1	91,2		154,1	35,2		
G55	9,8	18,6	115,9		139,2	32,1		
G56	6,8	37,2	114,8		125,3	28,6		
G57	14,7	18,3	132,4		177,5	18,4		
G58	6,9	76,1	99,0		163,5	32,6		
G59	2,1	22,7	101,7		97,5	41,1		
G60	13,8	22,3	95,7		682	21,8		
G61	10,6	12,1	96,0		232	45,2		

G71	5,8	4,3	93,3		25,6	11,3		
G74	4,4	8,4	88,7		21,7	23,7		
G75	7,7	6,6	86,1		54,0	17,1		
G76	10,2	7,7	85		59,1	23,0		
G77	8,9	9,5	92,1		61,1	18,6		
G277	ND	1,8	93,7	46	63,5			
G82	8,1	29,9	97,1		33,6	30,2		
G83	3,2	29,9	89,4		28,6	24,7		
G84	1,4	61,8	113,9		11,7	25,2		
G85	1,5	64,5	95,8		18,1	27,9		
G185	4,5	13,0	103,9		48	32		
G2185	56,1	6,2	112,7	44	347			
G4185	248	0,7	98,3	36	547		31	
G87	98,6	6,1	100,4	13	620	59		
G88	109,0	2,3	118,3	16	350			
G90	25,4	0,8	83,5	13	726			
G182	12,6	1,4	104,4	14	220			
G183	158,7	0,6	90,5	27	663			

a = IPGTT en ratones 3 horas posteriores a la dosificación con 100 g/kg de péptido

b = provocación con glucagón en ratones 17 horas posteriores a la dosificación con 100 g/kg de péptido

ND = no determinado

<110> Pan, Clark

<120> Péptidos que actúan como agonistas del receptor GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón y sus métodos de uso farmacológico

<130> 2973 00085

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOU RES

 $\langle 222 \rangle$ (30) $\bar{(30)}$

<223> AMIDACIÓN

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 4

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

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

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 6

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

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

<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 7

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

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

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<400> 8

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

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

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<900> 9

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

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

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30) <223> AMIDACIÓN

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 11

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

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

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 14

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

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

<210> 15

<211> 31 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 15

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

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

<210> 16

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 17

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

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

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 19

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

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

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

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31) (31)
 <223> Incorporación de PEG

<400> 20

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

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

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

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 21
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala
 1 5 10 15

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

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

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 22

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

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

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31) (31)
 <223> Incorporación de PEG

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31) (31)
 <223> Incorporación de PEG

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Arg Tyr Leu Asp Ala

1	5	10	15
Arg	Arg	Ala	Arg
	Glu	Phe	Ile
		Lys	Trp
		Leu	Val
		Arg	Gly
		Arg	Cys
	20	25	30

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) (30)
<223> AMIDACIÓN

<220>
<221> LÍPIDO
<222> (20) (20)
<223> PALMITATO

<400> 28

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

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

<210> 29
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> LÍPIDO
<222> (31) (31)
<223> PALMITATO

<400> 29

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

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

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

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> LÍPIDO
<222> (24) (24)
<223> PALMITATO

<400> 30

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

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

<210> 31
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> LÍPIDO
<222> (32) (32)
<223> PALMITATO

<400> 31

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

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

<210> 32
<211> 31

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> LÍPIDO
<222> (24) (24)
<223> PALMITATO

<400> 32

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

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

<210> 33
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 33

Ile Glu Gly Arg His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys
1 5 10 15

Tyr Leu Asp Ala Arg Arg Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys
20 25 30

Gly Arg Gly
35

<210> 34
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (11) (12)
<223> X11 = R, G, S, A, K ó T
X12 = K, N, R, A, S, H ó Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16) (18)
<223> X16 = A, F, S, W, T, H, K, R, V, I, L, M, N, Q, G ó Y
X17 = R, A, L, M, V, Q, K, F, I, W, N, D, E, H, S, T, G ó Y
X18 = K, R, F, I, L, Y, V, M, A, G ó H

<400> 34

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

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

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo

- 1 Un polipéptido seleccionado del grupo integrado por las SEC ID NOS 6 a 32, y sus fragmentos, derivados y variantes funcionalmente equivalentes
- 2 Un polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica de la reivindicación 1, o una variante degenerada del mismo
- 3 Un vector que comprende un polinucleótido de la reivindicación 2
- 4 Una célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 3
- 5 Un método para la producción de un polipéptido, que comprende
 - a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido, y
 - b) recuperar el polipéptido del cultivo de la célula huésped
- 6 Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la reivindicación 1 en combinación con un vehículo aceptable para uso farmacéutico
- 7 Una composición para terapia génica que comprende un polinucleótido de la reivindicación 2 en combinación con un vector para terapia génica terapéuticamente efectivo
- 8 El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO 25
- 9 El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO 26
- 10 El polipéptido de la reivindicación 1, en el cual dicho polipéptido se representa mediante SEC ID NO 27
- 11 Un anticuerpo purificado que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 1

12 Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido que sea agonista del receptor del GLP-1 y antagonista del glucagón para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico en un mamífero

13 El uso de la reivindicación 12, en el cual el péptido se selecciona del grupo integrado por las SEC ID NOS 6 a 32, y sus fragmentos, derivados y variantes funcionalmente equivalentes

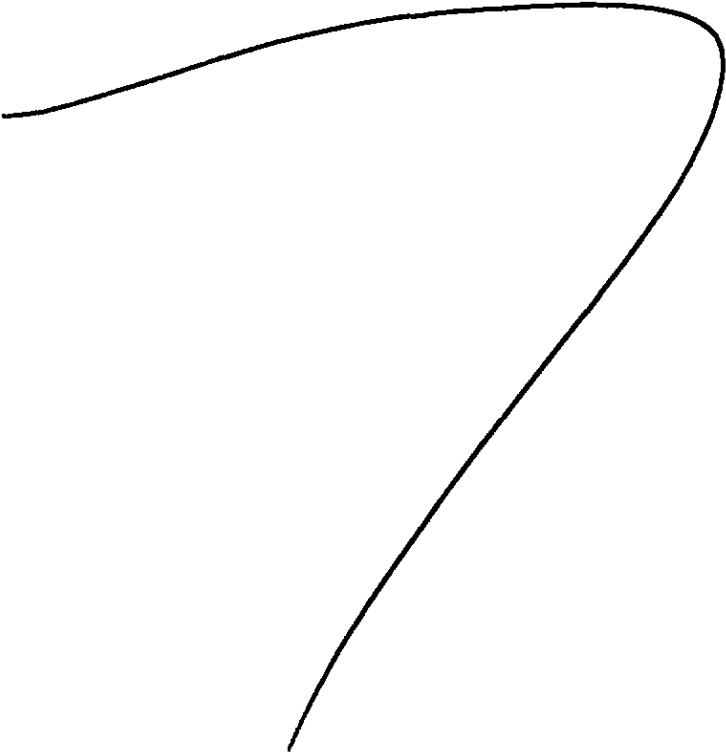
14 El uso de la reivindicación 13, en el cual el péptido se selecciona del grupo integrado por la SEC ID NO 25, SEC ID NO 26 y SEC ID NO 27

15 El uso de la reivindicación 12, en el cual dicho trastorno metabólico es la diabetes tipo 2

16 El uso de la reivindicación 12, en el cual dicha cantidad terapéuticamente efectiva oscila entre aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 1 mg/kg

17 El uso de la reivindicación 12, en el cual dicho trastorno metabólico es el estado pre-diabético de intolerancia a la glucosa

p p BAYER CORPORATION

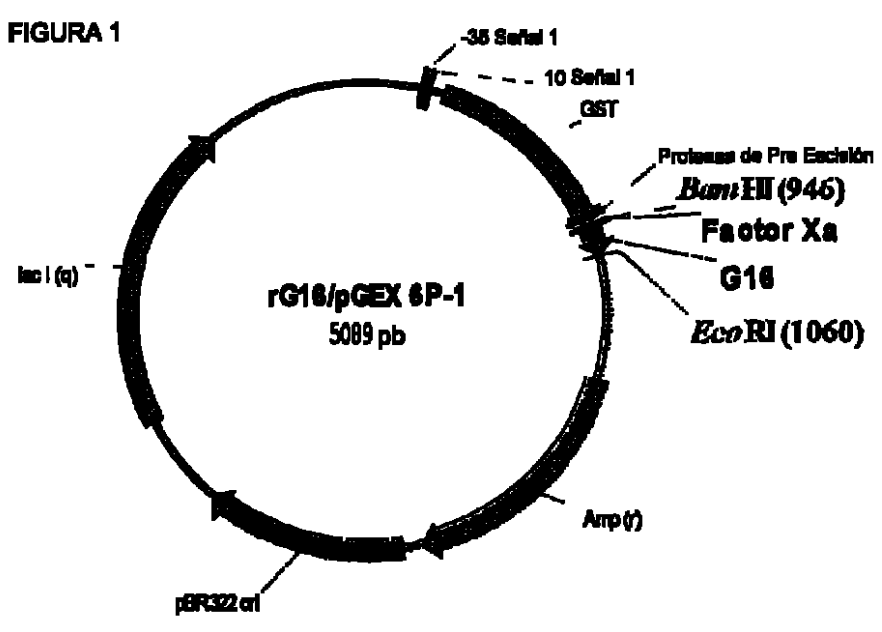


**PÉPTIDOS QUE ACTUAN COMO AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLP-1 Y
COMO ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL GLUCAGÓN Y SUS MÉTODOS
DE USO FARMACOLÓGICO**

RESUMEN

La invención provee polipéptidos que actúan como agonistas del receptor del GLP-1 y como antagonistas del receptor del glucagón. Dichos polipéptidos son útiles para el tratamiento de individuos con diabetes tipo 2 u otros trastornos metabólicos.

FIGURA 1



PS 888140

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

August 28, 2002

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/327,730

FILING DATE October 05, 2001



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

T. Lawrence

**T. LAWRENCE
Certifying Officer**

10-09-01

A/PROV 85

Please type a plus sign (+) inside this box ☐PTO 688/18 (8-00)
Approved for use through 10/31/2002. OMB 0581-0002
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE**PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET**
This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(e).**INVENTOR(S)**

Given Name (first and middle if any)	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
Clark James	Pan Whelan	22302 Princeton Place, Castro Valley, CA 94552 210 Summer Hill Road, Madison, CT 06443

☐ Additional inventors are being named on the _____ separately numbered sheets attached hereto**TITLE OF THE INVENTION (250 characters max)**

Peptides Acting as Both GLP-1 Receptor Agonists and Glucagon Receptor Antagonists and Their Pharmacological Methods of Use

Direct all correspondence to:

CORRESPONDENCE ADDRESS☒ Customer Number 27169 ☐ Number
OR
Type Customer Number here 27169☐ Firm or
Individual Name

PATENT TRANSMISSION OFFICE

Address

Address

City

State

ZIP

Country

Telephone

Fax

ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)☒ Specification Number of Pages 40☐ CD(s), Number ☒ Drawing(s) Number of Sheets 3☐ Other (specify) ☒ Application Data Sheet. See 37 CFR 1.78

Return post card

METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT (check one)☐ A check or money order is enclosed to cover the filing fees☒ The Commissioner is hereby authorized to charge filing
fees or credit any overpayment to Deposit Account Number 03-4000☐ Payment by credit card. Form PTO-2036 is attached.FILING FEE
AMOUNT (\$)

\$150.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the
United States Government.☒ No.☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,

SIGNATURE

Melissa A. Shaw 10/5/01

Date

10-5-01

TYPED or PRINTED NAME Melissa A. Shaw

REGISTRATION NO
(if appropriate)
Docket Number

38,301

MSB-7286-PROV

TELEPHONE (510) 705-7901

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

This collection of information is required by 37 CFR 1.51. The information is used by the public to file (and by the PTO to process) a provisional application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 6 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the complete provisional application to the PTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C. 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Box Provisional Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

P1LARSREV08

APPLICATION DATA SHEET

Application Information.

Application Type: Provisional
Title of Invention: Peptides Acting as Both GLP-1 Receptor Agonists and Glucagon Receptor Antagonists and Their Pharmacological Methods of Use
Attorney Docket Number: MSB-7288-PROV

Correspondence Information.

Name: Melissa A. Shaw
Senior Patent Counsel
Address: Bayer Corporation
800 Dwight Way
City: Berkeley
State: California
Country: US
Zip Code: 94710
Telephone: (510) 705-7901
Fax: (510) 705-7904

Legal Representatives:

Attorney or Agent: Melissa A. Shaw
Registration Number: 38,301

INVENTOR(s):

Primary Citizenship: United States
Given Name: Clark
Family Name: Pan
Residence City: Castro Valley
Residence Country: US
Address: 22362 Princeton Place
Castro Valley, California 94552

Primary Citizenship: Ireland
Given Name: James
Family Name: Whelan
Residence City: Madison
Residence Country: US
Address: 210 Summer Hill Road
Madison, Connecticut 06443

Peptides Acting as Both GLP-1 Receptor Agonists and Glucagon Receptor
Antagonists and Their Pharmacological Methods of Use

Field of the Invention

5 This invention relates to newly identified polypeptides that act both as an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor, and the use of such polypeptides for therapeutic purposes. More particularly, the polypeptides of the present invention are useful in stimulating the release of insulin from pancreatic beta cells in a glucose-dependent manner and reducing
10 glucagon-mediated secretion of glucose from the liver, thereby providing a treatment option for those individuals afflicted with a metabolic disorder such as, diabetes, hyperglycemia, impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance, prediabetic states, and obesity.

15 Background of the Related Art

 Diabetes is characterized by impaired glucose metabolism manifesting itself among other things by an elevated blood glucose level in the diabetic patient. Underlying defects lead to a classification of diabetes into two major groups: type 1 diabetes, or insulin dependent diabetes mellitus (IDDM), which
20 arises when patients lack insulin-producing beta-cells in their pancreatic glands, and type 2 diabetes, or non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), which occurs in patients with an impaired beta-cell function and alterations in insulin action.

 Type 1 diabetic patients are currently treated with insulin, while the
25 majority of type 2 diabetic patients are treated with agents that stimulate beta-cell function or with agents that enhance the tissue sensitivity of the patients towards insulin. Over time almost one-half of type 2 diabetic subjects lose their response to these agents and then must be placed on insulin therapy. The drugs presently used to treat type 2 Diabetes include

Alpha-glucosidase Inhibitors (PRECOSE , VOGLIBOSE™, and MIGLITOL®) Alpha-glucosidase inhibitors reduce the excursion of postprandial glucose by delaying the absorption of glucose from the gut. These drugs are safe and provide treatment for mild to moderately affected diabetic subjects. However, gastrointestinal side effects have been reported in the literature

Insulin sensitizers. Insulin sensitizers are drugs that enhance the body's response to insulin. Thiazolidinediones such as Avandia™ (rosiglitazone) and Actos™ activate the Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and modulate the activity of a set of genes that have not been well described. Rezulin™ (troglitazone), the first drug in this class, was withdrawn because elevated liver enzyme levels and drug induced hepatotoxicity. These hepatic effects do not appear to be a significant problem in patients using Avandia™ and Actos™. Even so, liver enzyme testing is recommended every 2 months in the first year of therapy and periodically thereafter. Avandia™ and Actos™ seem to be associated with fluid retention and edema. Avandia™ is not indicated for use with insulin because of concern about congestive heart failure. Another potential side effect is weight gain.

Insulin secretagogues (sulfonylureas ("SFUs") and other agents that act by the ATP-dependent K⁺ channel) SFUs are standard therapy for type 2 diabetics that have mild to moderate fasting hyperglycemia. The SFUs have limitations that include a potential for inducing hypoglycemia, weight gain, and high primary and secondary failure rates. 10 to 20% of initially treated patients fail to show a significant treatment effect (primary failure). Secondary failure is demonstrated by an additional 20-30% loss of treatment effect after six months on an SFU. Insulin treatment is required in 50% of the SFU responders after 5-7 years of therapy (Scheen, A.J., et al., Diabetes Res. Clin. Pract. 6:533-543 (1989)).

GLUCOPHAGE™ (metformin HCl) is a biguanide that lowers blood glucose by decreasing hepatic glucose output and increasing peripheral glucose uptake and utilization. The drug is effective at lowering blood glucose in mildly

and moderately affected subjects and does not have the side effects of weight gain or the potential to induce hypoglycemia. However, GLUCOPHAGE has a number of side effects including gastrointestinal disturbances and lactic acidosis. GLUCOPHAGE is contraindicated in diabetics over the age of 70 and in subjects with impairment in renal or liver function. Finally, GLUCOPHAGE has the same primary and secondary failure rates as the SFUs.

Insulin treatment is instituted after diet, exercise, and oral medications have failed to adequately control blood glucose. This treatment has the drawbacks that it is an injectable, that it can produce hypoglycemia, and that it causes weight gain.

Problems with current treatments necessitate new therapies to treat type 2 diabetes. In particular, new treatments to retain normal (i.e., glucose-dependent) insulin secretion are needed. Given glucagon-like peptide-1's ("GLP-1") role in promoting glucose-regulated insulin secretion in the pancreas, GLP-1 receptor agonists are potentially valuable in the treatment of such diseases. Moreover, glucagon receptor antagonists should prove valuable in treating type 2 diabetes given glucagon's role in elevating plasma glucose by stimulating hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis.

GLP-1 and glucagon are members of a family of structurally related peptide hormones, the glucagon/secretin family. Within this family, GLP-1(7-36) and GLP-1(7-37) (30 amino acids and 31 amino acids, respectively) and glucagon (29 amino acids) constitute a highly homologous set of peptides. In addition, these two hormones originate from a common precursor, preproglucagon, which upon tissue-specific processing, leads to production of GLP-1 predominantly in the intestine and glucagon in the pancreas. The receptors for these two peptides are homologous (58% identity) and belong to the family of G-protein coupled receptors. GLP-1 and glucagon both play a major role in overall glucose homeostasis, GLP-1 lowers plasma glucose concentrations mediated by glucose dependent insulin secretion, whereas glucagon increases plasma glucose concentrations. Given the important roles of both GLP-1 and glucagon in maintaining normal blood glucose

60327730.100501

concentrations, there has been considerable interest in the identification of GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists. Clinical studies have demonstrated the ability of GLP-1 infusion to promote insulin secretion and normalize plasma glucose in diabetic subjects. However, GLP-1 is rapidly degraded and has a very short half-life in the body. Furthermore, GLP-1 causes gut motility side effects at or near its therapeutic doses. Therefore, GLP-1 itself has significant limitations as a therapeutic agent and modified versions of the peptide with enhanced stability are being pursued. No non-peptide agonists of the GLP-1 receptor have been described to date.

Peptide analogs of glucagon have been identified which act as glucagon antagonists and reduce hyperglycemia in diabetic rats. However, no peptide glucagon antagonist has moved beyond preclinical development. A number of structurally diverse non-peptide glucagon receptor antagonists have been reported in the scientific and patent literature. However, attempts to identify small molecule inhibitors of the glucagon receptor have met with limited success *in vivo*. The only antagonist of glucagon action known to be active in a clinical study is a compound identified as BAY 27-9955. A potential side effect of glucagon antagonism is hypoglycemia.

Because of the potential side effects associated with administering either a GLP-1 receptor agonist or a glucagon receptor antagonist, alone, a combination therapy would have the advantage of maintaining the desired lowering of blood glucose, while reducing the side effects. However, co-administration requires a single formulation and delivery approach yielding appropriate pharmacokinetic profiles for both peptides. This could be a major obstacle to the development of such a therapeutic.

Based on the foregoing, considerable potential exists for a single therapeutic peptide functioning as both a GLP-1 agonist and a glucagon antagonist *in vivo*.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides novel polypeptides that function both as an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor, and which are effective in the treatment of diseases and conditions that can be ameliorated by agents having both GLP-1 receptor agonist and glucagon receptor antagonist activity. The polypeptides of the present invention provide a new therapy for patients with, for example, metabolic disorders, such as those resulting from decreased endogenous insulin secretion, in particular type 2 diabetics, or for patients with impaired glucose tolerance, a prediabetic state that has a mild alteration in insulin secretion or impaired fasting glucose, or obesity.

In particular, one aspect of the invention is a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs 6-9, and fragments, derivatives and variants of the polypeptide that function as both an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor at substantially the same level as the polypeptides of the listed SEQ ID NOs:6-9 (collectively, "polypeptides of this invention").

Another embodiment of the invention is polynucleotides that encode for the polypeptides of this invention, and the attendant vectors and host cells necessary to recombinantly express the polypeptides of this invention. These polynucleotide sequences include that nucleotide sequence identified as SEQ ID NO 10.

The invention is also directed to a method of treating diabetes and/or other diseases or conditions affected by the polypeptides of this invention, in a mammal, comprising administering a therapeutically effective amount of any of the polypeptides of the present invention to said mammal.

Also disclosed are methods of making the polypeptides of this invention, both recombinant and synthetic.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

FIG 1 depicts amino acid sequences of polypeptides having SEQ ID NOs.6-9, which are claimed polypeptides.

FIG 2 depicts the polynucleotide sequence, SEQ ID NO 10, which encodes for a polypeptide of this invention

FIG 3 is a restriction map of a typical plasmid containing the GST-peptide fusion

5

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

This invention provides novel polypeptides, and fragments, derivatives and variants thereof that function as both an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor. The polypeptides of this invention function *in vivo* as both GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists, or otherwise, in the prevention and/or treatment of such diseases or conditions as diabetes, hyperglycemia, impaired glucose intolerance, impaired fasting glucose and obesity

A. Discussion.

GLP-1 and glucagon are members of a family of structurally related peptide hormones, the glucagon/secretin family. The stacking alignment below shows the primary structural relationships.

			SEQ ID NO.
20	GLP-1 (7-36)	1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH ₂	30 1
	GLP-1 (7-37)	1 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	31 2
	Glucagon	1 HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR	30 3

(where single-letter abbreviations for amino acids can be found in Zubay, Biochemistry 2d ed., 1988, MacMillan Publishing, New York, p. 33), and are defined below. These polypeptides play a role in overall glucose homeostasis, GLP-1 lowers plasma glucose concentrations, whereas glucagon increases plasma glucose concentrations

Given GLP-1's role in promoting glucose-regulated insulin secretion in the pancreas, GLP-1 receptor agonists are potentially valuable in the treatment of disease. Moreover, glucagon receptor antagonists should also prove valuable in

60327730-100501

treating disease given glucagon's role in elevating plasma glucose by stimulating hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. However, these facts alone do not guarantee glucose reduction *in vivo*.

The inventors herein have found new polypeptides that are both GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists. Without being bound to theory, the inventors herein believe that the polypeptides of this invention are capable of reducing glucose levels *in vivo* by stimulating insulin release from pancreatic beta cells in a glucose-dependent manner, while at the same time reducing glucagon-mediated secretion of glucose from the liver.

10

B. Definitions.

Certain terms used throughout this specification will now be defined, and others will be defined as introduced. The single letter abbreviation for a particular amino acid, its corresponding amino acid, and three letter abbreviation are as follows: A, alanine (ala), C, cysteine (cys), D, aspartic acid (asp); E, glutamic acid (glu), F, phenylalanine (phe), G, glycine (gly); H, histidine (his), I, isoleucine (ile), K, lysine (lys), L, leucine (leu), M, methionine (met), N, asparagine (asn), P, proline (pro), Q, glutamine (gln), R, arginine (arg), S, serine (ser), T, threonine (thr), V, valine (val), W, tryptophan (trp), Y, tyrosine (tyr).

The term "polynucleotide encoding a polypeptide" encompasses a polynucleotide, which includes only coding sequence for the polypeptide as well as a polynucleotide, which includes additional coding, and/or non-coding sequence. The present invention further relates to polynucleotides which hybridize to the hereinabove-described sequences if there is at least about 70%, preferably at least about 80%, and more preferably at least about 95% identity between the sequences. The present invention particularly relates to polynucleotides encoding polypeptides, which hybridize under stringent conditions to the hereinabove-described polynucleotides. As herein used, the term "stringent conditions" means "stringent hybridization conditions". Preferably, hybridization will occur only if there is at least about 90% and

preferably about 95% through 97% identity between the sequences. The polynucleotides, which hybridize to the hereinabove described polynucleotides in a preferred embodiment, encode polypeptides, which retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by the cDNAs.

"Stringent hybridization conditions" refers to an overnight incubation of the two pieces of polynucleotides to be hybridized at 42° C in a solution comprising 50% formamide, 5x SSC (750 mM NaCl, 75 mM sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 µg/ml denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65°C.

C. Polypeptides of the Invention.

The polypeptides of this invention function both as a GLP-1 receptor agonist and a glucagon receptor antagonist. The GLP-1 receptor agonist component of the polypeptides of this invention demonstrates full activation of the GLP-1 receptor. "Full activation" of the GLP-1 receptor is defined herein as the ability of the polypeptides of this invention to induce a maximum activity that is at least 70%, more preferably at least 80%, still more preferably at least 90% of the maximal activity induced by the native GLP-1(7-36)-amide with a relative potency of at least 5%, more preferably at least 10%, still more preferably at least about 20%. "Relative potency" is defined herein as the EC50 of native GLP1(7-36)-amide divided by the EC50 of the polypeptide of this invention, and multiplied by 100. "EC50" is defined herein as the concentration of a polypeptide of this invention at which 50% of the maximal activity is achieved. Such activity can be measured in a cyclic AMP ("cAMP") Scintillation Proximity Assay ("SPA"), such as that which is described in Example 10.

More preferably, the GLP-1 receptor agonist component of the polypeptides of this invention will also induce insulin secretion from pancreatic β-cells. Such activity can be measured in any assay that detects insulin release.

25

known to one skilled in the art, such as, for example, the assay described in Example 13.

Still more preferably, the GLP-1 receptor agonist component of the polypeptides of this invention will also elevate plasma insulin levels and reduce plasma glucose levels *in vivo*. The measurement of plasma insulin can be measured in any *in vivo* assay known to one skilled in the art, such as, for example, the intravenous glucose tolerance test described in Example 15. The measurement of plasma glucose levels can be measured in any *in vivo* assay known to one skilled in the art, such as, for example, an intraperitoneal glucose tolerance test.

In addition, the polypeptides of this invention demonstrate glucagon receptor antagonist activity. Preferably, the glucagon receptor antagonist component of the polypeptides of this invention inhibit glucagon activity by at least 15%, more preferably by at least 20%, still more preferably by at least 25%, and even more preferably by at least 30%, when tested in a cyclic AMP (cAMP) SPA assay, such as the assay described in Example 11.

More preferably, the glucagon receptor antagonist component of the polypeptides of this invention will also inhibit glucagon when tested in any assay known to one skilled in the art that measures glucose release *in vitro*, such as the assay involving rat hepatocytes described in Example 12.

Still more preferably, the glucagon receptor antagonist component of the polypeptides of this invention will also inhibit glucagon activity in any assay known to one skilled in the art that measures glucagon stimulated glucose production *in vivo*, such as the assay described in Example 14.

The most preferable polypeptides of this invention are selected from the group consisting of SEQ ID NOs 6-9, and fragments, derivatives, variants thereof that function as both an agonist of the GLP-1 receptor and an antagonist of the glucagon receptor at substantially the same level as the polypeptides of the listed SEQ ID NOs 6-9.

The terms "fragment," "derivative", and "variant", when referring to the polypeptides of this invention, mean fragments, derivatives, and variants of the

6032730.100501

polypeptides which retain substantially the same biological function or activity as such polypeptides, as described further below

"Functional equivalent" and "substantially the same biological function or activity" each means that degree of biological activity that is within about 30% to 100% or more of that biological activity demonstrated by the polypeptide to which it is being compared when the biological activity of each polypeptide is determined by the same procedure. For example, a polypeptide that is functionally equivalent to a polypeptide of Fig. 1 is one that demonstrates GLP-1 receptor agonist activity when tested in the assays of Examples 10, 13 or 15 and glucagon receptor antagonist activity when tested in the assays of Examples 11, 12 or 14.

An analog includes a propeptide, which includes within it, the amino acid sequence of the polypeptides of this invention. The active polypeptides of this invention can be cleaved from the additional amino acids that complete the propeptide molecule by natural, *in vivo* processes or by procedures well known in the art such as by enzymatic or chemical cleavage.

A fragment is a portion of the polypeptide, which retains substantially similar functional activity, as shown in the *in vitro* and *in vivo* models disclosed herein as described further below.

A derivative includes all modifications to the polypeptide which substantially preserve the functions disclosed herein and include additional structure and attendant function, e.g., PEGylated polypeptides which have greater half-life, fatty acid derivatized polypeptides which can then interact with endogenous human serum albumin to improve plasma half-life, fusion polypeptides which confer targeting specificity or an additional activity, as described further below.

The polypeptides of the present invention may be naturally-occurring polypeptides, recombinant polypeptides or synthetic polypeptides.

The fragment, derivative, or variant of the polypeptides of the present invention may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a

conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code, or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group, or (iii) one in which the mature polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (for example, polyethyleneglycol), or (iv) one in which the additional amino acids are fused to the mature polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature polypeptide or a propeptide sequence, or v) one in which the polypeptide sequence is fused with a larger polypeptide, i.e. human serum albumin, antibody or Fc, for increased duration of effect. Such fragments, derivatives, and variants and analogs are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein

Preferably, the derivatives of the present invention will contain conservative amino acid substitutions (defined further below) made at one or more predicted, preferably nonessential amino acid residues. A "nonessential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of a protein without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Non conservative substitutions would not be made for conserved amino acid residues or for amino acid residues residing within a conserved protein domain

Fragments, or biologically active portions of the polypeptides of this invention include polypeptide fragments suitable for use as a medicament, to generate antibodies, as a research reagent, and the like. Fragments include peptides comprising amino acid sequences sufficiently similar to or derived from the amino acid sequences of a polypeptide of this invention and exhibiting at least one activity of the polypeptide, but which include fewer amino acids than the full-length polypeptides disclosed herein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the polypeptide. A biologically active portion of a polypeptide can be a peptide, which is, for example, 15 or more amino acids in length. Such biologically active portions can be prepared synthetically or by recombinant techniques and can be evaluated for GLP-1 receptor agonist activity and glucagon receptor antagonist by means disclosed herein and/or as is well known in the art.

Moreover, preferred derivatives of the present invention include mature polypeptides that have been fused with other polypeptides, such as for example human serum albumin, to improve the pharmacokinetic profile of the polypeptides of this invention. Fusion of polypeptide to human serum albumin can be accomplished by any means known to one skilled in the art. For example, the DNA sequence of human serum albumin can be cloned into any mammalian expression vector known to one skilled in the art, along with the DNA sequence of the polypeptides of this invention. Cloning the polypeptides of this invention N-terminal to the human serum albumin is preferred because it appears as if a free N-terminal histidine is required for GLP-1 receptor activity (Kawai K., Endocrinology 1989 Apr;124(49):1768-73). The recombinant polypeptide-albumin fusion can then be expressed by transforming a suitable cell line, such as HKB or CHO, with the vector and expressing the fusion protein.

Variants of the polypeptides of this invention include polypeptides having an amino acid sequence sufficiently similar to the amino acid sequence of the SEQ ID NOs 6-9 of Fig. 1 or a domain thereof. The term "sufficiently similar" means a first amino acid sequence that contains a sufficient or minimum number of identical or equivalent amino acid residues relative to a second amino acid

60327730.100501

sequence such that the first and second amino acid sequences have a common structural domain and/or common functional activity. For example, amino acid sequences that contain a common structural domain that is at least about 85%, preferably about 90% through 98%, identical are defined herein as sufficiently similar. Preferably, variants will be sufficiently similar to the amino acid sequence of the preferred polypeptides of this invention. Variants include variants of polypeptides encoded by a polynucleotide that hybridizes to a polynucleotide of this invention or a complement thereof under stringent conditions. Such variants generally retain the functional activity of the polypeptides of this invention. Libraries of fragments of the polynucleotides can be used to generate a variegated population of fragments for screening and subsequent selection. For example, a library of fragments can be generated by treating a double-stranded PCR fragment of a polynucleotide with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double-stranded DNA, renaturing the DNA to form double-stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single-stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, one can derive an expression library that encodes N-terminal and internal fragments of various sizes of the polypeptide of this invention.

Variants include polypeptides that differ in amino acid sequence due to mutagenesis. Variants that function as both GLP-1 receptor agonists and glucagon receptor antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, for example truncation mutants, of the polypeptides of this invention for GLP-1 receptor agonist activity and glucagon receptor antagonist activity.

In one embodiment, a variegated library of analogs is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene

sequences such that a degenerate set of potential variant amino acid sequences is expressible as individual polypeptides, or, alternatively, as a set of larger fusion proteins (for example, for phage display) containing the set of sequences therein. There are a variety of methods that can be used to produce libraries of potential variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential variant sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (see, e.g., Narang (1983) *Tetrahedron* 39 3, Itakura et al (1984) *Annu Rev Biochem* 53 323, Itakura et al (1984) *Science* 198 1056, Ike et al (1983) *Nucleic Acid Res.* 11 477).

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of the polypeptides of this invention. The most widely used techniques, which are amenable to high through-put analysis for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a technique that enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify the desired variants.

The invention also provides hybrid or fusion polypeptides. The polypeptides of this invention can be composed of amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres, and may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. The

polypeptides may be modified by either natural process, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques, which are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature

5 Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be

10 branched, for example, as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched, and branched cyclic polypeptides may result from posttranslation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety,

15 covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor

20 formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination. (See, for instance, Proteins, Structure and Molecular Properties, 2nd ed, T E Creighton, W H Freeman and

25 Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B C Johnson, ed, Academic Press, New York, pgs 1-12 (1983), Seifter et al, Meth. Enzymol 182 626-646 (1990), Rattan et al, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663 48-62 (1992))

30 The polypeptides of the present invention include the polypeptides of Fig 1, that are SEQ ID NOs 8-9, as well as those sequences having insubstantial variations in sequence from them. An "insubstantial variation" would include any

sequence, substitution, or deletion variant that maintains substantially the same GLP-1 receptor agonist activity and glucagon receptor antagonist activity as the polypeptides of Fig 1. These functional equivalents may preferably include polypeptides which have at least about a 90% identity to the polypeptides of Fig 1, and more preferably at least a 95% identity to the polypeptides of Fig 1, and still more preferably at least a 97% identity to the polypeptides of Fig 1, and also include portions of such polypeptides having substantially the same biological activity. However, any polypeptide having insubstantial variation in amino acid sequence from the polypeptides of Fig 1 that demonstrates functional equivalency as described further herein is included in the description of the present invention.

As known in the art "similarity" between two polypeptides is determined by comparing the amino acid sequence and its conserved amino acid substitutes of one polypeptide to the sequence of a second polypeptide. Such conservative substitutions include those described above and by Dayhoff in The Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978), and by Argos in EMBO J. 8 779-785 (1989). For example, amino acids belonging to one of the following groups represent conservative changes:

- ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;
- cys, ser, tyr, thr;
- val, ile, leu, met, ala, phe,
- lys, arg, his,
- phe, tyr, trp, his, and
- asp, glu

D Polynucleotides of this Invention and Methods of Producing the Polypeptides of this Invention.

The present invention also relates to polynucleotides that encode for the polypeptides of this invention, as well as the attendant vectors and host cells necessary to recombinantly express the polypeptides of this invention. These

polynucleotide sequences include that nucleotide sequence which is identified as SEQ ID NO. 10

Host cells may be genetically engineered (transduced or transformed or transfected) with the vectors of this invention, which may be, for example, a cloning vector or an expression vector. The vector may be, for example, in the form of a plasmid, a viral particle, a phage, etc. The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for activating promoters, or selecting transformants. The culture conditions, such as temperature, pH and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan. The polynucleotide of the present invention may be employed for producing a polypeptide by recombinant techniques. Thus, for example, the polynucleotide sequence may be included in any one of a variety of expression vehicles, in particular vectors or plasmids for expressing a polypeptide. Such vectors include chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences, e.g., derivatives of SV40, bacterial plasmids, phage DNA, yeast plasmids, vectors derived from combinations of plasmids and phage DNA, viral DNA such as vaccinia, adenovirus, fowl pox virus, and pseudorabies. However, any other vector or plasmid may be used as long as they are replicable and viable in the host.

The appropriate DNA sequence may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, the DNA sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site by procedures known in the art. Such procedures and others are deemed to be within the scope of those skilled in the art. The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to an appropriate expression control sequence(s) (promoter) to direct mRNA synthesis. As representative examples of such promoters, there may be mentioned LTR or SV40 promoter, the E. coli lac or trp, the phage lambda P_L promoter and other promoters known to control expression of genes in prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses. The expression vector also contains a ribosome binding site for translation initiation and a transcription

terminator. The vector may also include appropriate sequences for amplifying expression. In addition, the expression vectors preferably contain a gene to provide a phenotypic trait for selection of transformed host cells such as dihydrofolate reductase or neomycin resistance for eukaryotic cell culture, or such as tetracycline or ampicillin resistance in E. coli. The vector containing the appropriate DNA sequence as herein above described, as well as an appropriate promoter or control sequence, may be employed to transform an appropriate host to permit the host to express the protein. As representative examples of appropriate hosts, there may be mentioned bacterial cells, such as E. coli, Salmonella typhimurium, Streptomyces, fungal cells, such as yeast, insect cells, such as Drosophila S2 and Spodoptera Sf9, animal cells such as CHO, COS or Bowes melanoma, adenoviruses, plant cells, etc. The selection of an appropriate host is deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

The present invention also includes recombinant constructs comprising one or more of the sequences as broadly described above. The constructs comprise a vector, such as a plasmid or viral vector, into which a sequence of the invention has been inserted, in a forward or reverse orientation. In a preferred aspect of this embodiment, the construct further comprises regulatory sequences, including, for example, a promoter, operably linked to the sequence. Large numbers of suitable vectors and promoters are known to those of skill in the art, and are commercially available. The following vectors are provided by way of example: Bacterial pQE70, pQE80, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBSKS, pNH8a, pNH18a, pNH18a, pNH48a (Stratagene); pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, PRIT5 (Pharmacia); Eukaryotic pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia). However, any other plasmid or vector may be used as long as they are replicable and viable in the host. Promoter regions can be selected from any desired gene using CAT(chloramphenicol transferase) vectors or other vectors with selectable markers. Two appropriate vectors are pKK232-8 and pCM7. Particular named bacterial promoters include lacI, lacZ, T3, T7,

gpt, lambda P_R, P_L and trp Eukaryotic promoters include CMV Immediate early, HSV thymidine kinase, early and late SV40, LTRs from retrovirus, and mouse metallothionein-I Selection of the appropriate vector and promoter is well within the level of ordinary skill in the art.

5 The present invention also relates to host cells containing the above-described construct. The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell, or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran mediated transfection, or electroporation (Davis, L., Digner, M., Battey, 10 J., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)) The constructs in host cells can be used in a conventional manner to produce the gene product encoded by the recombinant sequence. Alternatively, the polypeptides of the invention can be synthetically produced by conventional peptide synthesizers.

15 Mature proteins can be expressed in mammalian cells, yeast, bacteria, or other cells under the control of appropriate promoters. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention. Appropriate cloning and expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, 20 (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

Transcription of a DNA encoding the polypeptides of the present invention by higher eukaryotes is increased by inserting an enhancer sequence 25 into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually from about 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100 to 270), a cytomegalovirus early promoter enhancer, a polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. Generally, 30 recombinant expression vectors will include origins of replication and selectable markers permitting transformation of the host cell, e.g., the ampicillin resistance

gene of *E. coli* and *S. cerevisiae* TRP1 gene, and a promoter derived from a highly expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence. Such promoters can be derived from operons encoding glycolytic enzymes such as 3-phosphoglycerate kinase (PGK), α factor, acid phosphatase, or heat shock proteins, among others. The heterologous structural sequence is assembled in appropriate phase with translation, initiation and termination sequences, and preferably, a leader sequence capable of directing secretion of translated protein into the periplasmic space or extracellular medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, e.g., stabilization or simplified purification of expressed recombinant product.

Useful expression vectors for bacterial use are constructed by inserting a structural DNA sequence encoding a desired protein together with suitable translation, initiation and termination signals in operable reading phase with a functional promoter. The vector will comprise one or more phenotypic selectable markers and an origin of replication to ensure maintenance of the vector and to, if desirable, provide amplification within the host. Suitable prokaryotic hosts for transformation include *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* and various species within the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*, although others may also be employed as a matter of choice. Useful expression vectors for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from commercially available plasmids comprising genetic elements of the well known cloning vector pBR322 (ATCC 37017). Such commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis., USA). These pBR322 "backbone" sections are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed.

After transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, the selected promoter is derepressed by appropriate means (e.g., temperature shift or chemical induction) and cells are cultured for an additional period. Cells are typically harvested by centrifugation, 5 disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification. Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

Various mammalian cell culture systems can also be employed to 10 express recombinant protein. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblasts, described by Gluzman, Cell 23 175 (1981), and other cell lines capable of expressing a compatible vector, for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa and HBK cell lines. Mammalian expression vectors will comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation site, 15 splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5' flanking nontranscribed sequences. DNA sequences derived from the SV40 viral genome, for example, SV40 origin, early promoter, enhancer, splice, and polyadenylation sites may be used to provide the required non-transcribed genetic elements. 20

The polypeptides of the present invention may be recovered and purified from recombinant cell cultures by methods used heretofore, including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic 25 interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxyapatite chromatography and lectin chromatography. Protein refolding steps can be used, as necessary, in completing configuration of the mature protein. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) can be employed for final purification steps.

30 The polypeptides of this invention may be a product of chemical synthetic-procedures, or produced by recombinant techniques from a

prokaryotic or eukaryotic host (for example, by bacterial, yeast, higher plant, insect and mammalian cells in culture). Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides of this invention may be glycosylated with mammalian or other eukaryotic carbohydrates or may be non-glycosylated. Polypeptides of this invention may also include an initial methionine amino acid residue. An isolated or purified polypeptide of this invention, or biologically active portion thereof, is substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. Preferably, an isolated polypeptide of this invention is substantially free of cellular material and has less than about 30% (by dry weight) of non-polypeptide, or contaminating, material. When the polypeptide of this invention or a biologically active portion thereof is recombinantly produced, preferably culture medium represents less than about 30% of the volume of the polypeptide preparation. When this invention is produced by chemical synthesis, preferably the preparations contain less than about 30% by dry weight of chemical precursors or non-invention chemicals.

The polypeptides of this invention can be conveniently isolated as described in the specific examples below. A preparation of purified polypeptide is at least about 70% pure, preferably, the preparations are 85% through 99% pure. Purity of the preparations can be assessed by any means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Mass Spec/Liquid Chromatography.

Polynucleotide sequences encoding a polypeptide of this invention can be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see, for example, Caruthers *et al*, *Nucl Acids Res. Symp Ser* 215 - 223, 1980, Horn *et al*, *Nucl Acids Res. Symp Ser* 225-232, 1980). The polynucleotide that encodes the polypeptide can then be cloned into an expression vector to express the polypeptide.

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce the polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-

naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of polypeptide expression or to produce an RNA transcript having desirable properties, such as a half-life, which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

The nucleotide sequences disclosed herein can be engineered using methods generally known in the art to alter the polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the polypeptide or mRNA product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, introduce mutations, and so forth.

Alternatively, the polypeptides of this invention can be produced using chemical methods to synthesize its amino acid sequence, such as by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (see, for example, Merrifield, *J Am Chem Soc.* 85, 2149 - 2154, 1963, Roberge *et al*, *Science*, 269, 202 - 204, 1995). Polypeptide synthesis can be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis can be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Optionally, fragments of the polypeptide can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule.

The newly synthesized polypeptide can be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (see, for example, Creighton, *PROTEINS STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The composition of a synthetic polypeptide of the present invention can be confirmed by amino acid analysis or sequencing by, for example, the Edman degradation procedure (see, Creighton, *supra*). Additionally, any portion of the amino acid sequence of the polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods.

with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a fusion polypeptide

E. Pharmaceutical Applications of the Polypeptides of this Invention.

5 The polypeptides of the present invention, as a result of the ability to decrease blood glucose *in vivo*, may be employed in treatment of type 2 Diabetes (non-insulin dependent diabetes mellitus) Also, the polypeptides may be used to prevent subjects with impaired glucose tolerance from proceeding to develop type 2 diabetes and subjects with impaired fasting glucose, as well as hyperglycemia and obesity

10 The polypeptides of the present invention may be employed in combination with a suitable pharmaceutical carrier to comprise a pharmaceutical composition for parenteral administration Such compositions comprise a therapeutically effective amount of the polypeptide and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Such a carrier includes but is not limited to saline buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol, and combinations thereof The formulation should suit the mode of administration

15 The polypeptides of the present invention may also be employed in combination with other pharmaceutical agents useful in the treatment of diabetes, impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, hyperglycemia and obesity, such as for example, insulin secretagogues, insulin sensitizers and metformin HCl

20 The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration In addition, the polypeptides of the present invention may be employed in conjunction with other therapeutic compounds

5032730,100501

The pharmaceutical compositions may be administered in a convenient manner such as by the oral, topical, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal or intradermal routes. The pharmaceutical compositions are administered in an amount, which is effective for treating and/or prophylaxis of the specific indication. In general, they are administered in an amount of at least about 3.5 ng/kg body weight and in most cases they will be administered in an amount not in excess of about 100 mg/kg body weight per day. In most cases, the dosage is from about 0.1 µg/kg to about 35 µg/kg body weight daily, taking into account the routes of administration, symptoms, etc. These numbers do not take into account the bioavailability of the peptide *in vivo*, in which case more or less may be used to attain the effective dose desired. One of ordinary skill in the art is able to determine through dosing experiments or other conventional means the gross amount to be used to produce an effective dosage.

A polypeptide of the invention may also be employed in accordance with the present invention by expression of such polypeptide *in vivo*, which is often referred to as "gene therapy." Thus, for example, cells may be engineered with a polynucleotide (DNA or RNA) encoding for the polypeptide *ex vivo*, the engineered cells are then provided to a patient to be treated with the polypeptide. Such methods are well known in the art. For example, cells may be engineered by procedures known in the art by use of a retroviral particle containing RNA encoding for the polypeptide of the present invention.

Local delivery of the insulin secretagogues using gene therapy may provide the therapeutic agent to the target area, i.e., the pancreas. For instance a pancreas-specific promoter was used to create a beta-cell pancreatic tumor mouse model (Hanahan, D., Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes, Nature 315(6015) 115-22 (1985)).

Both *in vitro* and *in vivo* gene therapy methodologies are contemplated. Several methods for transferring potentially therapeutic genes to defined cell

populations are known See, e.g., Mulligan, "The Basic Science Of Gene Therapy", Science, 260 926-31 (1993). These methods include

1) Direct gene transfer See, e.g., Wolff et al., "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In Vivo", Science, 247 1485-88 (1990),

2) Liposome-mediated DNA transfer See, e.g., Caplen et al., "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The Nasal Epithellum Of Patients With Cystic Fibrosis", Nature Med. 3 39-46 (1995), Crystal, "The Gene As A Drug", Nature Med. 1 15-17 (1995); Gao and Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", Biochem. Biophys. Res. Comm., 179 280-85 (1991),

3) Retrovirus-mediated DNA transfer See, e.g., Kay et al., "In Vivo Gene Therapy Of Hemophilia B Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", Science, 262 117-19 (1993), Anderson, "Human Gene Therapy", Science, 256.808-13 (1992)

4) DNA Virus-mediated DNA transfer Such DNA viruses include adenoviruses (preferably Ad-2 or Ad-5 based vectors), herpes viruses (preferably herpes simplex virus based vectors), and parvoviruses (preferably "defective" or non-autonomous parvovirus based vectors, more preferably adeno-associated virus based vectors, most preferably AAV-2 based vectors) See, e.g., All et al., "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", Gene Therapy, 1 367-84 (1994); United States Patent 4,797,368, incorporated herein by reference, and United States Patent 5,139,941, incorporated herein by reference

The choice of a particular vector system for transferring the gene of interest will depend on a variety of factors. One important factor is the nature of the target cell population Although retroviral vectors have been extensively studied and used in a number of gene therapy applications, these vectors are generally unsuited for infecting non-dividing cells In addition, retroviruses have the potential for oncogenicity However, recent developments in the field of lentiviral vectors may circumvent some of these limitations See Naldini et al, In

vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector, Science 272 263-7 (1996)

Retroviruses from which the retroviral plasmid vectors hereinabove mentioned may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma Virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, adenovirus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus. In one embodiment, the retroviral plasmid vector is derived from Moloney Murine Leukemia Virus

Adenoviruses have the advantage that they have a broad host range, can infect quiescent or terminally differentiated cells, such as neurons or hepatocytes, and appear essentially non-oncogenic. See, e.g., All et al., supra, p. 367. Adenoviruses do not appear to integrate into the host genome. Because they exist extrachromosomally, the risk of insertional mutagenesis is greatly reduced. All et al., supra, p. 373

Adeno-associated viruses exhibit similar advantages as adenoviral-based vectors. However, AAVs exhibit site-specific integration on human chromosome 19 (All et al., supra, p. 377)

In a preferred embodiment, the DNA encoding the polypeptide insulin secretagogues of this invention is used in gene therapy for disorders such as diabetes.

According to this embodiment, gene therapy with DNA encoding polypeptide insulin secretagogues or mutants of this invention is provided to a patient in need thereof, concurrent with, or immediately after diagnosis

The skilled artisan will appreciate that any suitable gene therapy vector containing polypeptide insulin secretagogues, DNA or DNA of fragment, derivative or variant of polypeptide insulin secretagogues may be used in accordance with this embodiment. The techniques for constructing such a vector are known. See, e.g., Anderson, W. F., "Human Gene Therapy," *Nature*, 392 25-30 (1998), Verma, I. M., and Somia, N., "Gene Therapy - Promises, Problems, and Prospects," *Nature*, 389 239-242 (1998). Introduction of the

polypeptide insulin secretagogues DNA-containing vector to the target site may be accomplished using known techniques

The vector includes one or more promoters. Suitable promoters which may be employed include, but are not limited to, the retroviral LTR, the SV40 promoter; and the human cytomegalovirus (CMV) promoter described in Miller, et al., *Biotechniques*, 7(9): 980-990 (1989), or any other promoter (e.g., cellular promoters such as eukaryotic cellular promoters including, but not limited to, the histone, pol III, and β -actin promoters). Other viral promoters that may be employed include, but are not limited to, adenovirus promoters, thymidine kinase (TK) promoters, and B19 parvovirus promoters. The selection of a suitable promoter will be apparent to those skilled in the art from the teachings contained herein

The nucleic acid sequence encoding the polypeptide of the present invention is under the control of a suitable promoter. Suitable promoters which may be employed include, but are not limited to, adenoviral promoters, such as the adenoviral major late promoter; or heterologous promoters, such as the cytomegalovirus (CMV) promoter; the respiratory syncytial virus (RSV) promoter; inducible promoters, such as the MMT promoter, the metallothionein promoter; heat shock promoters, the albumin promoter; the ApoA1 promoter; human globin promoters, viral thymidine kinase promoters, such as the Herpes Simplex thymidine kinase promoter; retroviral LTRs (including the modified retroviral LTRs hereinabove described), the β -actin promoter; and human growth hormone promoters. The promoter also may be the native promoter, which controls the gene encoding the polypeptide

The retroviral plasmid vector is employed to transduce packaging cell lines to form producer cell lines. Examples of packaging cells which may be transfected include, but are not limited to, the PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12, and DAN cell lines as described in Miller *Human Gene Therapy*, 1: 5-14 (1990), which is incorporated herein by reference in its entirety. The vector may transduce the

115

packaging cells through any means known in the art. Such means include, but are not limited to, electroporation, the use of liposomes, and CaPO_4 precipitation. In one alternative, the retroviral plasmid vector may be encapsulated into a liposome, or coupled to a lipid, and then administered to a host. The producer cell line generates infectious retroviral vector particles which include the nucleic acid sequence(s) encoding the polypeptides. Such retroviral vector particles then may be employed, to transduce eukaryotic cells, either in vitro or in vivo. The transduced eukaryotic cells will express the nucleic acid sequence(s) encoding the polypeptide. Eukaryotic cells which may be transduced include, but are not limited to, embryonic stem cells, embryonic carcinoma cells, as well as hematopoietic stem cells, hepatocytes, fibroblasts, myoblasts, keratinocytes, endothelial cells, and bronchial epithelial cells.

A different approach to gene therapy is "transkaryotic therapy" wherein the patient's cells are treated ex vivo to induce the dormant chromosomal genes to produce the protein of interest after reintroduction to the patient. Transkaryotic therapy assumes the individual has a normal complement of genes necessary for activation. Transkaryotic therapy involves introducing a promoter or other exogenous regulatory sequence capable of activating the nascent genes, into the chromosomal DNA of the patients' cells ex vivo, culturing and selecting for active protein-producing cells, and then reintroducing the activated cells into the patient with the intent that they then become fully established. The "gene activated" cells then manufacture the protein of interest for some significant amount of time, perhaps for as long as the life of the patient. U.S. Patent Nos. 5,841,670 and 5,733,761 disclose in detail this concept, and are hereby incorporated by reference in their entirety.

In order that this invention may be better understood, the following examples are set forth. These examples are for the purpose of illustration only, and are not to be construed as limiting the scope of the invention in any manner. All publications mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

SPECIFIC EMBODIMENTS

Example 1 Peptide Synthesis Methodology.

The following general procedure was followed to synthesize some of the polypeptides of the invention. Peptide synthesis was carried out by the FMOC/t-Butyl strategy (Peptide Synthesis Protocols (1994), Volume 35 by Michael W Pennington & Ben M Dunn) under continuous flow conditions using Rapp-Polymere PEG-Polystyrene resins (Rapp-Polymere, Tübingen, Germany). At the completion of synthesis, peptides were cleaved from the resin and de-protected using TFA/DTT/H₂O/Trisopropyl silane (88/5/5/2). Peptides were precipitated from the cleavage cocktail using cold diethyl ether. The precipitate was washed three times with the cold ether and then dissolved in 5% acetic acid prior to lyophilization. Peptide identity was confirmed by reversed-phase chromatography on a YMC-Pack ODS-AQ column (YMC, Inc., Wilmington, NC) on a Waters ALLIANCE® system (Waters Corporation, Milford, MA) using water/acetonitrile with 3% TFA as a gradient from 0% to 100% acetonitrile, and by MALDI mass spectrometry on a VOYAGER DE™ MALDI Mass Spectrometer, (model 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Matrix buffer (50/50 dH₂O/acetonitrile with 3% TFA) peptide sample was added to Matrix buffer 1/1. Those peptides not meeting the purity criteria of >95% were purified by reversed-phase chromatography on a Waters Delta Prep 4000 HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA).

Example 2 Peptide Cloning

To establish a robust method for expressing the polypeptides of this invention, and their mutants, their genetic codes were cloned C-terminal to GST with a single Factor Xa recognition site separating the monomeric peptide and GST. The gene encoding Factor Xa recognition site fused to DNA sequence of the peptide to be produced has been synthesized by hybridizing two overlapping single-stranded DNA fragments (70-90mers) containing a Bam HI or Eco RI restriction enzyme site immediately 5' to the DNA sequence of the

gene to be cloned, followed by DNA synthesis of the opposite strands via the large fragment of DNA polymerase I (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). The DNA sequence chosen for each gene was based on the reverse translation of the designed amino acid sequence of each peptide. In some cases, the gene encoding the peptide is generated by PCR mutagenesis (Picard, V, et al, Nucleic Acids Res 22 2587-91 (1994), Sambrook, J, Fritsch, E F, & Maniatis, T (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) of a gene already made by the method described above. The double-stranded product is then digested by Bam HI and EcoRI and ligated into pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech) which has also been cleaved by Bam HI and EcoRI.

For example, when the DNA sequence the polypeptide identified as SEQ ID NO-7 was cloned into pGEX-6P-1, the following polypeptide sequence was expressed as fusions with glutathione S-transferase (GST): IEGRHSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIWLVKGRG, where the first 4 amino acids, IEGR, is the factor Xa recognition site and the remaining 31 amino acids is the amino acid sequence identified as SEQ ID NO 7.

The first and last six nucleotides of the nucleic acid sequence encoding the polypeptide identified as SEQ ID NO 7 (i.e., SEQ ID NO 10, figure 2) represent the restriction enzyme sites (Bam HI and Eco RI) used for cloning into the pGEX6P-1 plasmid (figure 3). The "TAATGA" sequence immediately preceding the Eco RI site ("GAATTC") encodes two stop codons. The rest of the DNA sequence encodes the Factor Xa-polypeptide identified as SEQ ID NO 7 fusion sequence.

Example 3 Peptide Recombinant Expression and Purification

BL21 (DE3) cells (Stratagene) transformed with the GST-peptide fusion containing plasmids were grown at 37°C until OD₆₀₀ reached 0.6 to 1.0 and induced by 1 mM IPTG (Life Technologies) for 2 hours at 37°C. 2L of cells were spun at 7,700 g for 15 minutes, and stored at -20°C. The cell pellet was

resuspended in 80ml B-PER bacterial protein extraction reagent (Cat No 78248, PIERCE) and 1x Complete Protease Inhibitor (Roche) until the cell suspension was homogenous. The homogenous mixture was gently shaken at room temperature for 10 minutes. Lysozyme and Dnase I were added to a final concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ to further solubilize proteins and to reduce viscosity, respectively. The mixture was incubated for an additional 5 minutes. Cellular debris was spun down at 27,000 g for 20 minutes. The supernatant was mixed with 2 mL of pre-washed Glutathione Sepharose 4B resin (Pharmacia) on a shaker overnight at 4 °C. The resin was spun down at 1,500 g for 15 minutes, packed into empty Poly-Prep Chromatography Columns (Bio-Rad), washed with 30 mL PBS followed by 10mL of Factor Xa buffer (1 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). The peptides were cleaved off the column with 60 units of Factor Xa (Pharmacia) in 1 mL of Factor Xa buffer, overnight at 4 °C. These eluants were then run on a C18 HPLC (Beckman System Gold), using a 2 mL loop and flow rate of 1 mL/min with the following program: 5 minutes of Buffer A (0.1% TFA/ H_2O), 30 minutes of gradient to 100% Buffer B (0.1% TFA/ACN), 10 minutes of Buffer A, 10 minutes of gradient, and 10 minutes of Buffer A. Peak fractions (0.5 mL each) were collected and screened by 10-20% Tricine-SDS gel electrophoresis. The identity of each peptide was confirmed by mass spectrometry using the mass predicted from the amino acid sequence. Typical yields are approximately 50 μg free peptides per liter of E. coli culture. Recombinant peptides have been shown to have the same activities as their synthetic versions.

The following table, Table 2, contains some selected polypeptides made according to the Peptide Synthesis protocol discussed above (Example 1), or recombinantly as described in Example 3.

Table 2

Peptide	Peptide Sequence	SEQ ID No
Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNT	3
GLP-1(7-36)amide	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2	1
GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	2
G1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLKGR-NH2	4
G5	HSQGTFTSDYSKYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2	5
G27	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2	6
G51	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG	7
G66	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2	8
G68	HSQGTFTSDYAAKLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2	9

Example 4. Preparation of RINm5F Cell Membranes

Flasks of RINm5F cells were washed with PBS, scraped in 20 mM Hepes-1 mM EDTA-250 mM sucrose buffer containing protease inhibitors (HES) and homogenized in a dounce homogenizer followed by repeated resuspension through a 23 gauge needle. Unbroken cells and nuclei were removed by centrifugation at 500xg for 5 minutes. The pellet was resuspended in HES buffer using a 23 gauge needle and centrifugation repeated. The supernatants from the two spins were combined and centrifuged at 40,000xg for 20 min. The resulting plasma membrane pellet was resuspended in HES buffer using a 23 gauge needle followed by a 25 gauge needle. Membranes were stored at -80°C until use.

Example 5 Preparation of plasma membranes from rat liver

Rats were sacrificed and livers removed into ice cold TES buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 255mM sucrose containing protease inhibitors). The wet weight of the livers was determined and the tissue minced in 5 volumes of ice cold TES buffer and a slurry prepared using a polytron. All buffers and spins were kept at 4°C. The slurry was further homogenized using three strokes of a

handheld dounce homogenizer. The homogenate was passed through several layers of cheesecloth and spun at 25,000xg for 10 minutes. Pellets were homogenized in 22.1 ml TES buffer using 10 strokes of a handheld dounce homogenizer. 27.9 ml of 2.4M sucrose in TE was added and mixed well. The homogenate was distributed among several tubes and each tube was overlaid with 7 ml of TES buffer. The tubes were spun at 120,000xg for 60 minutes. The plasma membranes were removed from the interface that formed during the spin, diluted in TES and concentrated using a 15 minute spin at 200,000xg. The resulting pellet was again homogenized in 9.8 ml TES buffer, combined with 10.3 ml 2.4M sucrose, overlaid with 7 ml TES and centrifuged at 180,000xg for 30 min. The plasma membranes were removed from the interface, diluted with TES buffer and collected by centrifugation at 200,000xg for 15 min. The final pellet was resuspended in TES. Plasma membranes were stored at -80°C until ready for use.

Example 6- Preparation of Rat Hepatocytes

Hepatocytes were isolated according to a modified procedure of Berry and Friend (J Cell Biol 43:506 (1969)). A fed male Wistar rat was anesthetized with sodium pentobarbital (55 mg/kg, i.p.). The rat was placed on its back on the tray of the liver perfusion apparatus (37°C) and its limbs were secured with laboratory tape. The ventral surface was cleaned with 70% alcohol, and the abdominal cavity was opened with scissors to expose the liver, portal vein, hepatic artery and the posterior vena cava. Ligatures were placed loosely around the three vessels. A cannula was inserted into the portal vein and was secured with the ligature. The hepatic artery and the posterior vena cava below the liver were tied off with the ligatures. The perfusion pump was turned on and the descending aorta was immediately severed to allow the buffer to escape and to exsanguinate the rat. The chest cavity was quickly opened to expose the heart. A cannula was inserted into the superior vena cava through the heart and was secured with a ligature to complete the circulation of buffer through the

liver The liver was perfused with Krebs-Henseleit buffer containing 5 - 10% sheep RBC and under constant 95% O₂/5% CO₂ flow in situ at a flow rate of 14 ml/minute. It was perfused in a non-circulating system for 5 min and then followed by a re-circulating system (with 30mg collagenase) for another 30 minutes. The liver was then removed, minced with scissors in a plastic beaker and filtered through a nylon sieve. The hepatocytes were separated from debris by a series of buffer washings and centrifugations (690 rpm, RT, 90 sec). An aliquot of cells was diluted with buffer, stained with 0.4% Trypan Blue and counted. The rest of the cells were diluted with buffer to a density appropriate for each assay.

Example 7 Protocol for Rat Islet Isolation

Sprague Dawley rats (275-320 g) were used as the source of donor islets. Briefly, the pancreas was filled with 10 ml of cold reconstituted Liberase RI (Boehringer Mannheim), harvested and incubated with additional 5 ml enzyme solution in water bath for 30 minutes. Tissue suspension was washed twice with cold 10% FBS/Hanks buffer (Gibco), resuspended in 8 ml 25% ficoll (Sigma) and then layered with 5 ml each of 23%, 20% and 11% ficoll. The islets in the 20% layer after centrifugation were removed, washed twice with cold 10% FBS/Hank buffer and resuspended in 10% FBS/RPMI 1640 media (Sigma).

Example 8 Competitive Binding of Peptide to the GLP-1 Receptor in RINm5F Cell Plasma Membranes

96 well GF/C filtration plates (Millipore, Bedford, MA) were blocked with 0.3% PEI for at least one hour and washed twice with binding buffer consisting of 20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7.5, 1 mg/ml BSA and 1 mg/ml bacitracin. 5 µg of RINm5F cell plasma membranes diluted in binding buffer were applied to each well along with 0.05 µCi ¹²⁵I labeled GLP-1 and peptide concentrations ranging from 1x10⁻¹² to 1x10⁻⁶ M. Following a 60 minute incubation at room temperature, the plates were washed 3 times with ice-cold PBS containing 1

mg/ml BSA. The plates were dried, scintillant was added to each well, and cpm per well determined using a Wallac Microbeta counter ¹²⁵I counts bound to the membranes at each concentration of peptide were plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the IC₅₀. The polypeptides of this invention bound to the GLP-1 receptor present in the plasma membranes isolated from RINm5F cells with IC₅₀ values of between 2.2 nM and 9.8 nM (determined from a minimum of three trials).

Example 9 Competitive Binding of Peptide to the Glucagon Receptor in Rat Liver Plasma Membranes

96 well GF/C filtration plates (Millipore, Bedford, MA) were blocked with 0.1% PEI for at least one hour and washed twice with binding buffer consisting of 20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7.5, 1 mg/ml BSA and 1 mg/ml bacitracin. 3 µg of rat liver plasma membranes diluted in binding buffer were applied per well along with 0.05 µCi ¹²⁵I labeled glucagon and peptide concentrations ranging from 1x10⁻¹² to 1x10⁻⁸ M. Following a 60 minute incubation at room temperature, the plates were washed 3 times with ice-cold PBS containing 1 mg/ml BSA. The plates were dried, scintillant was added to each well, and cpm per well determined using a Wallac Microbeta counter ¹²⁵I counts bound to the membranes at each concentration of peptide were plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the IC₅₀. The polypeptides of this invention bound to the glucagon receptor present in the plasma membranes isolated from rat liver with IC₅₀ values of between 89.3 nM and 154.1 nM (determined from a minimum of three trials).

Example 10 Measurement of Peptide Signaling Through GLP1 Receptor Using Cyclic AMP Scintillation Proximity (SPA) Assay

RINm5F cells were plated in 96-well plates (Costar) at 1.5 x10⁵ cells/well and grown at 37°C for 24 hours in RPMI 1640, 5% FBS, antibiotic/antimycotic (Gibco BRL). The media was removed and the cells were washed twice with

PBS The cells were incubated with peptide concentrations ranging from 1×10^{-12} to 1×10^{-6} M in Hepes-PBS containing 1 % BSA and 100 μ M IBMX for 15 min at 37°C The incubation buffer was removed and the cells lysed in lysis reagent provided with the cAMP Scintillation Proximity Assay (SPA) direct screening assay system (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ) The amount of cAMP (in pmol) present in the lysates was determined following instructions provided with this kit. The amount of cAMP (in pmol) produced at each concentration of peptide was plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the EC_{50} for each peptide The average relative potency value (ratio of the GLP-1 concentration to polypeptide concentration at 50% response (EC_{50}) $\times$ 100, determined from a minimum of three trials) for GLP-1 receptor activation for the polypeptides of this invention was between 13.4% and 58.1% The maximum activity induced ranged from 91% to 116% of the native peptide GLP-1(7-36)amide (determined from a minimum of three trials).

Example 11 Measurement of Peptide Signaling Through Glucagon Receptor Using Cyclic AMP Scintillation Proximity (SPA) Assay

Freshly isolated rat hepatocytes were plated in 96 well plates at 7.5×10^4 or 2×10^5 cells/well in Hepes-bicarbonate-PBS containing 1% BSA and 100 μ M IBMX. Following equilibration at 37°C in a 5% CO_2 /95% O_2 environment for 10 min, peptide at concentrations ranging from 1×10^{-12} to 1×10^{-6} M was added for an additional 15 min The plates were centrifuged briefly, the incubation buffer was removed, and the cells lysed in lysis reagent provided with the cAMP Scintillation Proximity Assay (SPA) direct screening assay system (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ) The amount of cAMP (in pmol) present in the lysate was determined following instructions provided with this kit. The amount of cAMP (in pmol) produced at each concentration of peptide was plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the EC_{50} for each peptide The average relative potency value (ratio of the

glucagon concentration to polypeptide concentration at 50% response (EC_{50}) x 100, determined from a minimum of three trials) for glucagon receptor activation for the polypeptides of this invention was between 0.3 and 3.2%. The maximum activity induced ranged from 24% to 53% of the native peptide glucagon (determined from a minimum of three trials). The ability of the hybrid peptide to inhibit glucagon activity was measured as follows. Following equilibration at 37°C in a 5% CO₂/95% O₂ environment for 10 min, 10 µM peptide was added to the cells followed immediately by 2 nM glucagon for 15 min. The cells were lysed and cAMP determined as described above. After subtracting the amount of cAMP produced in the unstimulated hepatocytes from each data point, the percent inhibition was calculated as follows. Percent inhibition is the amount of cAMP produced in the presence of 2 nM glucagon alone less the amount of cAMP produced in the presence of 2 nM glucagon and 10 µM peptide, divided by the amount of cAMP produced in the presence of 2 nM glucagon alone and multiplied by 100. The average percent inhibition of glucagon activity by the polypeptides of this invention was between 18.2% and 35% (determined from a minimum of three trials).

Example 12 Measurement of Glucose Release from Rat Hepatocytes

Hepatocytes were added into a flat bottom 96 well plate (2×10^5 /100 µl/well) and pre-incubated in a 37°C incubator with constant shaking and under 95% O₂/5% CO₂ flow for 10 minutes. Hepatocytes were incubated for another 30 minutes after addition of glucagon with or without peptide. Cells were then lysed with 15% perchloric acid and plates were spun at 2600 rpm, 4°C for 15 min. The supernatant was neutralized with 1M Tris-HCl (pH 8.0) 2.5 N KOH (4555) and spun again. The resulting supernatant was analyzed for glucose with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (Methods of Enzymatic Analysis, H U Berneyer, Ed., Academic Press) and the A340 read on a fMAX plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Glucose output was calculated in the following manner after subtracting the amount of glucose produced in the unstimulated hepatocytes from each data point, the percent inhibition was calculated. Percent inhibition is the amount of glucose produced in the presence of 1 nM glucagon alone less the amount of glucose produced in the presence of 1 nM glucagon and 100 nM peptide, divided by the amount of glucose produced in the presence of 1nM glucagon alone and multiplied by 100. Polypeptides of this invention inhibited glucagon mediated glucose production by 47% as determined from 3 trials.

10 **Example 13 Measurement of Insulin Release Tested by Perfused Incubation of Rat Islets**

The bi-phasic response of insulin release stimulated by polypeptides of this invention were tested by islet perfusion. Fifty islets were loaded in the perfusion chamber and perfused with HEPES-KRB containing 3 mM glucose at 37°C. After 60 min, islets were exposed to buffer containing 8 mM glucose with or without peptide (50 nM) and perfused for another 30 min. Fractions of perfusate were collected at 1 or 5 minute intervals for insulin determination. Insulin was measured using an ELISA kit (Alpco Diagnostics, Windham, NH). Polypeptides of this invention (50 nM) increased insulin secretion from perfused islets approximately 2-fold, which is equivalent to that achieved by GLP-1 (50 nM).

20 **Example 14 Measuring Glucagon stimulated Glucose Production in Fed Wistar Rats**

Male Wistar rats were briefly anesthetized with isoflurane gas, tail bled for blood glucose using a Glucometer, and then given an injection into the tail vein of either vehicle (0.9% saline + 1% human albumin), 0.29nmol/kg glucagon, 1nmol/kg polypeptides of this invention or glucagon + polypeptides of this invention. The anesthesia was withdrawn and the conscious rats were tail-bled again after 10, 20 and 30 min. Glucose inhibition was determined by analyzing

the area under the glucose curve after subtracting the basal glucose level (dAUC) Percent inhibition is defined as the amount of glucose produced by 0.3 nmol/kg glucagon alone less the amount of glucose produced by 0.3 nmol/kg glucagon in the presence of 1 nmol/kg hybrid peptide, divided by the amount of glucose produced by 0.3 nmol/kg glucagon alone and multiplied by 100

Glucagon alone elevated blood glucose levels whereas polypeptides of this invention alone had no effect on blood glucose levels. The glucagon-mediated elevation in blood glucose was inhibited by 63% by polypeptides of this invention as determined in 2 trials (a minimum of 7 animals per group)

Example 15. Measuring Increases in Plasma Insulin Levels during IVGTT in Fasted Wistar Rats

Male Wistar rats were fasted overnight and then anesthetized with isoflurane gas. The rats were given a tail vein injection of 0.4g/kg of glucose plus either vehicle (0.9% saline + 1% albumin) or 1nmol/kg GLP-1 (positive control) or 1nmol/kg of the polypeptides of this invention. The rats were bled one minute later and the plasma assayed for insulin using an ELISA Kit (Alpco Diagnostics (Windham, NH)) The polypeptides of this invention (1nmol/kg) were found to promote insulin secretion 3-4 fold, which is equivalent to that achieved by GLP-1 (1nmol/kg)

FIGURE 1

Peptide Name	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO
G27	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2	6
G51	HSQGTFTSDYAKYLDARRAKEFIAWLVKGRG	7
G55	HSQGTFTSDYARYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2	8
G56	HSQGTFTSDYAAYLDARRAKEFIAWLVKGR-NH2	9

5

60387730 100501
T0500T 02/22/09

FIGURE 2

G51 (SEQ ID NO 10)

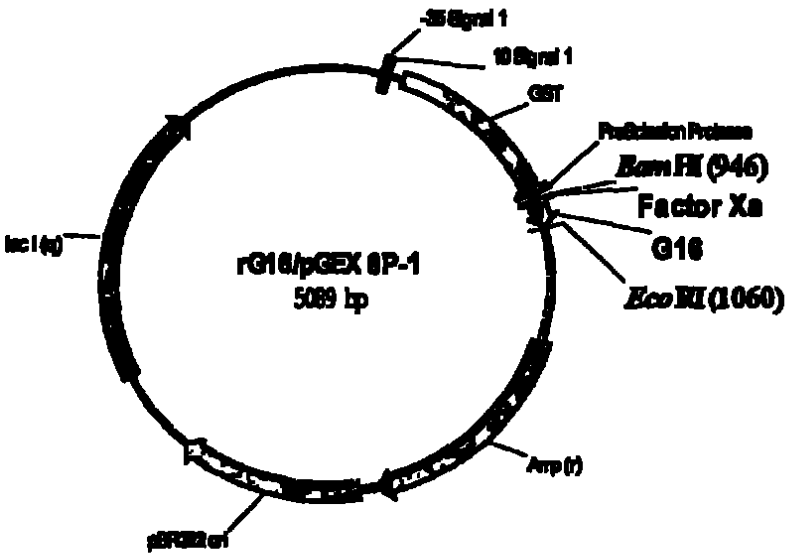
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCCAGGGTACCTTCACTTCCGACTACGCT
AAATACCTGGACGCTCGGCGTGCTAAAGAGTTCATCGCTTGGCTGGTTAAA
GGTCGTGGTTAATGAGAATTC

5

60327730-100501

FIGURE 3. A restriction map of a typical plasmid containing the GST-peptide fusion.

5





FORMATO DE DIGITALIZACI N
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S A
Ingeniería de Software y Servicios

Expediente No		02099603	No de Follo
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	1	1
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS.		

Observaciones

contiene Arte final

130



131

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 02 - 63,529
FECHA 1 SEPTIEMBRE 23 DE 2002

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación: 00000000 00000000 Folio: 123
Fecha (GUB): 2002-10-04 17:50:09
Trámite: 002 PATENTES D 1. REGISTRO/ 411 PRESENTIN
Observación: 2000 DISTRITO DE NEQUEN CHARTER

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2894482	23/09/2002	23,848,800 00

***** CONCEPTO *****

CANT	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	
1	TRANITES DE SOL DE PATENTE DE IN	378,000 00
	TOTAL	378,000 00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No

06 11996-801-002-3

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá D C Colombia



132

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 63,483
FECHA : SEPTIEMBRE 23 DE 2002

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO	
Indicacion : 02000103 00000000	Folios: 133
Fecha (MM): 2002-10-04 17:29:09	
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA	
Remite: PARA NOTIFICACION DE MARCA REGISTRADA	

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2894482	23/09/2002	25,848,800 00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 39005-01-01 SOLICITUDES	02 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	106,000 00
	TOTAL	106,000 00

SON: CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D C, Colombia

Cob 11996-801-002-3

Col 11996-801-002-3

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA

INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA

INCOMPLETA

ESQUEMA DE TRAZADO

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA

INCOMPLETA

Firma Responsable:

Fecha

Carrera 13 No 27-00, Pisos 5 y 10
Conmutador 334 12 21
Fax. 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

2020
Bogotá, D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

Oficio No. 15974

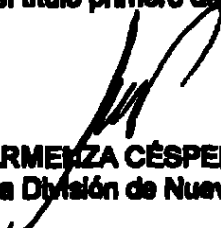
REFERENCIA	Radicación	02-88603
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Añegar copia del documento en que conste la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000)

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No 10 de 2001


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 07 NOV. 2002

Se recuerda al interesado que debe presentar dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de las solicitudes cuya prioridad se invoca, copia de las mismas certificadas por la autoridad que las expidió y, en los casos en que haya lugar la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo acarreará la pérdida de la prioridad invocada

202027

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail Info sic gov co
www sic gov co
Bogotá, D C , Colombia