



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

INVENTARIO

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

10-37698

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "COMPOSICIONES Y METODOS
PARA UTILIZAR PEPTIDOS PROISLET
Y SUS ANALOGOS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE CURED M, INC.

DOMICILIO WYNNEWOOD, PENNSYLVANIA,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CANACHO
COD 4134

22. BOGOTÁ, D.C., 5 DE ABRIL / 2010

(FORMA P-10)

T. 11
30-03-2010
no excl.



PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

Capítulo II

SOLICITANTE (71) Nombre y Dirección: **CURED M, INC.**
100 Lancaster Avenue, R-215
Wynnewood, Pennsylvania 19096, Estados Unidos de America
Lugar de constitución: **Wynnewood, Pennsylvania, Estados Unidos de America**

REPRESENTANTE (74) Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17'192.062**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES) (72) Nombre y 1) **Claresa S. LEVETAN**
Dirección: **103 Hickory Lane**
Rosemont, Pennsylvania 19010, Estados Unidos de America
2) **Victor M. GARSKY**
752 Palmer Place
Blue Bell, Pennsylvania 19422, Estados Unidos de America

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2008/074868** Fecha **29 DE AGOSTO DE 2008**
Publicación Internacional No. **WO 2009/029847** Fecha **5 DE MARZO DE 2009**

TÍTULO (54) **"COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA UTILIZAR PÉPTIDOS PROISLET Y SUS ANÁLOGOS"** (folios 180)

Clasificación Internacional (51) **C07K 14/47 A61K 38/26, A61K 38/22**

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	30 DE AGOSTO DE 2007	60/969,019
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	12 DE OCTUBRE DE 2007	60/979,526
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	3 DE DICIEMBRE DE 2007	60/991,964
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	26 DE FEBRERO DE 2008	61/031,479

Comprobante de pago No. **10-22,074** Fecha: **23 DE MARZO DE 2010**
10-22,076 **23 DE MARZO DE 2010**

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

(71) SOLICITANTE: CURED M, INC.

(30) PRIORIDAD: ESTADOUNIDENSE

(31) No. DE SOLICITUD: 60/969,019
60/979,526
60/991,964
61/031,479

(72) INVENTORES: Claresa S. LEVETAN
Victor M. GARSKY

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN: 30 DE AGOSTO DE 2007
12 DE OCTUBRE DE 2007
3 DE DICIEMBRE DE 2007
26 DE FEBRERO DE 2008

(33) PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA (74) APODERADO: Humberto RUBIO CAMACHO

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/074868 Fecha 29 DE AGOSTO DE 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/029847 Fecha 5 DE MARZO DE 2009

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: "COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA UTILIZAR PÉPTIDOS PROISLET Y SUS ANÁLOGOS"

RESUMEN:

Un péptido Prolslet caracterizado porque comprende una modificación de optimización, donde dicha modificación de optimización se selecciona del grupo formado por un grupo acetilo N-terminal, un grupo amida C-terminal, y un residuo de cisteína C-terminal.

ANEXOS

- X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- X Comprobante de pago de la tasa por excedente de Reivindicaciones.
- X Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- X Poderes, si fuere el caso. *Anexo copia autentica*
- X Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT
- X Copia informe búsqueda internacional.
- X Copia de Opinión escrita
- Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- Copia del informe del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional (IPEA). (Incluye modificaciones)
- Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
- Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo PCT en Fase Nacional.
- De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- Arte final 12 x 12
- De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros - *listado de secuencias*
- *Notificación registro de cambio (Form PCT/110/306)*

(11) Figura característica:

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA



C.C. 17'192.062 de Bogotá
T.P. 50.007 Consejo Superior de
La Judicatura

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

SOLICITUD DE PATENTE PCT FASE NACIONAL
PCT/US2008/074868

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 22,074
FECHA : MARZO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-037698- -00000-0000

Fecha: 2010-04-05 16:41:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 176

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80848456	23/03/2010	4,824,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

EXCEDENTE REIVINDICACIONES
PCT/US2008/074868

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 22,076
FECHA : MARZO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-037698- -00000-0000

Fecha: 2010-04-05 16:41:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 176

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA	ABOGCONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80848456	23/03/2010	4,824,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	52,000.00
		TOTAL :	\$ 52,000.00

SON: CINCUENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

APOSTILLE

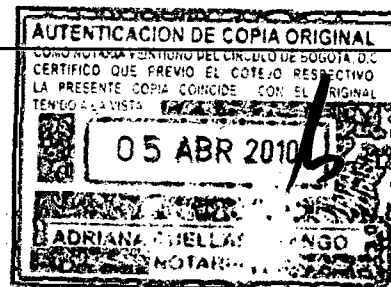
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : United States of America
2. This public document has been signed by **CHERYL DENISE HENRICH**
3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC**
4. bears the seal/stamp **CHERYL DENISE HENRICH , NOTARY PUBLIC, MONTGOMERY COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA**
5. at Harrisburg, Pennsylvania
6. The 16th day of March, 2010
7. by Pedro A. Cortés, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania
8. No: 201007599
9. Seal/Stamp
10. Signature

Certified

Pedro A. Cortés

Pedro A. Cortés



COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

El abajo firmado, en nombre y representación de

The undersigned, in the name and on behalf of

CURED.M, INC.

Domiciliado en:

with domicile at:

100 Lancaster Avenue, R-215
Wynnewood, PA 19096

por el presente conferimos poder amplio y suficiente a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO domiciliados en Bogotá, Colombia, para solicitar de las oficinas y autoridades correspondientes la obtención de registros, renovaciones, traspasos y en general todo lo relacionado con el mantenimiento, obtención y protección de sus marcas de fábrica, denominaciones comerciales, marcas de comercio y patentes, licencias sanitarias a cuyo efecto le faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios en cumplimiento del objeto indicado; elevar solicitudes, descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos; abonar todos los impuestos y cuotas de cualquier otros pagos determinados por la Ley; recibir todos los documentos presentados, solicitar testimonios, desistir y enmendar solicitudes, cobrar y percibir para oponerse y protestar contra cualquier solicitud, que a juicio del apoderado, pudieran prestarse a confusión o infringir o de cualquier modo perjudicar las marcas, denominaciones o patentes del Mandante. A los mandatarios se les otorga autorización amplia y bastante para contestar todos los reclamos y las demandas presentadas ante autoridades administrativas y judiciales, desistir de procedimientos, transar conflictos, pudiendo, así mismo sustituir este Poder en todo o en parte y revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado hoy

En

hereby grant full and sufficient Power of Attorney to a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO from Bogotá, Colombia, to apply to the proper officers and authorities for the issue of registrations, renewals, assignments, proofs of renewals and in general all that is related to the maintenance, obtention and protection of its trademarks, tradenames, commercial marks, patents and sanitary licenses; to which end it empowers them to take all steps necessary before said authorities for the object stated; to file petitions, prepare descriptions; make protests, declarations, appeals and objections; pay taxes and other charges required by law; apply for certifications, receive documents and take testimony abandon and amend applications and collect refunds; to oppose, ask for the cancellation of and protest any application or registration which in their judgment could lend to confusion or could be considered an infringement or could in any form prejudice the undersigned's trademarks, tradenames, patents and commercial marks. To the said mandatory sufficient Power is granted hereby to answer in the matter of all claims and demands that maybe presented, before administrative or judicial officers of any class, giving them likewise Power to abandon proceeding, settle conflicts, substitute these present in whole or in part and revoke such substitutions.

Given and signed this *3rd day of March 2010*
in *Wynnewood PA, USA*

Firma(s)/ Signature(s)

Nombre de cada firmante/

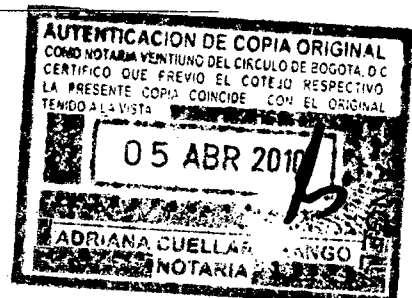
Name of each signor

H. Joseph Reiser, Ph.D.

Cargo de cada firmante/

Position of each signor

President and Chief Executive Officer



BACA

CERTIFICADO NOTARIAL (Individuo)

A los días del mes de ante mi,
Notario Público de compareció personalmente

NOTARIAL CERTIFICATE (Individual)

On this day of before me, a Notary
Public of personally appeared to

USE CORPORATE CERTIFICATION

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

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.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
compareció(eron) personalmente

H. Joseph Reiser, Ph.D

a quien(es) conozco como la(s) persona(s) que
firma(n) este documento en representación de la
sociedad/compañía denominada

CURED M, INC

Certifico:

a) Que

CURED M, INC

es una sociedad/compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las Leyes de

b) Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es

100 Lancaster Avenue, E-215

Wynnewood, PA 19096

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada sociedad/compañía.

d) Que H. Joseph Reiser, Ph.D.

está autorizado para otorgar el presente poder. Lo
anterior está probado por medio de los documentos,
que certifico he visto.

Ciudad hoy de
de

NOTARIAL CERTIFICATE (Corporation)

On this 3 day of March 2010
personally appeared H. Joseph Reiser Ph.D

whom I know to be the person(s) who signed this
document as representative(s) of the
corporation/company named Cured M, Inc

I Certify:

a) That Cured M, Inc
is a corporation/company legally constituted and in
existence accordance with the law of USA
Delaware.

b) That the domicile of said corporation/company is
100 Lancaster Avenue Suite 215
Wynnewood, PA 19096

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are compromised
within the object set forth in the charter of the
mentioned corporation/company.

d) That Mr(s). H. Joseph
Reiser, Ph.D.

is authorized to grant the present Power of Attorney.
The aforementioned was duly proven through the
documents and I duly verify having seen them.
State Pennsylvania

This 3 day of March 2010

Cheryl Denise Henrich

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

NOTARIAL SEAL

Cheryl Denise Henrich - Notary Public

Lower Merion Twp., Montgomery County

MY COMMISSION EXPIRES JANUARY 1, 2011

COPIA DE COPIA ORIGINAL

ENTRINO DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C

PREVIO EL COTEJO RESPECTIVO

LA PRESENTE COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL

TENIDO A LA VISTA

05 ABR 2010

ADRIANA CUELLAR

NOTARIA

APOSTILLE

(Convenio de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento Público

2. Firmado por: CHERYL DENISE HENRICH

3. Actuando en calidad de: NOTARIO PUBLICO

4. Lleva el sello de CHERYL DENISE HENRICH, NOTARIO PUBLICO, CONDADO DE MONTGOMERY, ESTADO DE PENSILVANIA.

CERTIFICADO

5. En HARRISBURG, PENSILVANIA

6. EL 16 DE MARZO DE 2010

7. Por Pedro A. Cortes, Secretario de Estado, Estado de Pensilvania

8. No: 201007599

9. Sello de la Secretaría de Estado de Pensilvania

10. Firma:

Pedro A. Cortés



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

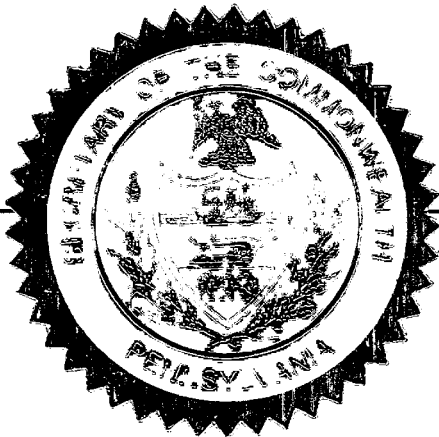
1. Country : United States of America
2. This public document has been signed by **MARY JO CALIENDO**
3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC**
4. bears the seal/stamp **MARY JO CALIENDO , NOTARY PUBLIC, ALLEGHENY COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA**

Certified

5. at Harrisburg, Pennsylvania
6. The 16th day of March, 2010
7. by Pedro A. Cortés, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania
8. No: 201007600
9. Seal/Stamp
10. Signature

Pedro A. Cortés

Pedro A. Cortés



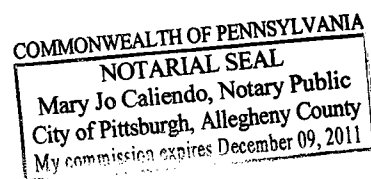
I, Emily E. Scattaregia, declare that attached hereto is a true and accurate copy of the original Assignment filed with the US Patent and Trademark Office for the applications identified therein.

Emily Chatterbox

STATE OF Pennsylvania }
COUNTY OF Allegheny } SS

On the 3rd day of March, 2010, Emily E. Scattaregia personally appeared before me and acknowledged the attached to be his signature and that he signed, sealed, and delivered the attached instrument as his voluntary act and deed and for the purposes set forth herein.

May So Calie Do
(Notary Public)



ASSIGNMENT

WHEREAS, I, Claresa S. Levetan (hereinafter the "Assignor"), am the inventor of a certain new and useful invention as set forth and disclosed in a Patent Cooperation Treaty application entitled COMPOSITIONS AND METHODS OF USING PROISLET PEPTIDES AND ANALOGS THEREOF, the application of which was filed on August 29, 2008 as PCT/US2008/074868 in the United States Receiving Office, which application claims priority to U.S. Provisional Application No. 60/969,019 filed August 30, 2007; U.S. Provisional Application No. 60/979,526 filed October 12, 2007; U.S. Provisional Application No. 60/991,964 filed December 3, 2007; and U.S. Provisional Application No. 61/031,479 filed February 26, 2008 (hereinafter the "Invention").

WHEREAS, CURED M, INC., having an address of 100 Lancaster Avenue, R-215, Wynnewood, PA 19096 ("Assignee"), is desirous of acquiring Assignor's right, title and interest in and to said Invention and in and to any and all Letters Patents of the United States and foreign countries that may be obtained therefor for said Inventions;

NOW, THEREFORE, for good and valuable consideration, the receipt for and sufficiency of which is hereby acknowledged, Assignor does hereby sell, assign, transfer and set over unto Assignee, its legal representatives, successors, and assigns, the entire right, title and interest in and to said Inventions as set forth in the above-mentioned applications, including any applications which claim priority to the above referenced applications, any applications to which the above referenced applications claim priority, and any continuations, continuations-in-part, divisions, reissues, re-examinations or extensions thereof, and in and to any and all patents of the United States and foreign countries which may be issued for said Inventions;

UPON SAID CONSIDERATION, Assignor shall not execute any writing or do any act whatsoever conflicting with the terms and conditions of this Agreement, and that Assignor will, at any time upon request, without further or additional consideration, but at the expense of said Assignee, execute such additional assignments and other writings and do such additional acts as said Assignee may deem necessary or desirable to perfect the Assignee's enjoyment of this grant, and render all necessary assistance in making application for or obtaining original, divisional, continuations, continuations-in-part, reexamined, reissued, or extended Letters Patent of the United States or of any and all foreign countries on said Inventions, and in enforcing any rights or choses in action accruing as a result of such applications or patents, by giving testimony in any and all proceedings or transactions involving such applications or patents, and by executing preliminary statements and other affidavits, it being understood that the foregoing covenant and agreement shall bind and inure to the benefit of the assigns and legal representatives of Assignor and Assignee;

AND we request that any Patents that may be issued for said Inventions be issued to said Assignee, its legal representatives, successors or assigns, as the sole owner of the entire right, title and interest in and to said patent and the invention covered thereby.

Date: Feb 6, 2008 By: Ch Levetan
Claresa S. Levetan

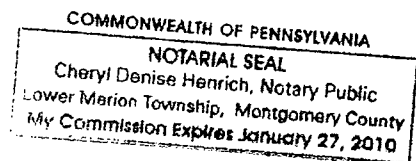
STATE OF Pennsylvania)
) SS:
COUNTY OF Montgomery)

On this 6 day of February, 2008, before me personally appeared
Claresa S. Levetan, known to be the person named in and who executed the above instrument,
and acknowledged to me that he executed the same for the uses and purposes therein set forth.

SEAL

Cheryl Denise Henrich
Notary Public

My commission expires 1/24/2010



APOSTILLE

(Convenio de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento Público

2. Firmado por: MARY JO CALIENDO

3. Actuando en calidad de: NOTARIO PUBLICO

4. Lleva el sello de MARY JO CALIENDO, NOTARIO PUBLICO, CONDADO DE ALLEGHENY, ESTADO DE PENSILVANIA.

CERTIFICADO

5. En HARRISBURG, PENSILVANIA

6. EL 16 DE MARZO DE 2010

7. Por Pedro A. Cortes, Secretario de Estado, Estado de Pensilvania

8. No: 201007600

9. Sello de la Secretaria de Estado de Pensilvania

10. Firma:

Pedro A. Cortés

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2010 MAR -5 A 11:29
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

013952
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
Clemencia Paredes
CUMPLA FIRMA APLICAR EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

Resolución
6694/78
Minjusticia

Clemencia Paredes Tejada
TRADUCTORA OFICIAL
ENGLISH - FRENCH - SPANISH
ANGLAIS - FRANÇAIS - ESPAGNOL

CERTIFICACIÓN DE CESIÓN

Yo, Emily E. Scattaregia, declaro que el documento anexo a este es una copia fiel y correcta de la Cesión original archivada en la Oficina de Marcas Comerciales y Patentes de los Estados Unidos para las solicitudes que se identifican allí.

Firmado

ESTADO DE PENNSYLVANIA

CONDADO DE ALLEGHENY

El 3 de Marzo de 2010, Emily E. Scattaregia personalmente se presentó ante mí y reconoció que la firma en el documento anexo es la suya y que firmó, selló y entregó el instrumento anexo como su acto voluntario para todos los propósitos que se exponen en el mismo.

Notario Público – Firmado

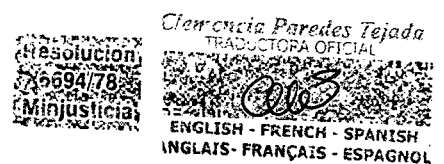
MANCOMUNIDAD DE PENNSYLVANIA

SELLO NOTARIAL

Mary Jo Caliendo, Notario Público

Ciudad de Pittsburgh, Condado de Allegheny

Mi Comisión Vence el 9 de diciembre del 2011



Expediente No. 132136 00502

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, Yo, Claresa S. Levetan (de aquí en adelante el “Cedente”), soy el inventor de una invención nueva y útil tal como se expone y divulga en una solicitud de Convenio de Cooperación de Patentes titulada COMPOSICIÓN Y MÉTODOS DE USO DE PEPTIDOS PROISLET Y EQUIVALENTES DEL MISMO, solicitud del cual se archivó el 29 de agosto de 2008 como PCT/US2008/074868 en la Oficina de Recibo de los Estados Unidos, cuya solicitud demanda prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/969.019 archivada el 30 de Agosto de 2007; Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/979.526 archivada el 12 de Octubre de 2007, Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/991.964 archivada el 3 de Diciembre de 2007; y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/031.479 archivada el 26 de Febrero de 2008 (de aquí en adelante denominados la “Invención”)

CONSIDERANDO QUE, CURED M, INC., con oficinas en el 100 Lancaster Avenue, R-215, Wynnewood, PA 19096 (el “Beneficiario”), desea adquirir el derecho, título e interés del Cedente en para dicha Invención y en y para cualquiera y todas las Cartas de Patentes de los Estados Unidos y de los países extranjeros que puedan obtenerse para esta Invención.

EN VIRTUD DE LO CUAL, a título oneroso, cuyo recibo y suficiencia se dan por aceptados por medio del presente documento, el Cedente vende, cede, transfiere y traspasa al Beneficiario, sus representantes legales, sucesores y personas designadas, todo el derecho, título e interés en y para dichas Invenciones tal como se expuso en las solicitudes anteriormente mencionadas, incluyendo cualquier solicitud que reclame prioridad, y cualquier continuación, continuación en parte, división, reexpedición, re-inspección y extensión de la misma, y en y para cualquiera y

Resolución
X-6694/78
Minjusticia

Clara Faredes Tejada
TRADUCTORA OFICIAL
ENGLISH - FRENCH - SPANISH
ANGLAIS - FRANÇAIS - ESPAGNOL

todas las patentes de los Estados Unidos y de países extranjeros que se puedan expedir para dichas Invenciones.

TOMANDO EN CUENTA DICHA CONSIDERACIÓN, el Cedente no ejecutará ningún escrito o hará ningún acto que de alguna forma sea opuesto a los términos y condiciones de este Acuerdo, y que el Cedente, en ningún momento a solicitud, sin más u otra consideración, pero a expensas de dicho Cedente, ejecutará cesiones adicionales u otros escritos y hará dichos actos adicionales tal como el Cedente considere necesario o conveniente para mejorar el placer del Beneficiario de esta concesión y proporcionará toda la ayuda necesaria para hacer la solicitud o para obtener Cartas de Patentes originales, de división, de continuación, continuación en parte, de re-verificación, de re-expedición o de extensión de los Estados Unidos o de cualquier país extranjero para dichas Invenciones; y respetando cualquier derecho o selección en acción de acopio como resultado de dichas solicitudes o patentes, dando testimonio de cualquiera y todas las transacciones o diligencias que involucren dichas solicitudes o patentes, y ejecutando declaraciones preliminares y otras declaraciones juramentadas, se entiende que el convenio y acuerdo extranjero validará y tendrá efecto al beneficio de las personas que se nombran y los representantes legales del Cedente y del Beneficiario;

Y, solicitamos que cualquier Patente que pueda expedirse para dichas Invenciones se expida al Beneficiario mencionado, sus representantes legales, sucesores o personas designadas, como el propietario exclusivo de todo el derecho, título e interés en y para dicha patente y la invención que se cubre por consiguiente.

Fecha: Febrero 6, 2009

Por: Claresa S. Levetan – Firmado



ESTADO DE PENNSYLVANIA

CONDADO DE MONTGOMERY

El 6 de Febrero de 2009, ante mí, apareció personalmente Claresa S. Levetan, quien reconoció ser la persona nombrada en y que ejecutó el instrumento anterior, y reconoció que ejecutó dicho documento para los usos y propósitos que en este se exponen.

SELLO

Notario Público – Firmado

Mi Comisión vence el 1/24/2010

MANCOMUNIDAD DE PENNSYLVANIA

SELLO NOTARIAL

Cheryl Denise Henrich, Notario Público

Ayuntamiento de Lower Marion – Condado de Montgomery

Mi Comisión vence el 27 de enero de 2010

Clara Paredes Tejada
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución
2009/78
Ministerio de Justicia
ENGLISH - FRENCH - SPANISH
INGLÉS - FRANÇAIS - ESPAGNOL 181

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : United States of America
2. This public document has been signed by **SANDRA J DONNELLY**
3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC**
4. bears the seal/stamp **SANDRA J DONNELLY , NOTARY PUBLIC, MONTGOMERY COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA**

Certified

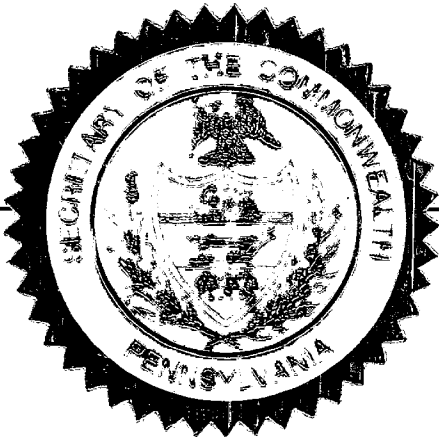
5. at Harrisburg, Pennsylvania
7. by Pedro A. Cortés, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania
8. No: 201007601
9. Seal/Stamp

6. The 16th day of March, 2010

10. Signature

Pedro A. Cortés

Pedro A. Cortés



ASSIGNMENT

The undersigned

- (1) CLARESA S. LEVETAN
(2) VICTOR M. GARSKY

Domiciled in

- (1) 103 Hickory Lane
Rosemont, PA 19010
(2) 752 Palmer Place
Blue Bell, PA 19422

State(s) under oath to be sole and true
inventor(s) of

COMPOSITIONS AND METHODS
OF USING PROISLET PEPTIDES
AND ANALOGS THEREOF

State as well, that assign, without
reservations or limitations, in favor of

CURED.M, INC.

Domiciled in

100 Lancaster Avenue, R-215
Wynnewood, PA 19096

All rights inherent to said invention
and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply,
in its name, for the corresponding
patent in the Republic of

COLOMBIA

Claresa S. Levetan

Victor M. Garsky

CESION

El abajo firmado(s)

- 1- CLARESA S. LEVETAN
2-VICTOR M. GARSKY

Domiciliado(s) en

- 1) 103 Hickory Lane
Rosemont, PA 19010
2) 752 Palmer Place
Blue Bell, PA 19422

Declara bajo juramento ser
único(s) y verdadero(s) inventor(es) de

COMPOSICIONES Y METODOS PARA UTILIZAR
PEPTIDOS PROISLET Y ANALOGOS

Declara así mismo que cede y
transfiere, sin limitación, a favor de la
sociedad

CURED.M, INC.

Domiciliada en

100 Lancaster Avenue, R-215
Wynnewood, Pennsylvania 19096
Estados Unidos de America

Todos los derechos inherentes a dicha
invención y que la citada sociedad
queda facultada para solicitar en su
nombre la patente correspondiente en
la República de

COLOMBIA

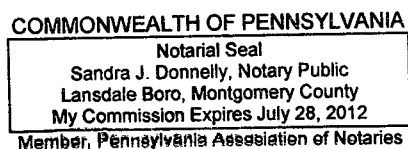
Date

Date

Notarial Certification:

On this 26 day of February, 2010, before me personally appeared Victor M. Garsky, known to be the person named in and who executed the attached Assignment regarding patent filing in Colombia, and acknowledged to me that he executed the same for the uses and purposes therein set forth.

S E A L



Sandra J. Donnelly
Notary Public

February 26, 2010
Date

My commission expires July 28, 2012

APOSTILLE

(Convenio de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento Público

2. Firmado por: SANDRA J DONNELLY

3. Actuando en calidad de: NOTARIA PUBLICA

4. Lleva el sello de SANDRA J DONNELLY, NOTARIA PUBLICA, CONDADO DE MONTGOMERY, ESTADO DE PENSILVANIA.

CERTIFICADO

5. En HARRISBURG, PENSILVANIA

6. EL 16 DE MARZO DE 2010

7. Por Pedro A. Cortes, Secretario de Estado, Estado de Pensilvania

8. No: 201007601

9. Sello de la Secretaria de Estado de Pensilvania

10. Firma:

Pedro A. Cortés

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2010 MAR - 5 A 11: 28
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
013951
Clemencia Paredes
COVA FIRMA APODE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

Resolución
6694/78
Minjusticia

7
Clemencia Paredes Tejada
TRADUCTORA OFICIAL
ENGLISH - FRENCH - SPANISH
ANGLAIS - FRANÇAIS - ESPAGNOL

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

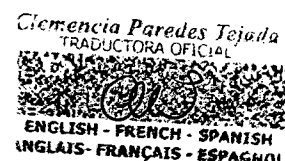
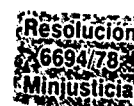
El 26 de Febrero de 2010, ante mí personalmente compareció Víctor M. Garsky, el cual fue la persona anteriormente nombrada en este instrumento y quien ejecuto la asignación adjuntada en relación con el registro de patentes en Colombia, y reconociendo ante mi que el ejecuto el mismo para uso y de los propósitos aquí expuestos.

Firma,

SANDRA J. DONNELLY

Notaria Pública

Mi comisión expira el 28 de Julio de 2012



CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
5 March 2009 (05.03.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/029847 A8

(51) International Patent Classification:

C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/26 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/074868

(22) International Filing Date:

29 August 2008 (29.08.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/969,019	30 August 2007 (30.08.2007)	US
60/979,526	12 October 2007 (12.10.2007)	US
60/991,964	3 December 2007 (03.12.2007)	US
61/031,479	26 February 2008 (26.02.2008)	US

(71) Applicant (for all designated States except US):
CURED.M, INC. [US/US]; 100 Lancaster Avenue,
R-215, Wynnwood, Pennsylvania 19096 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): LEVETAN, Claressa
S. [US/US]; 103 Hickory Lane, Rosemont, Pennsylvania
19010 (US).

(74) Agent: MILLER, Raymond A.; 500 Grant Street, 50th
Floor, One Mellon Center, Pittsburgh, Pennsylvania
15219 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(48) Date of publication of this corrected version:

5 November 2009

(15) Information about Correction:

see Notice of 5 November 2009

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS OF USING PROISLET PEPTIDES AND ANALOGS THEREOF

(57) Abstract: Embodiments relate to proislet peptides, preferably HIP, that exhibit increased stability and efficacy, and methods of using the same to treating a pathology associated with impaired pancreatic function, including type 1 and type 2 diabetes and symptoms thereof.

WO 2009/029847 A8

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference 132136_00502	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/US2008/074868	International filing date (<i>day/month/year</i>) 29 August 2008 (29.08.2008)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 30 August 2007 (30.08.2007)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant CUREDM, INC.			

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 <i>bis</i>.1(a). 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.																
3. This report contains indications relating to the following items: <table border="0"> <tr> <td>☒ Box No. I</td> <td>Basis of the report</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table> 4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).	☒ Box No. I	Basis of the report	☐ Box No. II	Priority	☐ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐ Box No. IV	Lack of unity of invention	☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☐ Box No. VI	Certain documents cited	☐ Box No. VII	Certain defects in the international application	☒ Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒ Box No. I	Basis of the report															
☐ Box No. II	Priority															
☐ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability															
☐ Box No. IV	Lack of unity of invention															
☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement															
☐ Box No. VI	Certain documents cited															
☐ Box No. VII	Certain defects in the international application															
☒ Box No. VIII	Certain observations on the international application															

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Date of issuance of this report 02 March 2010 (02.03.2010)
	Authorized officer Simin Baharlou e-mail: pt09.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2008/074868

International filing date (day/month/year)
29.08.2008

Priority date (day/month/year)
30.08.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/47 A61K38/22 A61K38/26

Applicant
CUREDM, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Schmidt, Harald

Telephone No. +31 70 340-4023



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/074868

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/074868

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-12</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-12</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-12</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following documents:

- D1: US 2007/087971 A1 (LEVETAN CLARESA S [US] ET AL) 19 April 2007 (2007-04-19)
- D2: US 2006/198839 A1 (LEVETAN CLARESA S [US]) 7 September 2006 (2006-09-07)
- D3: EP-A-0 303 233 (SHIONOGI & CO [JP]) 15 February 1989 (1989-02-15)
- D4: WO 03/033808 A (PROCTER & GAMBLE [US] GMP ENDOTHERAPEUTICS INC [US]) 24 April 2003 (2003-04-24)

1

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of independent claims 1,2 and 5 is not new in the sense of Article 33(2) PCT:

The document D1 discloses (the references in parentheses applying to this document) human prolslet peptides and their analogs that can be chemically modified for the purpose of improving bioavailability and/or increasing efficacy, solubility and stability, by e.g. linking the peptide to PEG or albumin (see paragraphs 0010, 0035, 0057-0079, tables 1-4 and claims 1-3).

Further provided are pharmaceutical compositions comprising such human prolslet peptides and methods of treatment of pancreatic disorders, including type 1 and type 2 diabetes. The method of treatment may comprise further steps of administering agents for stimulating pancreatic islet cell regeneration and/or inhibiting, blocking or destroying autoimmune cells that target pancreatic islet cells (see paragraphs 0010,0011,0036 and claims 1-18).

2

Moreover, the below-mentioned lack of clarity notwithstanding (see Item VIII), the subject-

matter of independent claims 1,2 and 5 is not new in the sense of Article 33(2) PCT, and therefore the criteria of Article 33(1) PCT are not met, for the following reasons:

The document D2 discloses proislet peptides and their pharmaceutical compositions in combination with agents for stimulating pancreatic islet cell regeneration and/or inhibiting, blocking or destroying autoimmune cells that target pancreatic islet cells for treating type 1 diabetes mellitus (see claims 1-32)

The document D3 discloses reg protein fragments and their pharmaceutical compositions for the regeneration of human pancreatic islet B cells (see page 2 and the claims).

The document D4 discloses an INGAP peptide, preferably in its pharmaceutically acceptable salt for the treatment of diabetes (see pages 2,5 and claims 1-8).

3

Furthermore, it is noted that due to the ill-defined peptide, any known peptide is considered as detrimental to novelty in the sense of Article 33(2) PCT for the subject-matter of claim 1.

4

Since the subject-matter of claims 1,2 and 5 is not new in the sense of Article 33(2) PCT, it also lacks an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

5

Dependent claims 3,4 and 6 to 12 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of novelty and/or inventive step, see documents D1 to D4 and the corresponding passages cited in the search report.

6

Since the peptides are potentially useful in the manufacture of pharmaceuticals, claims 1 to 12 meet the requirements of Article 33(4) PCT.

7

Remark on patentability

Claims 5 to 12 encompass a method of treatment of the human or animal body by therapy. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

It is completely unclear in the sense of Article 6 PCT what is meant with an "optimized proislet peptide" in claim 1. There are no structural features present that define a proislet peptide, let alone how to modify a known proislet peptide to be optimized. Furthermore, according to the description on pages 14 to 19 the term "optimized proislet peptide" refers to a plethora of variations derived from a multitude of proteins, including, but not limited to, REG3A, REG3G, HIP proteins and their homologs and it is therefore impossible to determine whether a given peptide is an optimized proislet peptide or not.

IN THE INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO
PATENT COOPERATION TREATY

International Bureau

In Re International Application of: CURED M, INC.

International Application No.: PCT/US2008/074868

International Filing Date: 29 August 2008

For: COMPOSITIONS AND METHODS OF USING PROISLET PEPTIDES AND
ANALOGS THEREOF

Date: 29 Dec 2009

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
SWITZERLAND

Via Facsimile No. 011 41 22 338 8270

**REQUEST FOR RECORDATION OF A CHANGE
BY THE INTERNATIONAL BUREAU UNDER RULE 92bis**

Sir or Madam:

Please make the following change under rule 92bis in the above-referenced

International Application:

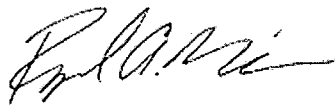
Please add the following inventor to the Application:

GARSKY, Victor M.
752 Palmer Place
Blue Bell, PA 19422
US

A Power of Attorney executed by the Applicant is filed herewith.

If anything further is required, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,



Dated: 29 Dec 2009

Raymond A. Miller, Reg. No. 42,891

PEPPER HAMILTON LLP
One Mellon Center, 50th Floor
500 Grant Street
Pittsburgh, PA 15219
Phone - (412) 454-5000
Facsimile - (412) 281-0717

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MILLER, Raymond A.
500 Grant Street, 50th Floor
One Mellon Center
Pittsburgh, Pennsylvania 15219
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 07 January 2010 (07.01.2010)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 132136_00502	
International application No. PCT/US2008/074868	International filing date (day/month/year) 29 August 2008 (29.08.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☐ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address GARSKY, Victor M. 752 Palmer Place Blue Bell, PA 19422 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office ☐ the International Preliminary Examining Authority		
☐ the International Searching Authority ☒ the designated Offices concerned		
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search ☐ the elected Offices concerned		
☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nevers Althea e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
---	---

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/EBJHPWQS0

**A. COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA UTILIZAR PÉPTIDOS
PROISLET Y SUS ANÁLOGOS**

B. Referencia a Solicitudes Relacionadas: Esta Solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisoria Estadounidense N° 60/969019 (presentada el 30 de agosto, 2007); la
5 Solicitud Provisoria Estadounidense N° 60/979526 (presentada el 12 de octubre, 2007); la Solicitud Provisoria Estadounidense N° 60/991964 (presentada el 3 de diciembre, 2007); y la Solicitud Provisoria Estadounidense N° 61/031479 (presentada el 26 de febrero, 2008).

C. Participación gubernamental: No se aplica

D. Partes del Acuerdo de Investigación Conjunta: No se aplica

10 **E. Incorporación por referencia del material presentado un Disco Compacto:** No se aplica

F. Antecedentes: No se aplica

1. **Campo :** No se aplica

2. **Descripción del arte relacionado:** No se aplica

15 **G. Breve síntesis**

[0001] Las realizaciones descritas aquí proporcionan formulaciones, derivados y modificaciones de los péptidos ProIslet diseñados para aumentar su solubilidad, biodisponibilidad y resistencia en suero a la escisión de la proteasa, mejorando así su eficacia como agente terapéutico y métodos para utilizarlo.

20 [0002] En una realización, los péptidos ProIslet y sus derivados están bloqueados con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal.

[0003] En una realización, HIP (Péptido ProIslet Humano) y derivados del mismo están bloqueados con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal (HIP3Blocked (HIP3Bloqueado) (NR ID DE SEC: 5), HIP1Blocked (HIP1Bloqueado) (NR ID DE SEC: 6) y HIP2Blocked (HIP2Bloqueado) (NR ID DE SEC: 7)). Dichas
25 modificaciones parecen otorgarle a la secuencia una menor susceptibilidad a la escisión de la proteasa en suero con aquellas proteasas que normalmente reconocen extremos libres, aumentando así eficazmente el Tmax y biodisponibilidad del péptido. Los péptidos modificados de este modo muestran una eficacia aumentada requiriendo así, dosis
30 disminuidas cuando se administran mediante, por ejemplo, las vías iv, im, subc. o intraperitoneal.

[0004] En otra realización, péptidos ProIslet y sus derivados se modificaron agregando un residuo de cisteína al N-terminal del péptido.

[0005] En otra realización, HIP y sus derivados están modificados mediante el agregado de un residuo de cisteína al C-terminal del HIP (HIP3Cys (NR ID DE SEC: 8), HIP1Cys (NR ID DE SEC: 9) y HIP2Cys (NR ID DE SEC: 10)); resultando en un compuesto que es capaz de formar dímeros en solución (HIP3CysDimer (HIP3CisDímero) (NR ID DE SEC: 11), HIP1CysDimer (HIP1CisDímero) (NR ID DE SEC: 12) y HIP2CysDimer (HIP2CisDímero) (NR ID DE SEC: 13)). Dicha modificación parece aumentar la estabilidad de las variantes HIPCys evitando aquellas proteasas que reconocen a las variantes HIP o HIPCys en forma de monómero.

[0006] En otra realización, las variantes del péptido ProIslet cisteína están bloqueadas con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal.

[0007] En otra realización, las variantes HIPCys está bloqueadas con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal (HIP3CysBlocked (NR ID DE SEC: 14), HIP1CysBlocked (NR ID DE SEC: 15) y HIP2CysBlocked (NR ID DE SEC: 16)). Dichas modificaciones parecen hacer que la secuencia sea menos susceptible a la escisión de la proteasa en suero con aquellas proteasas que normalmente reconocen extremos libres y resultan en un compuesto que es capaz de formar dímeros en solución (HIP3CysBlockedDimer (HIP3CisBloqueadoDímero) (NR ID DE SEC: 17), HIP1CysBlockedDimer (HIP1CisBloqueadoDímero) (NR ID DE SEC: 18) y HIP2CysBlockedDimer (HIP2CisBloqueadoDímero) (NR ID DE SEC: 19)) aumentando así la estabilidad de las variantes HIPCysBlocked (HIPCisBloqueado) evitando aquellas proteasas que reconocen a las variantes HIP o HIPCysBlocked en forma de monómero.

[0008] En otra realización, las variantes del péptido ProIslet cisteína están modificadas acoplando covalentemente un constructo 40Kd PEG activado con maleimida dimérica al residuo de cisteína C-terminal.

[0009] En otra realización, las variantes HIPCys están modificadas acoplando covalentemente un constructo 40kd PEG activado con maleimida dimérica al residuo de cisteína C-terminal (HIP3CysPEG (HIP3CisPEG) (NR ID DE SEC: 20), HIP1CysPEG (HIP1CisPEG) (NR ID DE SEC: 21) y HIP2CysPEG (HIP2CisPEG) (NR ID DE SEC: 22)). Dicha modificación parece mejorar la estabilidad de HIPCys en suero resultando en

una biodisponibilidad y eficacia de dosificación aumentadas de las variantes HIPCys en las estrategias terapéuticas para estimular la neogénesis de islote y revertir la diabetes *in vivo*.

5 [0010] En otra realización, las variantes del péptido ProIslet CysBlocked (péptido ProIslet CisBloqueado) están modificadas acoplando covalentemente un constructo 40Kd PEG activado por maleimida dimérica.

10 [0011] En otra realización, las variantes HIPCysBlocked están modificadas acoplando covalentemente un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica (HIP3CysBlockedPEG (NR ID DE SEC: 23), HIP1CysBlockedPEG (NR ID DE SEC: 24) y HIP2CysBlockedPEG (NR ID DE SEC: 25)). Dicha modificación parece mejorar la estabilidad de las variantes HIPCysBlocked en suero resultando en una biodisponibilidad y eficacia de dosificación aumentadas de las variantes HIPCysBlocked en las estrategias terapéuticas para estimular la neogénesis de islote y revertir la diabetes *in vivo*.

15 [0012] Otras realizaciones proveen métodos para administrar compuestos del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIPs Optimizado (NRS ID de SEC: 5-25), solo o combinado con otros agentes terapéuticos para estimular la regeneración de la célula del islote pancreático. En varias realizaciones, los métodos descritos aquí pueden ponerse en práctica mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido ProIslet Optimizado solo o en combinación con insulina y otro agente y, en combinación con uno o más agentes que no son insulina.

20 [0013] Otras realizaciones proveen formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación unitarias de los compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo al HIP Optimizado. En una realización, la formulación farmacéutica provista contiene HIP Optimizado solo o en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticos activos diferentes (APIs). En una realización, el API es un agente o agentes en preparaciones de
25 liposoma soluble que permiten que el HIP Optimizado se administre mediante una variedad de vías, incluyendo la vía subcutánea, intramuscular, intravenosa e incluso, oral, según la formulación seleccionada. En una realización, la formulación es para la administración sistémica general, pero en otras realizaciones, la formulación comprende un agente dirigido a la administración en ubicaciones específicas, receptores, células, tejidos, órganos o
30 sistemas orgánicos en un sujeto.

[0014] En otras realizaciones, se proveen métodos para tratar una patología asociada con una función pancreática deteriorada en un sujeto que necesita dicho tratamiento. El método puede comprender el paso de administrar uno o más agentes para estimular la regeneración de la célula de los islotes pancreáticos además de los compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo al HIP Optimizado. En un aspecto de esta realización, los agentes se seleccionan de HIP o péptido relacionado con HIP que no sea HIP Optimizado, amilina/Pramlintide (SYMLIN™), exendina-4 (EXENATIDE™), GIP, GLP-1, agonistas del receptor GLP-1, análogos de GLP-1, péptido INGAP en hámster y péptidos relacionados, Liraglutide (NN2211), y un inhibidor de la dipeptidil peptidasa, que bloquea la degradación de GLP-1.

[0015] En otra realización, se proveen métodos para tratar una patología asociada con la función pancreática deteriorada en un sujeto que necesita dicho tratamiento. El método puede comprender uno o más de los siguientes pasos (1) intensificar el control glucémico; (2) administrar vitamina D3 oral (colecalfiferol) o vitamina D2 (ergocalciferol) para mantener los niveles de 25-hidroxivitamina por encima de 40 ng/ml; (3) administrar una o más terapias inmunológicas para proteger la formación de nuevas células de islotes, incluyendo la administración de agentes inmunosupresores; (4) administrar compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP Optimizado en combinación con insulina pero disminuyendo la insulina administrada con el tiempo; y (5) administrar repetidas veces una terapia para la protección de los islotes, preferentemente, sobre una base de 3 a 24 meses, según la terapia inmunológica seleccionada, además del paso de administrar HIP Optimizado.

[0016] En otra realización, se proveen métodos para tratar una patología asociada con una función pancreática deteriorada en un sujeto que necesita dicho tratamiento. El método puede comprender uno o más de los siguientes pasos: (1) intensificar el control glucémico; (2) administrar vitamina D3 oral (colecalfiferol) para mantener los niveles de 25-hidroxivitamina por encima de 40 ng/ml; (3) administrar un agente para estimular la regeneración del islote pancreático además de los compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP Optimizado, incluyendo pero sin limitarse a HIP y análogos HIP que no sean HIP Optimizado; (4) co-administrar un agente seleccionado del grupo formado por amilina/Pramlintide (SYMLIN™), exendina-4 (EXENATIDE™;

BYETTA™), Gastrina, Factor de crecimiento epidérmico y análogo del Factor de crecimiento epidérmico GIP, GLP-1, Agonistas del receptor GLP-1, Análogos GLP-1, INGAP, Liraglutide (NN2211), y un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV, que bloquea la degradación de GLP-1; y (5) reducir o retirar gradualmente la administración de otra
5 terapia para la diabetes.

[0017] En otra realización, se proveen métodos para tratar una patología asociada con la función pancreática deteriorada en un sujeto que necesita dicho tratamiento. El método puede comprender además la administración de los compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP Optimizado, el paso de administrar uno o más
10 agentes que inhiben, bloquean o destruyen las células autoinmunes dirigidas a los islotes pancreáticos. Dichas terapias son las denominadas “terapias inmunológicas” anteriormente. En varios aspectos de esta realización, los agentes que inhiben, bloquean o destruyen las células inmunes dirigidas a los islotes pancreáticos se seleccionan del grupo formado por los siguientes, administrados individualmente o combinados con otros. Anticuerpos anti
15 CD-3 incluyendo hOKT3γ1(Ala-Ala) (teplizumab); ChAglyCD3 que se dirige a la respuesta inmunológica y específicamente bloquea los linfocitos T que provocan la muerte de las células beta en la diabetes tipo 1; el antígeno 4 del linfocito T citotóxico, CLTA-4 Ig (Abatacept); Sirolimus (Rapamicina) solo o en combinación con Tacrolimus (FK506) o IL-2 (rapamune); Rapamune solo o en combinación con Proleuquina (aldesleuquina); una
20 proteína de choque térmico 60 (Diapep277); una vacuna elaborada con anti-ácido glutámico descarboxilasa anti-ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD65); la vacuna elaborada con células dendríticas, supresora de la diabetes, GSK189075, fármacos de diazoxida y estatina incluyendo atorvaestatina utilizada como un agente para preservar la función de las células beta, micofenolato mofetil solo o en combinación con Daclizumab;
25 el agente anti-CD20, Rituximab; Campath-1H (anticuerpo Anti-CD52), lisofilina; globulina anti-linfocito T policlonal (ATG/Timoglobulina), Factor de estimulación de colonias de granulocitos, Neulasta (Pegfilgrastim), Vitamina D, ambos suplementos: 25 hidrox y 1,25 hidroxivitamina D; vacuna IBC-VSO, que es una forma sintética metabólicamente inactiva de la insulina diseñada para impedir la destrucción de células beta pancreáticas, interferón
30 alfa; una vacuna que utiliza células T reguladoras antígeno CD4⁺CD25⁺ específicas o cualquier agente o agentes diseñado para suprimir el ataque inmunológico contra las

células beta dentro de los islotes de Langerhans, Prochymal (Células madre humanas adultas), el antiinflamatorio Anakinra y el agente antiinflamatorio, Deoxispergualina, un agente antiinflamatorio que bloquea la producción de citoquina proinflamatoria e inhibe las células T y las células B. Se puede utilizar estos agentes o agentes similares en las terapias de combinación que utilizan células T reguladoras ya sea directamente o a través del uso de la inmunoterapia para detener la destrucción de las células que producen insulina.

[0018] En otra realización, se proveen métodos para tratar una patología asociada con la función pancreática deteriorada en un sujeto que necesita dicho tratamiento donde, al menos, se trata o reduce un síntoma de la patología asociada con la función pancreática deteriorada como resultado de la administración de los compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP Optimizado. En un aspecto de esta realización, el síntoma se selecciona entre: niveles bajos de insulina o de actividad de la insulina, resistencia a la insulina, hiperglucemia, nivel de hemoglobina A1C superior a 6,0%, micción frecuente, sed excesiva, hambre extremo, pérdida o ganancia de peso inusual, estar excedido de peso, fatiga aumentada, irritabilidad, visión borrosa, comezón genital, molestias extrañas y dolores, boca seca, piel seca o picor en la piel, impotencia, infecciones vaginales por hongos, curación deficiente de cortes y raspaduras, infecciones excesivas o inusuales, pérdida o empeoramiento del control glucémico, fluctuaciones de la glucosa en sangre, fluctuaciones de glucagón en sangre, y fluctuaciones de triglicéridos en sangre, con hiperglucemia que produce, en última instancia, complicaciones microvasculares y macrovasculares, que incluyen síntomas visuales que producen ceguera, deterioro acelerado del riñón que puede producir falla renal que necesita diálisis y transplante de riñón y neuropatías que producen úlceras y amputaciones del pie. Además, recientes estudios han demostrado la reducción del riesgo tanto microvascular y macrovascular como cardiovascular entre pacientes con diabetes tipo 1 que han mejorado el control glucémico.

[0019] En otra realización, se proveen métodos para tratar una patología asociada con la función pancreática deteriorada en un sujeto que necesita dicho tratamiento. La patología asociada con la función pancreática deteriorada es cualquiera perteneciente a la diabetes tipo 1, nuevo inicio de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes autoinmune latente de adultez, pre-diabetes, glucemia basal alterada, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico/síndrome dismetabólico, estar con

sobrepeso, obesidad, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, trastornos de la alimentación, ciclos anovulatorios y síndrome de ovario poliquístico.

[0020] Las realizaciones de la invención también proveen anticuerpos que se acoplan selectivamente a compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP Optimizado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en los métodos para diagnóstico provistos aquí, cuyos métodos comprenden detectar los niveles del HIP Optimizado en suero o tejido de un mamífero. En una realización el método para diagnóstico se utiliza para monitorear el tratamiento con HIP Optimizado para asegurarse de que se están logrando niveles terapéuticamente eficaces en un paciente que está recibiendo dicha terapia.

[0021] Las realizaciones de la invención también proveen kits para tratar un paciente que padece diabetes tipo 1 o 2 u otra condición en la que los niveles de insulina sean aberrantes, perturbación en el metabolismo o resistencia a la insulina, que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP Optimizado y, opcionalmente, al menos un agente para estimular los receptores GLP-1 o aumentar los niveles de GLP-1, promover la regeneración de las células beta, saciedad aumentada, ingesta menor de comida y pérdida de peso, tanto en el mismo envase como en envases separados, y las instrucciones de uso. Otras realizaciones proveen un kit para medir los compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo los niveles del HIP Optimizado en una muestra, el kit comprende un anticuerpo del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo un anticuerpo específico del HIP Optimizado y, opcionalmente, compuestos del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo al HIP Optimizado y, opcionalmente, un medio de marcación.

25 H. Descripción de los dibujos

[0022] El archivo de esta patente contiene al menos una fotografía o dibujo realizado en color. Las copias de esta patente con dibujo(s) o fotografía(s) en color serán provistas por la Oficina de Patentes y Marcas a pedido y previo pago de la tasa necesaria.

[0023] Para una comprensión más completa de la naturaleza y ventajas de la presente invención, debe referirse a la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos que la acompañan donde:

[0024] La Fig. 1 es un gráfico que muestra los niveles de insulina después de incubar en un cultivo con tejido ductal pancreático humano con HIP1, HIP2 y HIP3.

[0025] La Fig. 2 es un gráfico que muestra los requerimientos de la insulina en ratones tratados con HIP1, HIP2 y HIP3.

5 [0026] La Fig. 3 es un gráfico que muestra la reducción media de glucosa basal en ratones tratados con HIP1, HIP2 y HIP3.

[0027] La Fig. 4A es un gráfico que muestra la cantidad de islotes en ratones tratados con HIP2 y HIP3. La Fig. 4B provee imágenes representativas de inmunomarcado contra insulina en ratones tratados con placebo y con HIP y los islotes marcados contra
10 insulina se remarcan en amarillo para diferenciar estas estructuras de las de las células sanguíneas autofluorescentes. Escala = 50 μm en todas las imágenes.

[0028] La Fig. 5 es un marcado inmunofluorescente para insulina en tejido pancreático de ratón tratado con HIP.

[0029] La Fig. 6 es un gráfico que muestra la vida media de HIP administrada
15 intramuscularmente a ratas.

[0030] La Fig. 7 es un gráfico que muestra la vida media de HIP administrada subcutáneamente a ratas.

[0031] La Fig. 8 es un gráfico que muestra la estabilidad *in vitro* de HIP 2 y HIP 2B en plasma en el transcurso del tiempo.

20 [0032] La Fig. 9A es un análisis Western Blot que muestra la expresión de la insulina humana de células PANC-1 en condiciones reductoras y no reductoras como respuesta a la incubación con varios HIP y HIP Optimizados. La Fig. 9B son Tinciones Ponceau en condiciones reductoras y no reductoras en respuesta a la incubación con varios HIP y HIP Optimizados.

25 [0033] La Fig. 10A muestra células PANC-1 tratadas con péptidos HIP2, y HIP Optimizado durante cuatro días, mediante fotos tomadas en el día 7 con una magnificación de 200X. La Fig. 10B muestra la progresión de los cambios de morfología de la célula PANC-1 durante 7 días (control, HIP2 y HIP2B), mediante fotos tomadas en los días 1, 2, 3, 5 y 7 con una magnificación de 200X. La Fig. 10C muestra los cambios morfológicos
30 progresivos de las células PANC-1 tratadas con control y HIP Optimizados (HIP2 Dímero y HIP2 PEG).

[0034] La Fig. 11 es un manchado para CK19 y DAPI para mostrar núcleos e insulina en células pancreáticas humanas luego de la administración de HIP2B.

[0035] La Fig. 12 es un gráfico que ilustra los niveles de glucosa de tres ratones NOD después del tratamiento con placebo y lisofilina (LSF), HIP 2 y LSF, y HIP2B y LSF.

5 [0036] La Fig. 13 es una doble tinción inmunohistoquímica de anticuerpo de células PANC-1 después del tratamiento con 150μM HIP y péptidos HIP Optimizado durante 48 horas, demostrando la translocación del receptor HIP de la membrana celular de las células PANC-1 hacia el citoplasma luego de la estimulación con HIP y HIP Optimizado.

10 [0037] La Fig. 14 muestra las células PANC-1 con exposición ajustada en SFM y TSFM con los péptidos HIP y HIP Optimizado2B.

[0038] La Fig. 15 muestra la evaluación de repetición del impacto de los péptidos HIP2 Optimizados en células PANC-1 utilizando análisis inmunofluorescentes indicando que HIP2B interactúa con el receptor HIP (EXTL), resultando en la inmersión del receptor
15 HIP de la membrana citoplasmática dentro del citoplasma hacia el núcleo luego de la estimulación con HIP.

[0039] La Fig. 16 muestra un Western Blot de HIP Optimizado2B aumenta el tiempo de traslocación del HIP receptor (EXTL3) desde la membrana citoplasmática hasta el núcleo en células PANC-1.

20 [0040] La Fig. 17 es un gráfico que muestra los niveles de glucosa diarios promedio en un Modelo de Ratón con diabetes inducida por STZ luego de la administración de HIP2, HIP2B y placebo.

[0041] La Fig. 18 es un gráfico que muestra los niveles de glucosa diarios entre los grupos de ratones tratados con HIP2B (verde) y de control (púrpura) y con placebo.

25 [0042] La Fig. 19 es un gráfico que muestra los niveles de glucosa entre los grupos de ratones HIP2B (amarillo), HIP2 (verde) y de control (azul) al principio y al final de la intervención.

[0043] La Figura 20, muestra el impacto de HIP2B Optimizado que restaura los niveles de glucosa en ayunas a rangos no diabéticos y a niveles por debajo de los niveles de
30 glucosa basal antes del tratamiento con STZ.

[0044] La Figura 21 muestra los resultados de las pruebas de tolerancia a la glucosa entre grupos de tratamiento al cierre del estudio con niveles de glucosa menores observados en el grupo de tratamiento con HIP2B Optimizado.

[0045] La Figura 22 muestra un estudio de respuesta a la dosis de HIP2B Optimizado en ratones con diabetes inducida por STZ para comparar los efectos de HIP2B Optimizado sobre el control de glucosa, cuando se administra en diferentes dosificaciones a un modelo de ratón diabético, para determinar la dosificación potencial menor que produce la máxima eficacia.

[0046] La Figura 23 ilustra el impacto de diferentes concentraciones de HIP2B sobre la atenuación de la diabetes.

[0047] La Figura 24 muestra el análisis farmacocinético de HIP2B, HIP2 e INGAP luego de la administración subcutánea e intravenosa en ratas Sprague Dawley a 4mg/kg.

[0048] La Fig. 25 muestra el análisis farmacocinético de HIP2B Optimizado administrado subcutáneamente.

I. Descripción detallada

[0049] Antes de describir las composiciones y métodos presentes, debe entenderse que esta invención no está limitada a los procesos, composiciones o metodologías particulares descriptas ya que éstas pueden variar. También, debe comprenderse que la terminología utilizada en la descripción tiene la finalidad de describir sólo versiones y realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que está sólo limitada por las reivindicaciones anexadas. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí, tienen los mismos significados comúnmente entendidos por el experto en el arte. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descriptos aquí pueden utilizarse en la práctica o ensayo de las realizaciones de la presente invención, a continuación se describirán los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad. Nada de lo mencionado debe considerarse como la aceptación de que la invención no está autorizada a anteceder dicha descripción en virtud de invención previa.

[0050] Desde 1922, la insulina ha sido la terapia primaria, si no la única terapia disponible, para el tratamiento de la diabetes tipo 1 y de otras condiciones relacionadas con

la pérdida de o eficacia o producción disminuida de insulina. Sin embargo, los pacientes diabéticos no tienen un metabolismo normal de glucosa debido a que la insulina es sólo parte de la función pancreática faltante o aberrante.

[0051] Hasta ahora, no ha habido terapia simple o combinada que haya sido
5 utilizada exitosamente para tratar los mecanismos de la enfermedad subyacente de tanto la diabetes tipo 1 como la diabetes tipo 2. El desarrollo de un tratamiento exitoso que estimule la regeneración de células que producen insulina dentro del páncreas representará un gran avance en un tratamiento significativo para pacientes con diabetes. Cierta literatura que induce a error utiliza el término “células del islote” para referirse a las células beta o a los
10 islotes completos. Sin embargo, es importante distinguir entre células beta e islotes ya que algunas alternativas de tratamiento buscan aumentar la cantidad de células beta, mientras que no ha habido tratamiento disponible para reemplazar, de manera endógena, los islotes completos que no fuera transplante de islote.

[0052] A pesar de las décadas de la investigación y advenimiento del transplante de
15 islote pancreático en 1974 y reivindicaciones de éxito más nuevas que resultan del Protocolo de Edmonton para el transplante de islote, estos enfoques no han sido muy exitosos en los Estados Unidos. Por ejemplo, a los cuatro años después del transplante, menos del 10 % de los pacientes que han recibido transplante de islote permanecen independientes de la insulina. Además, existe una tasa del 18% de efectos secundarios
20 serios. Está bien determinado que al inicio de la diabetes tipo 1, los pacientes ya han perdido la mayoría de sus islotes y la cantidad de islotes continúa declinando constantemente. Sin embargo, estudios más recientes han descubierto que, al momento del diagnóstico de la diabetes tipo 2, los pacientes exhiben una pérdida de, al menos, el 50% de la masa y cantidad de islotes. Como sucede con los pacientes del tipo 1, la cantidad y masa
25 de islotes continúa declinando, no por el ataque autoinmune sino debido a que las células beta efectivamente se “queman”. Aunque esta declinación ocurre más rápidamente en pacientes del tipo 1, aun existe una declinación del 10-20 % por año entre los pacientes del tipo 2.

[0053] En el páncreas que funciona normalmente, pequeñas cantidades de islotes
30 mueren naturalmente en forma gradual y son reemplazados según se requiere mantener bajo control los niveles de glucosa. En promedio, este proceso regenerativo conocido como

neogénesis de islote reemplaza los islotes a razón de aproximadamente el 2% por mes. En pacientes no diabéticos, la masa de células beta dentro de los islotes existentes puede expandirse o contraerse según las necesidades de insulina del individuo. Este proceso se denominado “proliferación de células beta” no ocurre en pacientes con diabetes tipo 1 y es limitado en pacientes con diabetes tipo 2.

[0054] No es nuevo el estudio de neogénesis de islote. En 1920, se informó que una piedra pancreática obstructiva producía atrofia en la mayoría de los páncreas pero también un aumento en los islotes. Luego se elaboró la hipótesis de que ligando (acoplando) los ductos pancreáticos se podría llegar la identificación de una sustancia que podría ser útil para el tratamiento de la diabetes. Cirujanos ligaron los ductos pancreáticos de niños diabéticos con la esperanza de producir sustancias que pudieran formar nuevos islotes. Aunque los efectos positivos de estos procedimientos duraron poco tiempo, demostraron el potencial que tiene el hombre para la restauración de islotes.

[0055] Los estudios de la ligadura ductal pancreática que pretendieron crear un modelo de hámster para la pancreatitis resultaron en la formación de muchos islotes nuevos. Esta investigación condujo al aislamiento del péptido en hámster referido como Péptido asociado a la Neogénesis del islote, o INGAP. En el desarrollo clínico del INGAP, además se demostró que podían diferenciarse nuevos islotes humanos de las células progenitoras de islote tipo célula madre que residen en todo el páncreas adulto, incluso décadas antes del inicio de la diabetes tipo 1.

[0056] Independientemente del concepto de usar la ligadura ductal para producir nuevos islotes, se investigó la regeneración potencial de islotes durante el embarazo. Se ha informado sobre islotes formados en la embriogénesis tardía y se afirmó que la población de islotes continúa creciendo luego del nacimiento mediante un proceso de metamorfosis desde el tejido ductal que los rodea.

[0057] La forma primaria en la que los pacientes con diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2 en etapa tardía manejan su enfermedad, es la administración de insulina, ya sea mediante inyección subcutánea o mediante el uso de infusión subcutánea por bomba. Además de las obvias desventajas en el estilo de vida, la terapia con insulina no logra los mecanismos de control normales del cuerpo y, por lo tanto, no maneja completamente las fluctuaciones de la glucosa. Como se muestra en el cuadro anexo, incluso los pacientes diabéticos del tipo 1

mejor controlados, no tienen ni remotamente un metabolismo normal de la glucosa. Esto se debe a que la secreción de insulina es sólo una parte de la función pancreática faltante.

[0058] Investigadores han evaluado si la producción endógena de insulina puede ser estimulada mediante el tratamiento con un fármaco. Por ejemplo, durante varias décadas pasadas, se han estudiado varias terapias en las que se administra a pacientes diabéticos, un péptido involucrado en el metabolismo de la insulina o análogos de dichos péptidos. Estas terapias incluyen la administración de péptidos con secuencias de aminoácido similares a las del Péptido-1 tipo Glucagón (GLP-1), y dichos péptidos incluyen: análogos del receptor GLP-1, Exendina-4, Exenatide/BYETTA™, que se deriva de Gila Monster, Januvia™, Péptido inhibidor gástrico/Polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP), compuestos homólogos a GLP-1, por ejemplo, Liraglutide (NN2211), Inhibidores de la dipeptidil peptidasa, que inhiben la rotura de GLP-1, Gastrina, Factor de crecimiento epidérmico y análogos del Factor de crecimiento epidérmico, y péptido asociado a la neogénesis de islote derivado de hámster (INGAP).

[0059] Ninguno de estos tratamientos han demostrado ser eficaces para revertir los mecanismos subyacentes de la diabetes. La generación de nuevos islotes no sólo forma células beta que producen insulina, también forma las otras células involucradas en el metabolismo de la glucosa. Consecuentemente, si se generan islotes nuevos suficientes, el paciente es capaz, en última instancia, de recuperar el control glucémico. Por lo tanto, la neogénesis de islotes presenta la posibilidad de, no sólo tratar la enfermedad, sino realmente revertir la diabetes.

[0060] Para que cualquier agente para la neogénesis de célula de islote sea eficaz, el páncreas debe ser “elástico” con respecto a su capacidad para generar nuevas células de islote. La prueba de la elasticidad del páncreas con respecto a la generación de nuevos islotes pancreáticos durante el transcurso de la vida en respuesta a la muerte o apoptosis de islotes pancreáticos, ha reemplazado el concepto largamente mantenido de que la cantidad de insulina que produce las estructuras de islote se fija al nacer y se mantiene a lo largo de la vida, en tanto que se ha establecido la plasticidad y capacidad de las células beta para proliferar dentro de los islotes existentes. Actualmente se acepta que la neogénesis de islotes pancreáticos ocurre a partir de células pancreáticas preexistentes a través de la diferenciación de células progenitoras que se hallan entre ambas fracciones del páncreas, la

endocrina y la exócrina. Los datos demuestran que, incluso décadas después del inicio de la diabetes tipo 1, se pueden regenerar los islotes pancreáticos.

[0061] Por ejemplo, los pacientes que padecen diabetes tipo 1 son capaces de tener niveles normales del péptido C durante el embarazo. Varios equipos han encontrado un incremento paradójico en los niveles del péptido C dentro del rango normal durante el primer trimestre del embarazo, en un grado tan elevado como un tercio de todas las pacientes embarazadas que padecen diabetes tipo 1. Este incremento del péptido C está acompañado por una reducción significativa en los requerimientos de insulina en algunos pacientes capaces de discontinuar transitoriamente la administración de insulina durante el primer trimestre del embarazo. Este aumento de péptido C durante el embarazo que ocurre dentro de las 10 semanas de gestación entre los pacientes, a pesar de no presentar péptido C mensurable antes del embarazo, implica la restauración del funcionamiento de las estructuras del islote. La hipótesis es que la neogénesis de islotes que ocurre durante el embarazo resulta del incremento concomitante en la producción de esteroides endógenos y la regulación descendente del sistema inmunológico previene un ataque inmunológico al feto que, de la misma manera, tiene una función en la supresión del ataque de linfocitos en los islotes. Junto con la supresión inmunológica, también se especula que existe una regulación ascendente de los factores promotores del crecimiento de islotes maternos durante el embarazo para compensar la disminución del punto de referencia de la glucosa materna en el embarazo. Los modelos animales también han demostrado que la neogénesis de islotes precede al desarrollo de la expansión de célula beta durante el embarazo y se ha demostrado que las células progenitoras pancreáticas humanas se diferencian en islotes. De manera similar, se ha observado que los pacientes que han estado inmunodeprimidos durante un tiempo prologado debido al trasplante de riñón, regeneran los islotes que producen insulina.

[0062] Durante la década pasada, se realizaron pruebas clínicas para evaluar el impacto que produce una cantidad de moduladores inmunológicos que pueden detener la destrucción de las células beta del páncreas. Los anticuerpos anti CD-3 como por ejemplo, hOKT3γ1(Ala-Ala) y ChAglyCD3 que dirigen la respuesta inmunológica y bloquean específicamente los linfocitos T que producen la muerte de la célula beta en diabetes tipo 1, han sido utilizados para esta finalidad, así como también los tratamientos que incluyen la

administración de Sirolimus (Rapamicina), Tacrolimus (FK506), a proteína de choque
 térmico 60 (DIAPEP277TM), una vacuna preparada con anti-ácido glutámico decarboxilasa
 65 (GAD65), Micofenolato Mofetil solo o en combinación con Daclizumab, el agente anti-
 CD20, globulina anti-linfocito T policlonal (ATG), lisofilina, Rituximab, Campath-1H
 5 (anticuerpo Anti-CD52), Vitamina D, vacuna de IBC-VSO, que es una forma de insulina
 metabólicamente inactiva diseñada para prevenir la destrucción de la célula beta
 pancreática, y vacunación con interferón- α usando las células T reguladoras específicas del
 antígeno CD4⁺CD25⁺. Estos enfoques terapéuticos pretenden utilizar las células T
 reguladoras tanto directamente o mediante el uso de inmunoterapia para detener la
 10 destrucción de las células que producen insulina. El objetivo de estos ensayos es determinar
 la capacidad que tienen dichos agentes de conservar la función del islote mediante la
 prevención de un ataque inmunológico de las células beta de los islotes del páncreas.

[0063] Además, estudios recientes han descubierto que la vitamina D puede tener
 una función moduladora inmunológica importante en la prevención de la diabetes tipo 1.
 15 Hasta el 54,7 % de las poblaciones de los Estados Unidos, sin tener en cuenta la latitud,
 tienen niveles bajos de 25 hidroxivitamina D. Se ha demostrado que la deficiencia de
 Vitamina D no sólo se la asocia con el riesgo aumentado de contraer diabetes tipo 1 y se la
 observa al inicio del diagnóstico de la diabetes tipo 1, sino que también se observa
 comúnmente entre pacientes con ambas diabetes, tipo 1 y 2. Se recomienda mantener los
 20 niveles por encima de 40 ng/ml para sostener la función inmunológica normal. No se han
 observado efectos adversos con dosis de hasta 10.000 UI/día.

[0064] Se proveen las siguientes definiciones para ayudar al lector. A menos que
 se defina de otro modo, todos los términos del arte, notaciones y otros términos o
 terminología científica o médica utilizada aquí, pretende incluir los significados
 25 comúnmente entendidos por el experto en el arte de la química y medicina. En algunos
 casos, los términos con significados comúnmente conocidos son definidos aquí por razones
 de claridad y/o para una referencia rápida, y la inclusión de dichas definiciones no deben
 ser consideradas como representativas de una diferencia sustancial con respecto a la
 definición del término tal como se lo comprende generalmente en el arte.

30 [0065] También cabe destacara que, como se usa aquí y en las reivindicaciones
 anexas, las formas singulares “un” y “el” incluyen a la referencia plural a menos que el

contexto claramente determine de otro modo. De esta forma, por ejemplo, la referencia a “fibroblasto” es una referencia a uno o más fibroblastos y sus equivalentes conocidos por el experto en el arte.

[0066] Como se utiliza aquí, el término “alrededor de” se refiere a más o menos 10% del valor numérico del número con el que se está utilizando. Por lo tanto alrededor del 50% significa un rango entre el 45% y 55%.

Como se usa aquí, “péptido ProIslet” se refiere a proteínas o péptidos derivados de dichas proteínas que estimulan la neogénesis de célula de islote, incluyendo, pero sin limitarse a REG3A humano (NR ID DE SEC: 1), REG3G humano (NR ID DE SEC: 28), REG1A humano, REG1B humano, REG4 humano, INGAP en hámster (NR ID DE SEC: 27), REG2 en hámster, REG3G en hámster, REG1 en rata, PAP/REG3B en rata, PAP3 en rata, REG3G en rata, REG1 en ratón, REG2 en ratón, REG3A en ratón, REG3B en ratón, REG3G en ratón, REG3S en ratón, REG4 en ratón, PTP bovino, análogos y homólogos de dichas proteínas en chimpancé, vaca, perro, oveja y, fragmentos de péptidos derivados de dichas proteínas u homólogos de los mismos. Las secuencias de proteína de dichos péptidos ProIslet están disponibles al público. Los péptidos ProIslet además incluyen péptidos que son fragmentos de REG3A, INGAP o proteínas homólogas que contienen a la secuencia activa de catorce aminoácidos de HIP2 (o la secuencias correspondiente para cada homólogo) (véase la Tabla 1, abajo) y constituyen menos de 150 aminoácidos, menos de 125 aminoácidos, menos de 100 aminoácidos, menos de 75 aminoácidos, menos de 50 aminoácidos o menos de 25 aminoácidos. Ejemplos de dichos péptidos (que proveen la secuencia activa de catorce aminoácidos) incluyen, pero no están limitados a los siguientes:

Tabla 1

REG3A humano		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G		NR ID DE SEC: 4
Chimp		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		NR ID DE SEC: 60
INGAP hámster		I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G		NR ID DE SEC: 61
REG3A ratón		I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		NR ID DE SEC: 62
REG3 Rata de noruega		I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		NR ID DE SEC: 63
Vaca		I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A		NR ID DE SEC: 64
Perro		M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A		NR ID DE

oveja		I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A		SEC: 65 NR ID DE
REG1A humano		I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W		SEC: 66 NR ID DE
REG1B humano		I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W		SEC: 67 NR ID DE
REG1 rata		I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	W	H	W		SEC: 68 NR ID DE
REG1 ratón		T	G	L	H	D	P	K	R	N	R	R	W	H	W		SEC: 69 NR ID DE
REG2 ratón		T	G	L	H	D	P	K	S	N	R	R	W	H	W		SEC: 70 NR ID DE
REG2 hámster		I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	W	H	W		SEC: 71 NR ID DE
REG3 rata		I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		SEC: 72 NR ID DE
PAP/REG3B rata		I	G	L	H	D	P	T	L	G	G	E	P	N	G		SEC: 73 NR ID DE
PAP3 rata		I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R		SEC: 74 NR ID DE
REG3A ratón		I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		SEC: 75 NR ID DE
REG3B ratón		I	G	L	H	D	P	T	L	G	A	E	P	N	G		SEC: 76 NR ID DE
REG3G ratón		I	G	L	H	D	P	T	L	G	Y	E	P	N	R		SEC: 77 NR ID DE
REG3G rata		I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R		SEC: 78 NR ID DE
REG3G hámster		I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	G		SEC: 79 NR ID DE
REG3G humano		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		SEC: 80 NR ID DE
REG3S ratón		I	G	L	H	D	L	S	L	G	S	L	P	N	E		SEC: 81 NR ID DE
PTP bovino		I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	A	N	A		SEC: 82 NR ID DE
INGAP hámster		I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G		SEC: 83 NR ID DE
REG4 humano		I	G	L	H	D	P	Q	K	R	Q	Q	W	Q	W		SEC: 84 NR ID DE
REG4 ratón		I	G	L	H	D	P	Q	K	K	Q	L	W	Q	W		SEC: 85 NR ID DE
Chimp		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G		SEC: 86 NR ID DE
Vaca		I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A		SEC: 87 NR ID DE
perro		M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A		SEC: 88 NR ID DE
oveja		I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A		SEC: 89 NR ID DE
																	SEC: 90

Dichos fragmentos de péptido incluyen, pero no están limitados a péptido HIP1, HIP2, HIP3, INGAP (NR ID DE SEC: 26), y sus homólogos, identificados abajo. Existe un

gen humano hallado en el hombre similar al gen de la rata que es denominado gen Reg, y es el gen sobre el cual se ha hallado HIP en humanos y una elevada homología entre especies del péptido ProIslet Humano y otras especies de mamíferos. El siguiente cuadro de homología de especies muestra que la secuencia relacionada HIP está exquisitamente conservada a través de la evolución. Es probable que cada una de estas secuencias tenga cierta eficacia en humanos, pero ninguna coincide exactamente con la secuencia activa humana de HIP.

Homología de especies

10

REG3A humano	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	E	NR ID DE
Chimp	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	G	SEC: 30
INGAP hámster	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	S	NR ID DE
REG3A ratón	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEC: 31
REG3 Rata de Noruega	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEC: 32
Vaca	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	G	NR ID DE
Perro	W	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	D	SEC: 33
Oveja	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	G	NR ID DE
																	SEC: 34
																	NR ID DE
																	SEC: 35
																	NR ID DE
																	SEC: 36
																	NR ID DE
																	SEC: 37

La tabla anterior compara un tramo de dieciséis aminoácidos de un péptido humano que contiene la secuencia de catorce aminoácidos HIP2 comparada con otras especies. .

REG3A humano	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	NR ID DE
Chimp	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEC: 3
INGAP hámster	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	NR ID DE
REG3A ratón	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEC: 38
REG3 Rata de Noruega	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	NR ID DE
Vaca	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	SEC: 39
Perro	W	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	NR ID DE
Oveja	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	SEC: 40
																NR ID DE
																SEC: 41
																NR ID DE
																SEC: 42
																NR ID DE
																SEC: 43
																NR ID DE

REG3A humano	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	SEC: 44
Chimp	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	NR ID DE SEC: 4
INGAP hámster	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	NR ID DE SEC: 45
REG3A ratón	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	NR ID DE SEC: 46
REG3 Rata de Noruega	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	NR ID DE SEC: 47
Vaca	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	NR ID DE SEC: 48
Perro	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	NR ID DE SEC: 49
Oveja	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	NR ID DE SEC: 50
REG3A humano	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	E NR ID DE SEC: 51
Chimp	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	G NR ID DE SEC: 2
INGAP Hámster	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	S NR ID DE SEC: 52
REG3A Ratón	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G NR ID DE SEC: 27
REG3 Rata de Noruega	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G NR ID DE SEC: 53
Vaca	I	G	L	H	D	P	T	E		S	E	P	D	A	G NR ID DE SEC: 54
Perro	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	D NR ID DE SEC: 55
Oveja	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	G NR ID DE SEC: 56
															NR ID DE SEC: 57

[0067] Como se usa aquí, “Péptido ProIslet Optimizado” se refiere a variaciones de un péptido ProIslet, incluyendo pero sin limitarse a, REG3A humano, REG3G humano, REG1A humano, REG1B humano, REG4 humano, INGAP en hámster, REG2 en hámster, REG3G en hámster, REG1 en rata, PAP/REG3B en rata, PAP3 en rata, REG3G en rata, REG1 en ratón, REG2 en ratón, REG3A en ratón, REG3B en ratón, REG3G en ratón, REG3S en ratón, REG4 en ratón, PTP bovino, chimpancé, vaca, perro, oveja y análogos y homólogos de dichas proteínas, y fragmentos de péptidos derivados de dichas proteínas u homólogos de los mismos, HIP1, HIP2 y/o HIP3 u homólogos de dichos péptidos (NRS ID de SEC: 31-90), donde el péptido ha sido modificados para aumentar la estabilidad, solubilidad o biodisponibilidad de dichos péptidos como se describe en varias realizaciones. Para la finalidad de esta descripción, estabilidad se refiere a la resistencia

que tiene el péptido a la degradación por parte de las proteasas en suero que se dirigen y degradan los péptidos ProIslet no Optimizados, REG3A, REG3G, INGAP, Péptido REG3G, Péptido INGAP, HIP1, HIP2 y/o HIP3 u homólogos de dichos péptidos. Además, para la finalidad de esta descripción, biodisponibilidad se refiere a la cantidad de péptido disponible para uso terapéutico *in vivo* mediante el uso de células blanco, vías y/o mecanismos sistémicos basados en la capacidad que tiene el péptido de evitar la degradación por parte de las proteasas y otras vías sistémicas que degradaban a los péptidos no-ProIslet Optimizados, REG3A humano, REG3G humano, REG1A humano, REG1B humano, REG4 humano, INGAP en hámster, REG2 en hámster, REG3G en hámster, REG1 en rata, PAP/REG3B en rata, PAP3 en rata, REG3G en rata, REG1 en ratón, REG2 en ratón, REG3A en ratón, REG3B en ratón, REG3G en ratón, REG3S en ratón, REG4 en ratón, PTP bovino, chimpancé, vaca, perro, oveja y análogos y homólogos de dichas proteínas, HIP1, HIP2 y/o HIP3 u homólogos de dichos péptidos. Preferentemente, los péptidos ProIslet Optimizados se refieren al Péptido REG3G, Péptido INGAP, HIP3, HIP 1 y/o HIP 2 u homólogos que están bloqueados por el agregado de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal, pegilado, y una combinación de los mismos.

[0068] Como se utiliza aquí, "HIP Optimizado" se refiere a variaciones de HIP, HIP1 y/o HIP2 donde el péptido ha sido modificado para aumentar la estabilidad, solubilidad o biodisponibilidad de HIP, HIP1 o HIP2, como se describe en las realizaciones presentadas aquí. Para la finalidad de esta descripción, estabilidad se refiere a la resistencia que tiene el péptido a la degradación por parte de las proteasas en suero que se dirigen y degradan a los compuestos HIP3, HIP1 y/o HIP2 no Optimizado. Además, para la finalidad de esta descripción, biodisponibilidad se refiere a la cantidad de péptido disponible para uso terapéutico *in vivo* por parte de las células blanco, vías y/o mecanismos sistémicos basados en la capacidad que tiene el péptido de evitar la degradación por parte de las proteasas y otras vías sistémicas que degradan al compuesto HIP3, HIP1 y/o HIP2 no Optimizado. Preferentemente, HIP Optimizado se refiere a HIP3, HIP 1 y/o HIP 2 que son bloqueados mediante el agregado de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal, pegilado, y una combinación de los mismos.

[0069] Como se utiliza aquí, "tratar" una condición o paciente se refiere a tomar pasos para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para

la finalidad de esta descripción, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen pero no se limitan a, el alivio o mejora de uno o más síntomas de la diabetes, la disminución del grado de enfermedad, retraso o disminución de la progresión de la enfermedad, mejora, alivio o estabilización del estado de enfermedad y otros resultados beneficiosos descriptos más adelante. Los síntomas de la diabetes incluyen, niveles bajos o inadecuados de insulina o actividad de la insulina, micción frecuente, sed excesiva, hambre extremo, pérdida de peso inusual, fatiga aumentada, irritabilidad, visión borrosa, comezón genital, molestias extrañas y dolores, boca seca, piel seca o picor en la piel, impotencia, infecciones vaginales por hongos, curación deficiente de cortes y raspaduras, infecciones excesivas o inusuales, hiperglucemia, pérdida del control glucémico, fluctuaciones en la glucosa sanguínea postprandial, fluctuaciones de glucagón en sangre, fluctuaciones de triglicéridos en sangre. Se puede diagnosticar la diabetes mediante métodos bien conocidos por el experto en el arte. Por ejemplo, comúnmente, los diabéticos tienen un resultado de glucosa plasmática en sangre superior a 126 mg/dL de glucosa. La prediabetes, que puede además tratarse con las composiciones y métodos descriptos aquí, comúnmente se diagnostica en pacientes con un nivel de glucosa en sangre entre 100 y 125 mg/dL de glucosa. Además, pueden utilizarse otros síntomas para diagnosticar diabetes, enfermedades y condiciones relacionadas y enfermedades y condiciones afectadas por una función pancreática disminuida.

[0070] Como se utiliza aquí, "reducción" de un síntoma o síntomas (y equivalentes gramaticales de esta frase) significa la disminución de la severidad o frecuencia de el(los) síntoma(s), o eliminación de el(los) síntoma(s).

[0071] El término "inhibir" incluye la administración de un compuesto de la presente descripción para impedir el inicio de los síntomas, aliviar los síntomas o eliminar la enfermedad, condición o trastorno.

[0072] Como se utiliza aquí, una "patología asociada con la función pancreática deteriorada" es aquella patología asociada con una capacidad disminuida que tiene el páncreas del sujeto para producir y/o secretar hormonas y/o citoquinas. Preferentemente, esta hormona o citoquina es la insulina. Las patologías que están asociadas con una función pancreática deteriorada incluyen, diabetes tipo 1, nuevo inicio de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes autoinmune latente de adultez, prediabetes, glucemia basal alterada, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico,

estar con sobrepeso, obesidad, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, trastornos de la alimentación y síndrome de ovario poliquístico.

[0073] Como se utiliza aquí, "administrar" o "la administración de" un fármaco o terapéutico a un sujeto (y equivalentes gramaticales de esta frase) incluyen tanto la
 5 administración directa incluyendo la autoadministración directamente dentro o en un tejido blanco, o la administración de un compuesto terapéutico a un sujeto, donde dicho compuesto terapéutico impacta positivamente sobre el tejido al que se dirige, y la administración indirecta, incluyendo el acto de prescribir un fármaco. Por ejemplo, como se utiliza aquí, un medico que instruye a un paciente a autoadministrarse un fármaco y/o
 10 provee a un paciente la prescripción de un fármaco, está administrando el fármaco al paciente.

[0074] Como se utiliza aquí, a "sujeto" o "paciente" es un mamífero, típicamente un humano, pero opcionalmente un animal mamífero de importancia veterinaria, incluyendo sin limitarse; caballos, ganado, oveja, perros, y gatos.

15 [0075] Como se utiliza aquí, una "manifestación" de una enfermedad se refiere a un síntoma, signo, estado anatómico (por ejemplo, falta de células de islote), estado fisiológico (por ejemplo, nivel de glucosa) o un informe (por ejemplo, nivel de triglicéridos) característicos de un sujeto que padece la enfermedad.

[0076] Como se utiliza aquí, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco
 20 o agente es una cantidad de un fármaco o agente que, cuando se administra a un sujeto con una enfermedad o condición, obtendrá el efecto terapéutico pretendido, por ejemplo, alivio, mejora, disminución o eliminación de una o más manifestaciones de la enfermedad o condición del sujeto. El efecto terapéutico completo no ocurre necesariamente por la administración de una dosis y puede ocurrir después de la administración de una serie de
 25 dosis. De esta manera, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones.

[0077] Como se utiliza aquí, una "cantidad profilácticamente eficaz" de un fármaco es una cantidad de fármaco que, cuando se administra a un sujeto, obtendrá el efecto profiláctico pretendido, por ejemplo, prevenir o retardar el inicio (o recurrencia) de una
 30 enfermedad o síntomas. El efecto profiláctico completo no ocurre necesariamente por la administración de una dosis y puede ocurrir sólo después de la administración de una serie

de dosis. De esta forma, una cantidad profilácticamente eficaz puede administrarse en una o más administraciones.

5 [0078] Por "farmacéuticamente aceptable", se entiende que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no deben ser perjudiciales para el receptor.

[0079] Como se utiliza aquí, "TID", "QD" y "QHS" tienen sus significados normales de "tres veces al día", "una vez al día" y "una vez antes de dormir", respectivamente.

10 [0080] La administración de un agente "en combinación con" incluye la administración paralela (administración de ambos agentes al paciente durante un período de tiempo, como por ejemplo, la administración de un anticuerpo monoclonal y una hormona peptídica como la hormona incretina o su análogo en días alternados durante un mes), la coadministración (donde los agentes se administran aproximadamente al mismo tiempo, por ejemplo, dentro de alrededor de pocos minutos u horas entre sí) y la
15 coformulación (donde los agentes se combinan o forman un compuesto en una sola dosificación adecuada para la administración oral, subcutánea o parenteral).

[0081] "Inhibidores DPP-4" son inhibidores de la dipeptidil peptidasa.

[0082] "INGAP en hámster" es la neogénesis de islote no humano asociada al péptido que tiene la secuencia Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (NR ID DE SEC: 26). Este péptido es un fragmento de la proteína INGAP en
20 hámster que tiene la secuencia Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (NR ID DE SEC: 27).

[0083] "GIP" es un Péptido inhibidor gástrico, conocido además como Polipéptido insulino-trópico dependiente de la glucosa.

25 [0084] "GLP-1" es el péptido 1 tipo Glucagón.

[0085] "HIP3" (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu (NR ID DE SEC: 2)) es un péptido ProIslet humano en forma purificada, sintética o recombinante. HIP3 tiene un peso molecular de alrededor de 1564,6.

[0086] "HIP1" (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly
30 (NR ID DE SEC: 3)) es un Péptido ProIslet Humano en forma purificada, sintética o recombinante.

[0087] “HIP2” (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly (NR ID DE SEC: 4)) es un Péptido ProIslet Humano en forma purificada, sintética o recombinante. HIP2 tiene un peso molecular de alrededor de 1435,5.

[0088] HIP3Blocked o HIP3B (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-NH₂) (NR ID DE SEC: 5)) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. HIPB tiene un peso molecular de alrededor de 1605,7.

[0089] HIP1Blocked (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH₂) (NR ID DE SEC: 6)) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante.

[0090] HIP2Blocked o HIP2B (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH₂) (NR ID DE SEC: 7)) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. HIP2B tiene un peso molecular de alrededor de 1476,6.

[0091] Péptido INGAPBlocked o INGAPB es un Péptido INGAP que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante.

[0092] HIP3Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys) (NR ID DE SEC: 8)) es un Péptido ProIslet Humano que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional, en forma purificada, sintética o recombinante.

[0093] HIP1Cys (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (NR ID DE SEC: 9)) es un Péptido ProIslet Humano que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional, en forma purificada, sintética o recombinante.

[0094] HIP2Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (NR ID DE SEC: 10)) es un Péptido ProIslet Humano que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional, en forma purificada, sintética o recombinante.

[0095] Péptido INGAPCys o INGAPCys es un Péptido INGAP que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional, en forma purificada, sintética o recombinante.

[0096] HIP3CysDimer (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)₂ (NR ID DE SEC: 11)) es un dímero del Péptido ProIslet Humano donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. La forma dimérica se forma mediante la creación de un enlace de disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales.

[0097] HIP1CysDimer (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys)₂ (NR ID DE SEC: 12)) es un dímero del Péptido ProIslet Humano donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. El dímero se forma mediante la creación de un enlace de disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales.

[0098] HIP2CysDimer (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)₂ (NR ID DE SEC: 13)) es un dímero del Péptido ProIslet Humano donde cada monómero ha sido modificado para incluir un Residuo de cisteína C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. El dímero se forma mediante la creación de un enlace de disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales. HIP2 tiene un peso molecular de alrededor de 1435,5.

[0099] INGAPCysDimer (INGAPCisDímero) es un dímero del Péptido INGAP donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína N-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante.

[00100] HIP3CysBlocked (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH₂) (NR ID DE SEC: 14)) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante.

[00101] HIP1CysBlocked (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂) (NR ID DE SEC: 15)) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo C-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante.

[00102] HIP2CysBlocked (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂) (NR ID DE SEC: 16)) es un Péptido ProIslet Humano que ha

sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante.

5 **[00103]** INGAPCysBlocked (INGAPCisBloqueado) es un Péptido INGAP que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante.

10 **[00104]** HIP3CysBlockedDimer (HIP3CisBloqueadoDímero) (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH₂)₂ (NR ID DE SEC: 17) es un dímero del Péptido ProIslet Humano donde cada monómero ha sido modificado para incluir un Residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. El dímero se forma mediante la creación de un enlace de disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales.

15 **[00105]** HIP1CysBlockedDimer (HIP1CisBloqueadoDímero) (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂)₂ (NR ID DE SEC: 18) es un dímero del Péptido ProIslet Humano donde cada monómero ha sido modificado para incluir un Residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo C-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. El
20 dímero se forma mediante la creación de un enlace de disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales.

25 **[00106]** El HIP2CysBlockedDimer (HIP2CisBloqueadoDímero) o HIP2B Cys Dimer (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂)₂ (NR ID DE SEC: 19) es un dímero Péptido ProIslet Humano donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. El dímero se forma mediante la creación de un enlace de disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales. El HIP2B Cys Dimer tiene un peso molecular de alrededor de 3157,5.

30 **[00107]** INGAPCysBlocked Dimer (INGAPCisBloqueado Dímero) es un dímero del Péptido INGAP donde cada monómero ha sido modificado para incluir un

residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética o recombinante. El dímero se forma mediante la creación de un enlace de disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales.

5 **[00108]** HIP3CysPEG (HIP3CisPEG) (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys(PEG)) (NR ID DE SEC: 20) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido modificado para incluir un Residuo de cisteína C-terminal el que se ha acoplado covalentemente a un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica, en forma purificada, sintética o recombinante.

10 **[00109]** HIP1CysPEG (HIP1CisPEG) (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)) (NR ID DE SEC: 21) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal el que se ha acoplado covalentemente a un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica, en forma purificada, sintética o recombinante.

15 **[00110]** HIP2CysPEG (HIP2CisPEG) (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)) (NR ID DE SEC: 22) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal el que se ha acoplado covalentemente a un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica, en forma purificada, sintética o recombinante.

20 **[00111]** INGAPCysPEG es un Péptido INGAP que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal el que ha sido covalentemente acoplado a un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica, en forma purificada, sintética o recombinante.

[00112] HIP3CysBlockedPEG (HIP3CisBLoqueadoPEG) (Ac-Ile-Gly-Leu-
25 His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys(PEG)-NH₂) (NR ID DE SEC: 23) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, y modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal el que ha sido covalentemente acoplado a un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica, en forma purificada, sintética o recombinante.

30 **[00113]** HIP1CysBlockedPEG (HIP1CisBLoqueadoPEG) (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)-NH₂) (NR ID DE SEC:

24) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, y modificado para que incluya un residuo de cisteína C-terminal el que se ha acoplado covalentemente a un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica, en forma purificada, sintética o recombinante.

5 **[00114]** HIP2CysBlockedPEG (HIP2CisBloqueadoPEG) o HIP2B Cys-PEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)-NH₂) (NR ID DE SEC: 25) es un Péptido ProIslet Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, y modificado para que incluya un residuo de cisteína C-terminal el que ha sido covalentemente acoplado a un constructo 40 Kd PEG
10 activado por maleimida dimérica, en forma purificada, sintética o recombinante. HIP2B Cys(PEG) tiene un peso molecular de alrededor de 44.782.

[00115] INGAPCysBlocked PEG (INGAPCisBloqueado PEG) es un Péptido INGAP que ha sido bloqueado con un grupo acetilo C-terminal y un grupo amida N-terminal, y modificado para que incluya un residuo de cisteína C-terminal el que ha sido
15 covalentemente acoplado a un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica, en forma purificada, sintética o recombinante.

[00116] REG3G es un precursor de proteína 3 gamma derivado de un islote humano en regeneración que tiene la siguiente secuencia
MLPPMALPSVSWMLLSCILLCQVQGEETQKELSPRISCPKGSKAYGSPCYALFLS
20 PKSWMDADLACQKRPSGKLVSVLGAEGSFVSSLVRSISNSYSYIWIGLHDPTQGS
EPDGDGWEWSSTDVMNYFAWEKNPSTILNPGHCGSLSRSTGFLKWKDYNDAKL
PYVCKFKD (NR ID DE SEC: 28). El péptido REG3G es un péptido precursor de
proteína 3 gamma derivado de un islote humano en regeneración derivado de REG3G que
tiene la secuencia IGLHDPTQGSEPDG (NR ID DE SEC: 29). Otros péptidos REG3Gs
25 son WIGLHDPTQGSEPDG (NR ID DE SEC: 58) y IGLHDPTQGSEPDGD (NR ID DE SEC: 59).

[00117] Las realizaciones de la presente descripción proveen estrategias detalladas para optimizar la estabilidad y solubilidad de los péptidos ProIslet, incluyendo HIP, para obtener un uso mejorado como agente terapéutico. El HIP es un fragmento de
30 péptido de la proteína alfa 3 derivada del islote regenerante de proteína humana (REG3A) (NM_138937.1), además conocido como proteína precursora asociada con la pancreatitis

(NP—002571) ubicada en el cromosoma 2, ubicación 2p12 posición 79240075 (NR ID DE SEC: 1). HIP3, HIP1 y HIP2 inducen o estimulan la neogénesis del islote a partir de las células progenitoras residentes dentro del páncreas. Estos agentes para la neogénesis utilizados de acuerdo con los métodos de la presente descripción resultan en formas optimizadas de los péptidos ProIslet, incluyendo HIP, que muestran una estabilidad, solubilidad y eficacia aumentadas *in vivo* cuando se utilizan como agente terapéutico para tratar enfermedades. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, diabetes mellitus (diabetes tipo 1), diabetes tipo 2 (diabetes mellitus no insulino-dependiente e inicio de diabetes adulta que requiere insulina, diabetes en niños y adolescentes) y diabetes autoinmune latente en adultos (LADA).

[00118] Las realizaciones de la invención también proveen composiciones y terapias farmacéuticas para el tratamiento de la disfunción pancreática, incluyendo diabetes tipo 1 y tipo 2, con dichas composiciones. En una realización, estas composiciones comprenden los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado. En otra realización, estas composiciones incluyen a los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado y otros agentes que afectan el metabolismo de la glucosa. Estos otros agentes incluyen aquellos involucrados en la neogénesis de islote pancreático y agentes que inhiben, bloquean o destruyen las células autoinmunes dirigidas a las células de islote pancreático. En una realización, las terapias descriptas aquí se practican administrando una dosis terapéuticamente eficaz de péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, a un mamífero que necesita dicha terapia. En otra realización, las terapias descriptas aquí se ponen en práctica administrando una dosis terapéuticamente eficaz de péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, a un mamífero que necesita dicha terapia en combinación con otro agente (como por ejemplo, una hormona o compuesto) que afecta el metabolismo de la glucosa, incluyendo pero sin limitarse a hormonas o compuestos que están involucrados en la regeneración de células beta, saciedad y vaciado gástrico, como por ejemplo, análogos del receptor GLP-1, GIP, GLP-1, Análogos GLP-1, e Inhibidores de la dipeptidil peptidasa, que previenen la destrucción de GLP-1, y agentes que inhiben, bloquean o destruyen las células autoinmunes dirigidas a las células pancreáticas. En esta última realización, el HIP Optimizado y el otro agente puede

ser administrado separadamente o se pueden mezclar primero para proveer una composición combinada y administrarse simultáneamente.

[00119] El análisis de microarreglo de expresión génica en ratones NOD ha demostrado la regulación ascendente de los genes Reg específicamente en la neogénesis de islote. Además, se sabe que los genes Reg regulan ascendentemente en el desarrollo fetal tardío para poblar el páncreas de un humano en desarrollo y mantener su propio metabolismo de glucosa post parto. El cotransplante de tejido fetal con células epiteliales pancreáticas no endocrinas (NEPECs) ha demostrado producir la estimulación de nuevas estructuras de islote a partir de la población NEPEC. La regulación ascendente de Reg en el material fetal cotransplantado fue probablemente el estímulo para este efecto.

[00120] Los estudios in vivo han demostrado que HIP1, HIP2 y HIP3, cuando se introducen en ratones diabéticos, estimulan la diferenciación de células progenitoras dentro del páncreas en nuevas estructuras de islote.

[00121] Aunque eficaces en la neogénesis de estructuras de islote, aún subsiste la necesidad de optimizar los péptidos ProIslet, incluyendo las variantes HIP, de manera de mejorar su solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad para la administración como agentes terapéuticos. Las modificaciones de los péptidos ProIslet, incluyendo las variantes HIP, que disminuirán las posibilidades de degradación de proteasa aumentarán su eficacia reduciendo así, la dosificación necesaria para un efecto terapéutico eficaz. Estas modificaciones producen lo que se denomina “péptidos ProIslet Optimizados” o “HIP Optimizado”.

[00122] En una realización, se proveen los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, mediante la descripción presente, en forma purificada, sintética o recombinante y se administran de acuerdo con los métodos descriptos aquí para inducir la neogénesis de islote pancreático.

[00123] Además, los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, pueden almacenarse de manera estable durante largos períodos de tiempo. HIP Optimizado es estable durante meses cuando se lo almacena a 20 °C en una solución salina isotónica.

[00124] En una realización específica, los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, son funcionalmente hiperactivos, es decir, capaces de exhibir

una mayor actividad de una o más de las actividades funcionales asociadas con REG3A, otros péptidos HIP, y homólogos HIP no humanos como por ejemplo, INGAP en hámster.

[00125] Debido a la degeneración de las secuencias que codifican al nucleótido, puede utilizarse en la práctica de la presente descripción, una variedad de secuencias ADN que codifican las mismas secuencias o secuencias de aminoácido sustancialmente similares como los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, para preparar los vectores de expresión para la producción de péptidos ProIslet Optimizados recombinantes, incluyendo las variantes de HIP Optimizado. Éstos incluyen, pero no se limitan, a las secuencias de ácido nucleico que comprenden a todos o porciones de los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, que están alterados por la sustitución de diferentes codones que codifican al mismo residuo o un residuo de aminoácido funcionalmente equivalente, produciendo así un cambio silencioso. Por ejemplo, pueden sustituirse uno o más residuos de aminoácido dentro de la secuencia con otro aminoácido de polaridad similar que actúa como equivalente funcional, produciendo una alteración silenciosa. Los sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de otros miembros de la clase al que pertenece dicho aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos (básico) cargados positivamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos (ácidos) cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo derivados del HIP Optimizado, además incluyen pero no están limitados a aquellos que contienen una secuencia de aminoácido primario, toda o parte de la secuencia de aminoácido del péptido ProIslet, incluyendo HIP, incluyendo secuencias alteradas donde los residuos de aminoácido están sustituidos por residuos con propiedades químicas similares. En una realización específica, se sustituyen 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos de HIP Optimizado produciendo análogos y/o derivados de HIP Optimizado.

[00126] En una realización específica, las proteínas quiméricas o de fusión pueden utilizarse en los métodos descritos aquí. Como se utiliza aquí, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende a los péptidos ProIslet Optimizados,

incluyendo HIP Optimizado, o un análogo o derivado de los mismos operativamente acoplado a un péptido no-ProIslet o polipéptido HIP o un análogo o derivado del mismo. Dentro de la proteína de fusión, Péptido ProIslet Optimizado o HIP y el péptido no-ProIslet o polipéptido HIP están “operativamente acoplados”, es decir, están fusionados en marco entre sí. Se puede fusionar al polipéptido no-ProIslet o HIP al N-terminal o C-terminal del Péptido ProIslet Optimizado o HIP. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser HIP Optimizado que contiene una secuencia de señal heteróloga como su N-terminal. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), se puede aumentar la expresión y/o secreción de HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo, mediante del uso de una secuencia de señal heteróloga. Incluso en otro ejemplo, la proteína de fusión es una proteína de fusión de inmunoglobulina de HIP Optimizado donde la secuencia HIP Optimizado está fusionada a secuencias derivadas de un miembro de la familia de proteínas de inmunoglobulina. La proteína de fusión de inmunoglobulina-HIP optimizado puede incorporarse a las composiciones farmacéuticas y administrarse a un justo para inhibir una respuesta inmunológica de acuerdo con la presente descripción.

[00127] Los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, o un análogo o derivado de los mismos, o un péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP Optimizado-proteína quimérica o de fusión para utilizar en los métodos descritos presentes, pueden modificarse químicamente con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad, y/o aumentar la eficacia, solubilidad y estabilidad. Por ejemplo, la proteína puede estar covalente o no covalentemente acoplada a porciones de albúmina, transferrina o polietilén glicol (PEG) adicional.

[00128] Los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, o un análogo o derivado de los mismos, o un Péptido ProIslet Optimizado o HIP-proteína quimérica o de fusión para utilizar en los métodos descritos aquí, pueden producirse mediante técnicas estándar de ADN recombinante de acuerdo con las explicaciones ofrecidas aquí y conocidas en el arte. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptido pueden ligarse juntos en marco de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo, utilizando terminales de extremo romo o extremos escalonados para la ligadura, digestión mediante enzima de restricción para proveer los terminales adecuados, rellenado de extremos cohesivos como fuera apropiado, tratamiento

con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligaduras enzimáticas. Además, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación PCR de fragmentos del gen puede llevarse a cabo usando cebadores anclados que dan origen a salientes complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden subsiguientemente ser hibridados y reamplificados para generar una secuencia génica quimérica. Además, hay disponibles en el mercado muchos vectores de expresión que ya codifican una porción de fusión (por ejemplo un polipéptido GST). Se puede clonar un ácido nucleico que codifica HIP Optimizado dentro de dicho vector de expresión de manera que la porción de fusión esté acoplada en marco al HIP Optimizado. La proteína de fusión puede ser un HIP Optimizado fusionado a una etiqueta His o etiqueta de epítipo (por ejemplo, V5) para ayudar en la purificación y detección del HIP Optimizado recombinante, o enmascarar la respuesta inmunológica en un sujeto. Las secuencias de aminoácido cortas de HIP Optimizado y sus análogos y derivados realizan la producción sintética de estos péptidos valiosos de manera práctica y rápida también y, existen en el mercado una variedad de instrumentos automatizados para la síntesis del péptido que son conocidos y pueden utilizarse de acuerdo con la descripción presente métodos de síntesis para la síntesis peptídica sin requerir automatización para preparar HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo.

20 **[00129]** En algunas realizaciones, los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, o un análogo o derivado del mismo, o un Péptido ProIslet Optimizado o HIP- proteína quimérica o de fusión pueden modificarse de manera que tengan una vida media extendida *in vivo* utilizando cualquiera de los métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el fragmento Fc de IgG humano o moléculas poliméricas inertes como por ejemplo polietilén glicol de elevado peso molecular (PEG) puede acoplarse al HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica de sitio del PEG con el N- o C-terminal de la proteína o mediante grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Se utilizará la derivatización polimérica lineal o ramificada que resulta en una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede ser monitoreado detalladamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masa para asegurar la conjugación adecuada de

moléculas PEG con HIP Optimizado o un análogo o derivado de los mismos. El PEG no reaccionado puede separarse de los conjugados HIP Optimizado-PEG mediante exclusión de tamaño o cromatografía de intercambio de iones. Se pueden probar los conjugados derivados del PEG en su eficacia *in vivo* usando los métodos conocidos por el experto en el arte.

[00130] Las realizaciones de la presente descripción proveen formulaciones del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP Optimizado, y terapias basadas en ProIslet Optimizado o HIP, y métodos para la administración del péptido ProIslet Optimizado o variantes HIP para el tratamiento de la diabetes y otras diversas indicaciones que involucran una función pancreática deteriorada.

[00131] En una realización, se optimiza un péptido ProIslet mediante el agregado de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal bloqueando eficazmente la actividad proteolítica mediante dichas proteasas que reconocen y degradan los extremos libres de péptidos en suero y resultan en los compuestos del Péptido ProIslet Optimizado.

[00132] En una realización, HIP3, HIP1 y/o HIP2 se optimizan mediante el agregado de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal bloqueando eficazmente la actividad proteolítica mediante aquellas proteasas que reconocen y degradan extremos libres de péptidos en suero y producen compuestos HIP Optimizado HIP3Blocked (NR ID DE SEC: 5), HIP1Blocked (NR ID DE SEC: 6) y HIP2Blocked (NR ID DE SEC: 7), respectivamente. Se agregan estos grupos de bloqueo y se prepararon mediante la Síntesis de Péptidos en Fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés). La premisa fundamental de la síntesis en fase sólida es que los aminoácidos pueden ensamblarse dentro del péptido de cualquier secuencia deseada mientras que un extremo de la cadena quede anclado a un soporte insoluble. Como mencionamos anteriormente, en la SPPS práctica, el término carboxilo del péptido está ligado al polímero. Después de haber acoplado la secuencia deseada de aminoácidos junto con el soporte, se puede aplicar un reactivo para escindir la cadena peptídica del soporte y liberar el péptido crudo en la solución. Todas las reacciones involucradas en la síntesis se llevan a cabo hasta completarlas si es posible, de manera que se pueda obtener un producto homogéneo.

[00133] Cuando el C-terminal de un péptido es una amida, el derivado es una amida del péptido. Las amidas del péptido son derivados extremadamente importantes ya que están presentes muchas hormonas peptídicas naturales como la amida. Para sintetizar las amidas del péptido se han desarrollado resinas en fase sólida que producen amidas del péptido directamente luego de la escisión. Cuando el N-terminal es un grupo acetilo, el péptido se ensambla desde el C-terminal al N-terminal. Luego se acetila el N-terminal usando anhídrido acético en presencia de una base.

[00134] En otra realización los péptidos ProIslet se modifican mediante el agregado de un residuo de cisteína C-terminal produciendo los compuestos del péptido ProIslet Cys. Estos compuestos del Péptido ProIslet Optimizado son capaces de formar dímeros en solución donde se forma un enlace de disulfuro entre las cisteínas de los monómeros individuales, produciendo el Dímero Cys del péptido ProIslet de los compuestos del péptido ProIslet Optimizado, péptido ProIslet péptido CysDimer.

[00135] En otra realización HIP3, HIP1 y/o HIP2 se modifican mediante el agregado de un residuo de cisteína C-terminal resultando en los compuestos del HIP Optimizado: HIP3Cys (NR ID DE SEC: 8), HIP1Cys (NR ID DE SEC: 9) y HIP2Cys (NR ID DE SEC: 10), respectivamente. Estos compuestos HIP Optimizado son capaces de formar dímeros en solución donde un enlace de disulfuro se forma entre las cisteínas de los monómeros individuales resultando en los compuestos de HIP Optimizado: HIP3CysDimer (NR ID DE SEC: 11), HIP1CysDimer (NR ID DE SEC: 12) y HIP2CysDimer (NR ID DE SEC: 13), respectivamente. Se agrega el residuo de cisteína mediante el cual, se mojaron 4 gramos del péptido crudo con 2 ml de ácido acético y se diluyó con ~500 ml de agua desionizada, luego se ajustó el pH a ~8,2 agregando una solución NH₄OH al 20% en forma de gotas y se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente. La reacción no se completó durante la noche, por lo tanto, se agregó una solución de ferricianuro de potasio hasta que persistiera un color verde amarillento permanente. En esta etapa, se completó la reacción tal como lo determinó la prueba de Ellman y el análisis HPLC. Luego se trató la solución de oxidación con una espátula de resina AG-1 X2 (forma cloruro) durante 30 minutos y se filtró a través de un embudo P4 y finalmente, se ajustó el pH a ~5 antes de la purificación por HPLC.

[00136] En otra realización los péptidos ProIslet Cys se bloquean mediante el agregado de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal protegiendo así, el compuesto de la degradación por parte de las proteasas que reconocen extremos libres en suero y que resultan en el péptido CysBlocked de los compuestos ProIslet HIP Optimizado.

5 Además, estos compuestos son capaces de formar dímeros en solución donde se forma un enlace de disulfuro entre las cisteínas de los monómeros individuales resultando en el péptido CysBlockedDimer de los compuestos ProIslet Optimizados. Se agregan estos grupos como se explicó anteriormente.

[00137] En otra realización HIP3Cys (NR ID DE SEC: 8), HIP1Cys (NR ID DE SEC: 9) y/o HIP2Cys (NR ID DE SEC: 10) son bloqueados por el agregado de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal protegiendo así al compuesto de la degradación por parte de las proteasas que reconocen extremos libres en suero y que resultan en los HIP3CysBlocked de los compuestos HIP Optimizados (NR ID DE SEC: 14), HIP1CysBlocked (NR ID DE SEC: 15) y HIP2CysBlocked (NR ID DE SEC: 16),
15 respectivamente. Además, estos compuestos son capaces de formar dímeros en solución donde se forma un enlace de disulfuro entre las cisteínas de los monómeros individuales resultando en los HIP3CysBlockedDimer de los compuestos HIP Optimizados (NR ID DE SEC: 17), HIP1CysBlockedDimer (NR ID DE SEC: 18) y HIP2CysBlockedDimer (NR ID DE SEC: 19), respectivamente. Se agregan estos grupos como se explicó anteriormente.

20 [00138] En otra realización el péptido ProIslet Cys se optimiza mediante el acoplamiento covalente de un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica al Residuo de cisteína C-terminal resultando péptido ProIslet CysPEG de los compuestos HIP Optimizados. El constructo PEG puede estar acoplado covalentemente al residuo de cisteína C-terminal teniendo la forma purificada monomérica del péptido CS504 (1,1
25 equivalente) disuelta en un búfer de acetato (pH=6,5). Se puede preparar una solución del PEG maleimida (1 equivalente) en agua desionizada y agregarse a la solución del péptido con agitación. El pH de la solución resultante puede ajustarse otra vez a ~6,5 con una solución de NH₄OH diluida, agitarse a temperatura ambiente durante 30 minutos y acidificarse con unas pocas gotas de ácido acético y finalmente purificarse mediante RP-
30 HPLC.

[00139] En otra realización HIP3Cys (NR ID DE SEC: 8), HIP1Cys (NR ID DE SEC: 9) y/o HIP2Cys (NR ID DE SEC: 10) están optimizados mediante el acoplamiento covalente de un constructo 40 Kd PEG activado por maleimida dimérica al residuo de cisteína C-terminal resultando en los HIP3CysPEG de los compuestos HIP Optimizados (NR ID DE SEC: 20), HIP1CysPEG (NR ID DE SEC: 21) y HIP2CysPEG (NR ID DE SEC: 22), respectivamente. El constructo PEG está covalentemente acoplado al residuo de cisteína C-terminal teniendo la forma purificada monomérica del péptido CS504 (1,1 equivalente) disuelta en un búfer de acetato (pH=6,5). Se preparó en agua desionizada una solución de PEG maleimida (1 equivalente) y se agregó a la solución del péptido con agitación. El pH de la solución resultante se ajustó otra vez a ~6,5 con una solución de NH₄OH diluida, se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se acidificó con una pocas gotas de ácido acético y finalmente se purificó mediante RP-HPLC.

[00140] En otra realización, el péptido ProIslet CysPEG está optimizado mediante el agregado de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal protegiendo así al compuesto de la degradación por parte de las proteasas que reconocen extremos libres en suero y que resultan en el péptido ProIslet CysPEGBlocked de los compuestos HIP Optimizados. Los grupos de bloqueo se agregan como se explicó anteriormente.

[00141] En otra realización HIP3CysPEG (NR ID DE SEC: 20), HIP1CysPEG (NR ID DE SEC: 21) y HIP2CysPEG (NR ID DE SEC: 22) están optimizados mediante el agregado de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal protegiendo así al compuesto de la degradación por parte de las proteasas que reconocen extremos libres en suero y que resultan en los compuestos de HIP Optimizado HIP3CysPEGBlocked (NR ID DE SEC: 23), HIP1CysPEGBlocked (NR ID DE SEC: 24) y HIP2CysPEGBlocked (NR ID DE SEC: 25), respectivamente. Los grupos de bloqueo se agregan como se explicó anteriormente.

[00142] El péptido ProIslet Optimizado o HIP o terapias análogas o derivativas o terapias de combinación de la presente descripción, pueden utilizarse para tratar cualquier mamífero, incluyendo humanos y animales, que padecen de una enfermedad, síntoma o condición relacionada con la producción o secreción disminuida de

insulina debido a la pérdida de o una función disminuida de células beta o que necesitan una mayor producción de insulina que puede ser proporcionada al sujeto mediante la diferenciación de nuevas estructuras de islote a partir de células progenitoras, utilizando los compuestos de HIP Optimizado y métodos de tratamiento. Dichas enfermedades y condiciones incluyen diabetes tipo 1 mellitus, diabetes tipo 2, pre-diabetes, glucemia basal alterada, hiperinsulinemia en ayunas, incluyendo pero sin limitarse a pacientes con diabetes tipo 1 o pacientes con diabetes latente autoinmune de la adultez que pueden manifestar anticuerpos (anticuerpos anti-GAD65, anticuerpos anti-Islet, o anticuerpos anti-insulina), o aquellos pacientes con diabetes tipo 1 con deficiencia de insulina sin autoinmunidad dirigida a las células beta (diabetes tipo 1b). Además, las realizaciones de la presente descripción pueden llevarse a la práctica y obtener beneficios terapéuticos para pacientes recientemente diagnosticados con diabetes tipo 1, hermanos y parientes de primer grado con diabetes tipo 1, y personas con anticuerpos positivos y otras condiciones autoinmunológicas que indican una predisposición a la diabetes tipo 1. En una realización, los métodos descriptos aquí se practican para revertir la diabetes tipo 1 en un paciente que necesita dicho tratamiento.

[00143] Terapias de combinación y métodos relacionados y composiciones pueden, además utilizarse como terapia complementaria para la terapia con insulina en diabetes tipo 1 en niños y adultos, para aminorar las oscilaciones de glucosa en pacientes con diabetes y en pacientes con diabetes poco controlada, inconsciencia hipoglucémica e hipoglucemia recurrente en diabetes tipo 1.

[00144] El Péptido ProIslet Optimizado o HIP o terapias análogas o derivadas y métodos y composiciones relacionadas, pueden usarse para tratar pacientes que tienen diabetes tipo 2 recientemente diagnosticada, diabetes tipo 2 en niños y adultos con hiperglucemia, diabetes tipo 2 conjuntamente tratada con insulina, terapias diabéticas orales u otras terapias diabéticas subcutáneas, y diabetes tipo 2 poco controlada. En algunos pacientes, tanto niños como adultos, los métodos y composiciones descriptas aquí pueden revertir la diabetes tipo 1 y 2. Los métodos y composiciones descriptas aquí pueden además usarse para tratar tanto niños como adultos que padecen formas atípicas de diabetes y pacientes que tienen las condiciones de hiperglucemia postprandial.

[00145] El Péptido ProIslet Optimizado o HIP o terapias análogas o derivadas y métodos y composiciones relacionadas, y composiciones pueden además usarse para tratar pacientes que son niños así como también, adultos, que necesitan perder peso, una reducción en los triglicéridos, colesterol LDL incluyendo pero sin limitarse a lograr, pérdida de peso o tratamiento de la obesidad, sobrepeso en pacientes que tienen diabetes así como también aquellos que no tienen diabetes tipo 1 o 2. En una realización, los métodos y composiciones descriptas aquí se utilizan para tratar un paciente con obesidad mórbida. En otras realizaciones, los métodos y composiciones descriptas aquí se utilizan para tratar un paciente que tiene obesidad mórbida o pacientes con anorexia, bulimia, u otros trastornos de la alimentación.

[00146] Las terapias optimizadas de un solo agente, métodos relacionados y composiciones, pueden además utilizarse para tratar niños y adultos que padecen síndrome dismetabólico o síndrome metabólico, así como también pacientes que exhiben las condiciones de los síndromes de dolor neuropático secundario al metabolismo alterado de la glucosa y aquellos con hipertrigliceridemia y con y sin diabetes, e hipertrigliceridemia postprandial. En una realización, estos métodos se llevan a la práctica para tratar el síndrome de ovario poliquístico en un paciente que necesita dicho tratamiento.

[00147] Otros pacientes que pueden beneficiarse con el péptido ProIslet Optimizado o HIP o terapias análogas o derivadas, y métodos relacionados incluyen pacientes niños y adultos diagnosticados con condiciones como por ejemplo, hiperglucemia en ayunas, pre-diabetes, glucemia basal alterada, tolerancia alterada a la glucosa, y en general, condiciones hiperglucémicas.

[00148] El péptido ProIslet Optimizado o HIP o terapias análogas o derivadas, y métodos y composiciones relacionadas pueden además utilizarse para tratar pacientes que tienen síndromes de dolor neuropático y neuropatías, sin tener en cuenta si se le diagnosticó diabetes al paciente.

[00149] El Péptido ProIslet Optimizado o HIP o análogo o terapias derivadas y métodos y composiciones relacionadas pueden, además, utilizarse para tratar pacientes que padecen pancreatitis recurrente o cáncer pancreático y pueden utilizarse en todas las modalidades dirigidas a lograr nuevas estructuras de islotes derivadas de células progenitoras en el páncreas.

[00150] En una realización, el agente que estimula la diferenciación de islote a partir de las células progenitoras pancreáticas dentro de las estructuras de islote que producen insulina, se selecciona entre el péptido ProIslet Optimizado o HIP o un análogo o derivado de los mismos. En otra realización, se utiliza una combinación del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, y otro agente para estimular la neogénesis de células de islote. Este agente adicional puede ser, por ejemplo, amilina y/o un análogo, incluyendo pero sin limitarse a Pramlintide (SYMLIN™), análogos del receptor GLP-1, exendina-4 (EXENATIDE™), Liraglutide (NN2211), GLP-1, Análogos GLP-1 GIP, GLP-1, INGAP en hámster, otras hormonas incretino-miméticas, y/o compuestos y agentes que actúan de manera similar, y agentes que extienden la media vida o aumentan el nivel o actividad de cualquiera de los compuestos y agentes anteriores, como por ejemplo, inhibidores de la dipeptidil peptidasa, que retardan la degradación de GLP-1. Existen numerosos miméticos GLP-1 que actúan mediante la actividad agonista directa sobre los receptores GLP-1 o mediante la inhibición de la degradación de GLP-1. Estos agentes son útiles en ciertas realizaciones de la presente descripción. Los miméticos GLP-1 pueden utilizarse junto con HIP y/o una terapia inmunológica dirigida para el tratamiento de la diabetes tipo 1, y, pueden utilizarse para mejorar el control glucémico, aumentar la saciedad, retardar la absorción intestinal de glucosa y producir una reversión de los mecanismos subyacentes resultantes en la diabetes tipo 1. Estos agentes y métodos pueden impedir el avance de la tolerancia alterada a la glucosa en la diabetes; prevenir la pre-diabetes, avance de la glucemia basal alterada relacionada con la tolerancia alterada a la glucosa y diabetes; revertir la enfermedad en pacientes recientemente diagnosticados con diabetes tipo 2; tratar la diabetes tipo 2, y tratar o prevenir el sobrepeso, obesidad, síndrome de ovario poliquístico, y síndromes de dolor neuropático.

[00151] Los métodos, agentes y formulaciones farmacéuticas útiles en la práctica de la presente descripción destinados a lograr la diferenciación de islotes pancreáticos a partir de células progenitoras en el páncreas de un adulto e incluir aquellos descritos para otros propósitos en las siguientes referencias, cada una de ellas se incorpora aquí como referencia: Rosenberg y colab., 1992, *Adv. Exp. Med. Biol.* 321: 95-104; Mar. 1996, *Diabetologia* 39(3):256-62; Jul. 1996, *Pancreas* 13(1):38-46; y Nov. 2004, *Ann. Surg.* 240(5):875-84; Vinik y colab., Jun. 1997, *Horm. Metab. Res.* 29(6):278-93. La

estimulación exitosa de la regeneración o diferenciación de islotes de células progenitoras pancreáticas puede demostrarse mediante la producción y/o secreción aumentada de insulina en un sujeto.

[00152] En una realización, se utiliza amilina o un análogo de amilina como por ejemplo, Symlin™ o Pramlintide antes de la administración o en administración concomitante con HIP Optimizado. La Amilina puede administrarse antes de la regeneración del islote y continuarse durante la administración del período de regeneración del islote de acuerdo con las explicaciones de la referencia, Young y colab., 1997, *Curr. Opin. Endocrin. Diabetes* 4: 282–290, incorporada aquí como referencia. En una realización, la amilina y/o un análogo, incluyendo pero sin limitarse a pramlintide, se administra por la vía subcutánea para optimizar el control glucémico antes de la iniciación del HIP Optimizado, y puede luego utilizarse solo o junto con otros péptidos que estimulan los islotes, como por ejemplo, HIP Optimizado o un análogo o derivado de HIP Optimizado. En una realización, la amilina o pramlintide se administra en dosis de 0,3-0,8 microgramos por kilogramo de peso del paciente. En una realización, esta dosis se administra por la vía subcutánea antes de las comidas, por ejemplo, QHS y 3 AM. En una realización, la dosis terapéuticamente eficaz se administra por la vía subcutánea o mediante un dispositivo/bomba de infusión y/o sistema de distribución transdérmico, intranasal, bucal, microaguja, método de encapsulación oral. En otra realización, la dosis terapéuticamente eficaz se administra utilizando las formulaciones de liberación sostenida que requieren la administración mediante inyección u otro método de distribución no más frecuente que una vez a la semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes. Como se destacó anteriormente, en algunas realizaciones, la amilina o pramlintide se co-administra con otro agente estimulante de islotes.

[00153] En una realización, se utiliza un análogo del receptor GLP-1, incluyendo exendina-4 o un análogo de exendina 4 en el método con HIP Optimizado,, en dosis de 5-10 mcg con las comidas. Se puede formular la exendina-4 y administrarse con la finalidad de la presente descripción de acuerdo con las explicaciones de las siguientes referencias, cada una de ellas se incorporada aquí como referencia: Alcantara y colab., 1998, *Cell Biochem. Funct.* 16(1): 51-6; Dupre y colab., 2004, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 89(7): 3469-73; Edwards y colab., 1999, *Diabetes* 48: 86–93; y Xu y colab., 1999,

Diabetes 48: 2270-76. En una realización, se dosifica la exendina-4 dentro de un rango entre 5-10 microgramos antes de las comidas. En una realización, se administra exendina-4 por la vía subcutánea sola o junto con HIP Optimizado y/o otros péptidos estimulantes de islotes. En una realización, la dosis terapéuticamente eficaz se administra por la vía subcutánea. En otra realización, la distribución de exendina-4 se realiza por la vía transdérmica, bucal, métodos de encapsulación orales, sistemas de distribución intranasal o mediante microaguja. En otra realización, la dosis terapéuticamente eficaz está contenida en una formulación de liberación sostenida que requiere una administración no más frecuente que una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, o una vez al mes. En una realización, se co-administra la exendina-4 con HIP Optimizado u otro agente para la neogénesis de célula de islote o agente para la transformación de la célula progenitora, a pacientes que padecen diabetes tipo 1 o 2, o aquellos con obesidad, sobrepeso, síndrome de resistencia a la insulina, glucemia basal alterada, pre-diabetes, síndrome de ovario poliquístico, síndrome metabólico o trastornos de la alimentación.

15 **[00154]** GIP y GLP-1 pertenecen a la familia de las incretinas de las hormonas de crecimiento (véase las referencias de Creutzfeldt, 1979, *Diabetologia* 16: 75-85; Creutzfeldt and Ebert, 1985, *Diabetologia* 28: 565-573; Holst y colab., 2001, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 234: 75-85; y Vilsboll y colab., Jun. 2003, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 88(6) :2706-13, cada una de ellas se incorpora aquí como referencia), y en una realización, se utiliza una hormona incretina o análogo con o sin el uso concomitante de HIP Optimizado para estimular la diferenciación en islotes a partir de las células progenitoras en el páncreas adulto.

25 **[00155]** En varias realizaciones, se utiliza GIP o un análogo GIP con el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP. Se puede formular GIP y administrarse con la finalidad de la presente descripción de acuerdo con las enseñanzas de las siguientes referencias, cada una de ellas se incorpora aquí como referencia: Andersen y colab., 1978, *J. Clin. Invest.* 62: 152-161; Creutzfeldt y colab., Feb. 1980, *Diabetes* 29(2):140-5; Dupré y colab., 1973, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 37: 826-828; Ebert y colab., 1980, *Clinical Gastroenterology* 9(3): 679-98; Elahi y colab., 1979, *Am. J. Physiol.* 237: E185-E191, y 30 1994, *Regulatory Péptido* 51(1): 63-74; Krarup y colab., Jun. 1983, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 56(6):1306-12; Krarup y colab., 1987, *Metabolism* 36(7): 677-82; Krarup y colab.,

1988, *Acta Med. Scand.* 223(5):437-41; Lynn y colab., 2003, *FASEB* 17:19-93; Meir y colab., 2002, *Regulatory Péptidos* 107:1-3; y Nauk y colab., 1993, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 76(4): 912-7.

[00156] En una realización, se administra GIP por la vía intravenosa o subcutánea en combinación con el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o un análogo o derivado de los mismos y se dosifica a 2-10 nanogramos por kilogramo de peso del paciente para proporcionar una infusión continuada de 30 minutos mediante tanto la vía intravenosa como subcutánea, comenzando 3-5 minutos antes de las comidas, antes de acostarse, y comenzando a las 3 AM. En una realización GIP se administra por la vía subcutánea antes de las comidas, QHS, y las 3 AM. En una realización, GIP se administra oralmente o utilizando una dispositivo de infusión o sistemas de distribución transdérmica, bucal, intranasal o con microaguja. En otra realización, se utiliza una formulación de liberación sostenida que requiere una administración no más frecuente que una inyección una vez a la semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes. Las composiciones adecuadas para administrar GIP de acuerdo con los métodos descriptos aquí se describen, para usar en otros propósitos, en la referencia de Jones y colab., 6 Nov. 1989, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 7(4):263-9.

[00157] En varias realizaciones, se utiliza GLP-1 o un análogo, o un agonista receptor GLP-1 o un inhibidor de Dipeptidil peptidasa-4 en combinación con el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o un análogo o derivado de los mismos, en el método para estimular la diferenciación de islotes a partir de las células progenitoras; GLP-1, Agonistas del receptor GLP-1, Análogos GLP-1 e Inhibidores DPP-4 pueden formularse y administrarse para la finalidad de la presente descripción de acuerdo con las descripciones de las siguientes referencias, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia: Elahi y colab., 1994, *Regulatory Péptidos* 51(1): 63-74; Gutniak y colab., 1994, *Diabetes Care* 17:1039-44; Kreymann y colab., 1987, *Lancet* 2: 1300-1304; Larsen y colab., 1996, *Diabetes* 45(Suppl. 2):233A (Resumen); Larsen y colab., 2001, *Diabetes Care* 24(8): 1416-21; List y colab., 2004, *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 286(6): E875-81; Lugari y colab., 2000, *Horm. Metab. Res.* 32: 424-428; Marquez y colab., Mar. 1998, *Cell. Biochem. Funct.* 16(1):51-6; Meier y colab., March 2004, *Critical Care Medicine* 32(3):848-851; Meneilly y colab., 2003, *Diabetes Care* 26: 2835-41; Nauk y colab., 1996, *Diabetologia*

39(12):1546-53; Thorens y colab., Dec. 1995, *Diabetes Metab.* 21(5):311-8; Vilsboll y colab., 2003, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 88(6): 2706-13; Wang y colab., 1997, *J. Clin. Invest.* 99: 2883-2889; y Zander y colab., 2002, *Lancet* 359: 824-30.

[00158] En varias realizaciones, GLP-1, un agonista del receptor GLP-1 o un
 5 análogo GLP-1 se administra por la vía subcutánea o los inhibidores DPP-4 se dan
 oralmente en combinación con el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o un
 análogo o derivado de los mismos, en dosis comprendidas dentro de un rango entre 400-
 800 mg por día y 8-20 mg por kilogramo de peso del paciente. En una realización GLP-1 se
 administra oral o subcutáneamente antes de las comidas, QHS. En una realización, GLP-1
 10 se administra usando un dispositivo de infusión subcutánea a una tasa de 1-30
 ng/kilogramo de peso corporal/minuto o un sistema de administración transdérmica, bucal
 o con microaguja para proveer una infusión continua de 30 minutos mediante
 administración intravenosa o subcutánea comenzando 3-5 minutos antes de las comidas,
 antes de dormir, y comenzando a las 3 AM. En otra realización, se utiliza una formulación
 15 de liberación sostenida que requiere una administración no más frecuente que una
 inyección una vez a la semana, una vez cada 2 semanas o una inyección mensual.

[00159] En una realización, liraglutide (NN2211) se administra por la vía
 subcutánea en combinación con el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o un
 análogo o derivado del mismo, en dosis de 10-40 microgramos por kilogramo de peso
 20 corporal. En otra realización liraglutide se administra por la vía subcutánea antes de las
 comidas, QHS, y 3AM. En otra realización, liraglutide se administra usando un dispositivo
 de infusión o un sistema de distribución transdérmica, bucal o con microaguja para proveer
 una infusión continua de 30 minutos por la vía intravenosa o subcutánea comenzando 3-5
 minutos antes de las comidas, antes de dormir, y comenzando a las 3 AM. En otra
 25 realización, se utiliza una formulación de liberación sostenida que requiere una
 administración no más frecuente que una inyección una vez por semana, una vez cada dos
 semanas o una inyección mensual.

[00160] En una realización de terapias de combinación, liraglutide o NN2211
 se administra a una dosis de alrededor de 20 microgramos por Kg. de peso del paciente por
 30 día en combinación con el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP. Esta dosis
 proveerá a los pacientes la capacidad de reducir el bolo de insulina antes de las comidas en

un 10-20% con fluctuaciones reducidas y glucosa postprandial, glucagón, y triglicéridos disminuidos. La administración de liraglutide de acuerdo con los métodos descritos aquí, puede utilizarse para mejorar el control glucémico, medido, por ejemplo y sin limitaciones, mediante hemoglobina A1C, en diabetes tipo 1; para prevenir el avance de la tolerancia alterada a la glucosa en diabetes; para prevenir el avance de la glucemia basal alterada en tolerancia alterada a la glucosa y diabetes; para revertir diabetes tipo 2 recientemente diagnosticada; y para tratar la diabetes tipo 2.

[00161] En una realización de la terapia de combinación, liraglutide o NN2211 se administra a una dosis de alrededor de 20 microgramos por Kg. de peso del paciente, a un paciente adulto durante la mañana, alrededor de 4 horas antes de la ingesta de comida y al acostarse durante las tres semanas consecutivas de duración de la terapia con el péptido ProIslet Optimizado o terapia HIP. Para los pacientes que inician el tratamiento con niveles péptido C inferiores a alrededor de 1,0 ng/mL, se monitorean los niveles del péptido C y cuando ascienden por encima de 0,5 ng/mL, se administra el anticuerpo hOKT3g1 (ala-ala) durante 12 días consecutivos.

[00162] En las terapias de combinación, se administra exendina-4 o exendina-4 sintética u otro análogo GLP-1, agonista del receptor GLP-1, o un inhibidor de la Dipeptidil peptidasa-4 antes de la comidas solo o con un péptido ProIslet Optimizado o HIP, u otro agente para la diferenciación de islotes para mejorar el control glucémico antes de o durante la iniciación de las terapias con HIP Optimizado. Dichos agentes, cuando se administran antes de las comidas, pueden resultar en una reducción en la necesidad de insulina en, al menos, un 20%, y se realizará una disminución gradual de insulina y medicaciones diabéticas mientras se administra HIP Optimizado. Como HIP Optimizado y/o otros agentes se administran a pacientes tanto con diabetes tipo 1 y 2, se hará una reducción gradual cuidadosa de insulina y otras medicaciones diabéticas para proteger contra la hipoglucemia mientras nuevas células de islote se diferencian a partir de las células progenitoras. En última instancia, se disminuirán en forma gradual la insulina y medicaciones para diabetes, incluyendo HIP Optimizado, mientras el páncreas va siendo repoblado con nuevos islotes funcionales. Para pacientes que inician el tratamiento con niveles de péptido C inferiores a alrededor de 1,0 ng/mL, se controlan los niveles del

péptido C y, cuando superan 0,5 ng/mL, se controlará cuidadosamente mientras se va disminuyendo en forma gradual la dosis de insulina exógena.

[00163] Entre los pacientes con diabetes tipo 1, antes de iniciar la toma del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, y/o otros compuestos del péptido (SYMLINTM, se administrará INGAP en hámster, GLP-1, Agonistas del receptor GLP-1, Análogos GLP-1, Inhibidores DPP-4 junto con la terapia inmunológica (antes, durante o después) para proteger los islotes recientemente formados. Por ejemplo, el anticuerpo hOKT3g1 (ala-ala) se administra durante 12 días consecutivos demostrando su eficacia luego del primer tratamiento de hasta 24 meses, mientras se puede administrar un anticuerpo monoclonal humanizado similar, ChAglyCD3 durante 6 días consecutivos y luego repetirse anualmente. El compuesto GAD65 de Diamyd se administra en dos inyecciones subcutáneas, mes por medio. DIAPEP277TM, una proteína 60 de choque térmico, ha demostrado éxito entre los pacientes recién diagnosticados utilizando inyecciones subcutáneas de 1 mg con 40 mg de manitol en aceite vegetal al inicio del estudio, 1 mes y 6 meses. En base al modulador inmunológico seleccionado, se determinará la ciclicidad del tratamiento. En otra realización, se utiliza DIAPEP277TM, una vacuna de proteína 60 de choque térmico, y la vacuna IBC-VSO, que es una forma de insulina sintética, metabólicamente inactiva diseñada para prevenir la destrucción de células beta pancreáticas, interferón alfa, o vacunación usando las células T regulatorias específicas del antígeno CD4⁺CD25⁺ o agente similar. En otra realización, se utilizan los agentes de inmunomodulación incluyendo pero sin limitarse a agentes para inmunoterapia y globulina anti-linfocito T policlonal, en combinación con HIP Optimizado. Dichos agentes además incluyen: Sirolimus (Rapamicina), Tacrolimus (FK506), a proteína 60 de choque térmico (DIAPEP277TM), vacuna de anti-ácido glutámico decarboxilasa65 (GAD65), Micofenolato Mofetil solo o en combinación con Daclizumab, el agente anti-CD20 Rituximab, Campath-1H (anticuerpo Anti-CD52) y/o Vitamina D.

[00164] Algunas células autoinmunes se dirigen a las células beta pancreáticas y, de esta forma, son causantes de algunas de las enfermedades y condiciones que se pueden tratar de acuerdo con los métodos descritos aquí. Véase las siguientes referencias: Bach y colab., 2001, *Ann. Rev. Immun.* 19: 131-161; Lernmark y colab.,

Endocrin. Metab. Clin. N. Am. 20(3): 589-617; y Mathis y colab., Dec. 2001, *Nature* 414(6865): 792-798, cada una de ellas se incorpora aquí como referencia.

[00165] Los métodos de tratamiento anteriores que involucran la introducción de agentes inmunológicos entre los pacientes con diabetes tipo 1, sólo protegen aquellas células de islote que ya han sido destruidas por el ataque inmunológico y no tratan la necesidad de repoblar el páncreas con nuevas estructuras de islote con células beta completamente funcionales. Estos métodos combinan la modulación inmunológica generalizada y específica dirigida a reducir la destrucción de células beta y una metodología para diferenciar nuevas células de islote a partir de las células progenitoras dentro del páncreas adulto.

[00166] Los métodos de la presente descripción pueden utilizar agentes que inhiben específicamente la actividad o bloquean o destruyen las células autoinmunes que se dirigen a las células beta pancreáticas que producen insulina, amilina o glucagón. Dichos agentes incluyen péptidos inmunomodulatorios que detienen la destrucción de células de islote pancreático. Por ejemplo, uno de dichos agentes es el anticuerpo monoclonal que puede retardar el avance de la pérdida de células de islote o vuelven más lento o detienen el inicio de la diabetes tipo 1. Los anticuerpos Anti-CD3 constituyen una clase general de agentes útiles para los métodos descriptos aquí. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 adecuados para la finalidad de la presente descripción incluyen al anticuerpo TRX4 (Ala-Ala y ChAglyCD3), en desarrollo por TolerRx y al anticuerpo anti-CD3 humanizado descripto en la referencia de Herold y colab., 30 May 2002, *NEJM* 346(22):1692-1698, incorporada aquí como referencia. En una realización, el anticuerpo anti-CD3 humanizado se administra por la vía intravenosa, 14 días al año en una dosis de 1-1,42 µg/kg en el día 1, 5,67 µg/kg en el día 2, 11,3 µg/kg en el día 3, 22,6 µg/kg en el día 4 y 45,4 µg/kg en los días 5-14. Estas terapias pueden repetirse anualmente luego de 3-6 meses de uso de HIP Optimizado, mientras se va disminuyendo gradualmente la insulina ya que se van formando las células de islotes nuevos. Durante la fase del tratamiento con HIP Optimizado, se puede continuar la utilización de Vitamina D y Pramlintide/Symlin™. Luego de discontinuar la administración del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, y la terapia con insulina, se puede repetir la modulación inmunológica anualmente para los

anticuerpos anti-CD3, aunque un estudio reciente ha descubierto que su eficacia continúa durante 24 meses.

[00167] En otra realización, el compuesto inmunomodulatorio es una proteína de choque térmico que puede detener o volver más lenta la destrucción de células de islotes. Dichas proteínas incluyen DIAPEP277TM, a proteína de choque térmico en desarrollo por parte de Develogen AG. En una realización, DIAPEP277TM se administra por la vía subcutánea dando 1 mg en 40 mg de manitol en aceite vegeta, por la vía subcutánea al inicio y al mes y luego dos veces con tres meses de intervalo. En una realización de la terapia de combinación, el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o un análogo o derivado de HIP Optimizado se coadministra con DIAPEP277TM de la manera que sigue. Primero se administra DIAPEP277TM por la vía subcutánea en una dosis de alrededor de 1 mg, alrededor de 30 días antes de iniciar con el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o análogo o terapia basada en un derivado. Luego se realiza una segunda administración de DIAPEP277TM en el momento (90 días después de la primera administración) de iniciar la administración de HIP Optimizado o análogo o terapia basada en un derivado.

[00168] En otra realización, el compuesto inmunomodulatorio es Globulina anti-linfocito T policlonal (ATG). Se dan cuatro dosis de ATG. La primera dosificación de ATG es de 9 mg/kg de peso corporal, luego 3 dosis consecutivas de 3 mg/kg) se administrarán por la vía intravenosa durante 4 horas. Una hora antes de la primera administración de ATG, se realizará un test de tolerancia cutánea (0,2 ml de la solución final). En una realización de la terapia de combinación, se administra ATG antes de utilizar HIP Optimizado o un análogo o derivado de HIP Optimizado. La última dosis de ATG se administra un mínimo de 14 días antes de la iniciación de la terapia con HIP Optimizado o análogo o terapia basada en un derivado. Se puede requerir una segunda administración de ATG en base a mediciones trimestrales de anticuerpos anti-GAD65 y otros marcadores inmunológicos que sugieren el ataque inmunológico a 24 meses después del tratamiento inicial con ATG. Puede ser necesario un tratamiento anterior si se presenta un suba significativa en los anticuerpos autoinmunológicos dirigidos al páncreas.

[00169] El péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o análogo o derivado del mismo puede administrarse por la vía subcutánea, oralmente vía cápsula

dirigida al hígado u otro agente liposomal, o mediante una infusión subcutánea continuada de 24 horas a una dosis terapéuticamente eficaz, como se describió anteriormente. En una realización, la dosis diaria es de alrededor de 5 a 20 mg por kg de peso corporal del paciente cada 24 horas. En una realización, la dosis diaria es de ~600-800 mg. El péptido ProIslet Optimizado o análogo o terapia basada en un derivado se continúa durante un período de 3-6 meses y se controla minuciosamente mediante la producción de péptidos C. La terapia inmunológica se administrará cíclicamente en base al agente inmunológico seleccionado. Por ejemplo, DIAPEP277TM se administra a intervalos de 3 meses durante un total de 6 meses y podría administrarse inicialmente 3 meses antes del HIP Optimizado o análogo o terapia basada en un derivado.

- [00170] Los agentes inmunomodulatorios útiles para los métodos descriptos aquí pueden formularse, administrarse y dosificarse como se sabe en el arte o como se describe aquí. Las formulaciones farmacéuticas, dosificaciones adicionales y protocolos de administración para la práctica de los métodos descriptos aquí, se detalla a continuación.
- [00171] Las composiciones del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o un análogo o derivado de los mismos, *por ejemplo*, y las sales y ésteres farmacéuticamente de los mismos, son sinérgica o aditivamente eficaces para diferenciar células progenitoras en nuevas células de islote para el tratamiento de la diabetes o trastornos similares cuando se combinan con otros compuestos diversos. Estos compuestos incluyen al péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, y análogos y derivados del mismo, amilina y/o un análogo, incluyendo pero sin limitarse Symlin/Pramlintide, GLP-1, Agonistas del receptor GLP-1, como exendina-4, Liraglutide (NN2211), Análogos GLP-1, Inhibidores de la dipeptidil peptidasa, GIP, INGAP en hámster, y otras hormonas incretino-miméticas, y/o compuestos y agentes que actúan de manera similar, y agentes que extienden la vida media o aumentan el nivel o actividad de cualquiera de los compuestos o agentes anteriores como por ejemplo, inhibidores de la dipeptidil peptidasa, que retardan la degradación de GLP-1, y agentes que inhiben, bloquean o destruyen las células inmunológicas que se dirigen a las células beta incluyendo pero sin limitarse a: anticuerpos anti CD-3, incluyendo hOKT31 (Ala-Ala) y ChAglyCD3, ATG, Sirolimus (Rapamicina), Tacrolimus (FK506), a proteína 60 de choque térmico (DIAPEP277TM), una vacuna de anti-ácido glutámico decarboxilasa 65 (GAD65), Micofenolato Mofetil solo o en

combinación con Daclizumab, al agente anti-CD20 Rituximab, Campath-1H (anticuerpo Anti-CD52), lisofilina, y Vitamina D, vacuna de IBC-VSO que es una forma de insulina sintética, metabólicamente inactiva diseñada para prevenir la destrucción de células beta pancreáticas, y vacunación con interferón- α usando células T reguladoras específicas del antígeno CD4⁺CD25⁺ o un agente similar diseñado para prevenir la destrucción de células beta pancreáticas. En esta última realización, la vacunación con interferón alfa usando células T reguladoras específicas del antígeno CD4⁺CD25⁺ o un agente similar se utiliza en la terapia de combinación para utilizar las células T reguladoras ya sea directamente o mediante el uso de inmunoterapia anti-CD3.

10 **[00172]** Compuestos como por ejemplo, Sirolimus (Rapamicina), Tacrolimus (FK506), anticuerpo TRX4, anticuerpo anti-CD3 humanizado, DYAMID™ anticuerpo anti-GAD65, y DIAPEP277™ son, además, sinérgica o aditivamente eficaces cuando se agrega al uso de HIP Optimizado o un agente para diferenciar las células progenitoras en nuevas células de islote en el tratamiento de la diabetes o trastornos similares.

15 **[00173]** Una mejora en el régimen terapéutico del fármaco puede obtenerse mediante la administración combinada de dos agentes que tienen efecto terapéutico, si la interacción de dos o más de los agentes es tal, que su efecto combinado reduce la incidencia de un evento adverso (AE, por sus siglas en inglés) de cualquiera o ambos agentes usados en la coterapia. Esta reducción en la incidencia de efectos adversos puede se el resultado de, por ejemplo, la administración de dosis menores de cualquiera o ambos agentes usado en la coterapia. Por ejemplo, si el efecto del fármaco A solo es del 25% y tiene una incidencia de efecto adverso del 45% cuando se utiliza en la dosis etiquetada, y el efecto del fármaco B solo es del 25% y tiene una incidencia de efecto adverso del 30% cuando se usa en la dosis etiquetada, cuando se combinan ambos fármacos en dosis inferiores a las dosis etiquetadas de cada una, si el efecto total es del 35% y la tasa de incidencia adversa es del 20%, existe una mejora en el régimen terapéutico del fármaco. Las terapias de combinación provistas por la presente descripción incluyen aquellas que exhiben dichas mejoras.

Composiciones farmacéuticas, dosificación y administración

30 **[00174]** En realizaciones preferidas, los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP, se administran a humanos en una concentración entre alrededor de 0,5 y

alrededor de 5 mg/kg/día, más preferentemente, en inyecciones subcutáneas divididas. De esta forma un individuo de 60 kg podría potencialmente recibir 60 mg/día divididos en dos a tres dosis de 20 mg administradas después de las comidas. En otra realización preferida, los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP, pueden además se administrados
 5 mediante un método de encapsulación oral con dosis comprendidas dentro de un rango entre alrededor de 0,5 y alrededor de 5 mg/kg/día, preferentemente, administrados oralmente en dosis divididas después de las comidas.

[00175] En base a estudios sobre el rango de dosificación (Ejemplo 13) utilizando HIP2 y HIP Optimizado2B en dosis de 1000 microgramos dos veces por día y
 10 0,1 microgramos por día administrados IP a ratones con diabetes inducida por STZ, se podría utilizar HIP2B en una dosis de aproximadamente 10% de la dosis de HIP2 y el equivalente de aproximadamente una dosis de 1 mg/kg comparada con 10 mg/kg (600 mg/día) utilizada en ensayos humanos de INGAP derivado de hámster (Figura 23).

[00176] Por ejemplo, en algunos aspectos, las diversas realizaciones se refieren a una composición farmacéutica que comprende un compuesto, como se definió
 15 anteriormente, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se definió anteriormente.

[00177] Los compuestos descriptos aquí pueden administrarse de manera
 20 convencional mediante cualquier vía en la que sean activos. La administración puede ser sistémica, tópica u oral. Por ejemplo, la administración puede ser, pero no se limita a: la vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, oral, bucal u ocular, o intravaginalmente, por inhalación, mediante inyecciones depot o por implantes. De esta forma, los modos de administración de los compuestos para administrar
 25 los compuestos de la presente descripción (ya sea solos o en combinación con otros farmacéuticos) pueden ser, pero no se limitan a, sublingual, inyectable (incluyendo, formas con efecto de corta duración, depot, implante y pellet inyectados subcutánea o intramuscularmente), o mediante el uso de cremas vaginales, supositorios, pesarios, anillos vaginales, supositorios rectales, dispositivos intrauterinos y formas transdérmicas como por
 30 ejemplo, parches y cremas.

[00178] Las formas específicas de administración dependerán de la indicación. La selección de la vía de administración y el régimen de dosificación debe ajustarse o ser evaluado por el médico clínico de acuerdo con los métodos conocidos por él para obtener la respuesta clínica óptima. La cantidad de compuesto a ser administrada es la cantidad que es terapéuticamente eficaz. La dosis a ser administrada dependerá de las características del sujeto a ser tratado, por ejemplo, el animal particular tratado, la edad, peso, salud, tipos de tratamientos concurrentes si hubiera, frecuencia de tratamientos, y puede ser determinada fácilmente por el experto en el arte (por ejemplo, el médico clínico).

[00179] Las formulaciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la presente descripción y un vehículo adecuado pueden ser formas de dosificación sólidas que incluyen pero no se limitan a comprimidos, cápsulas, comprimidos, pellets, píldoras, polvos y gránulos; formas de dosificación tópicas que incluyen pero no se limitan a soluciones, polvos, emulsiones fluidas, suspensiones fluidas, semisólidos, ungüentos, pastas, cremas, geles y jaleas y espumas; y formas de dosificación parenterales que incluyen, pero no se limitan a soluciones, suspensiones, emulsiones y polvo seco; que comprenden una cantidad eficaz de un polímero o copolímero de la presente descripción. Se conoce en el arte, además, que los ingredientes activos pueden estar contenidos en dichas formulaciones con diluyentes, portadores de relleno, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, surfactantes, vehículos hidrofóbicos, vehículos solubles en agua, emulsionantes, búferes, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes farmacéuticamente aceptables y sustancias similares. Los medios y métodos para la administración son conocidos en el arte y el técnico puede referirse a varias referencias farmacológicas para obtener una guía. Pueden consultarse, por ejemplo, *Modern Pharmaceutics*, Banker & Rhodes, Marcel Dekker, Inc. (1979); y *Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, 6th Edition, MacMillan Publishing Co., New York (1980).

[00180] Los compuestos de la presente descripción pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Se pueden administrar los compuestos mediante infusión continua subcutánea durante un período de tiempo de alrededor de 15 minutos a alrededor de 24 horas. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en formas de dosificación unitarias, por

ejemplo, en ampollas o envases multidosis con un conservante agregado. Las composiciones pueden tener la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes para formulación como por ejemplo, agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

5 **[00181]** Para la administración oral, pueden formularse los compuestos rápidamente combinando estos compuestos con vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos en el arte. Dichos vehículos permiten que los compuestos descriptos aquí se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, solución acuosa, suspensiones y formas similares, para la ingestión oral por parte del paciente a ser
10 tratado. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse agregando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, agregando después materiales auxiliares si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a, portadores de relleno como por ejemplo azúcares que incluyen pero no se limitan a lactosa,
15 sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa como por ejemplo, pero sin limitarse a, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes como por ejemplo, pero sin limitarse a polivinil pirrolidona reticulada, agar, ácido algínico
20 o una sal del mismo como alginato de sodio.

[00182] Los núcleos de comprimidos pueden proveerse con recubrimientos adecuados. Para este fin, pueden usarse soluciones de azúcar concentrada que, opcionalmente, contienen goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilén glicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos o mezclas
25 de solventes adecuadas. Pueden agregarse tinturas o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis activas de un compuesto.

[00183] Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse oralmente incluyen pero no se limitan a, cápsulas duras (dos piezas) hechas de gelatina así como
30 también blandas, cápsulas selladas preparadas con gelatina y un plastificante como por ejemplo, glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos

mezclados con un portador de relleno como por ejemplo, lactosa, aglutinantes como almidonas y/o lubricantes como talco estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados como por ejemplo, aceites grasos, parafina líquida o polietilén glicoles líquidos. Además, pueden agregarse estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben ser en dosis adecuadas para dicha administración.

[00184] Para la administración bucal, las composiciones pueden tener la forma de, por ejemplo, comprimidos o grageas formuladas de manera convencional.

[00185] Para la administración vía inhalación, los compuestos para usar de acuerdo con la presente descripción se administran convenientemente en la forma de una presentación en aerosol en contenedores presurizados o un nebulizador, utilizando un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, se puede determinar la unidad de dosificación proporcionando una válvula para distribuir una cantidad medida. Pueden formularse las cápsulas o cartucho de, por ejemplo, gelatina para usar en un inhalador o insuflador que contenga una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada como por ejemplo, lactosa o almidón.

[00186] Los compuestos de la presente descripción pueden además formularse para composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan las bases convencionales para supositorios como manteca de cacao u otros glicéridos.

[00187] Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos de la presente descripción pueden formularse como preparación depot. Se pueden administrar dichas formulaciones de acción prolongada mediante implante (por ejemplo, subcutáneo o intramuscular) o mediante inyección intramuscular.

[00188] Las inyecciones depot pueden administrarse a intervalos de alrededor de 1 a 6 meses o intervalos mayores. De esta forma, por ejemplo, pueden formularse compuestos con materiales poliméricos o hidrofóbicos (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

[00189] En la administración transdérmica, los compuestos de la presente descripción, pueden aplicarse a un parche, o mediante sistemas transdérmicos, terapéuticos que se aplican consecuentemente en el organismo.

[00190] Las composiciones farmacéuticas de los compuestos además pueden comprender vehículos o excipientes en fase sólida o en gel adecuados. Ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, azúcares varias, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros como por ejemplo, polietilén glicoles.

[00191] Los compuestos de la presente descripción pueden además administrarse en combinación con otros ingredientes activos como, por ejemplo, adyuvantes, inhibidores de proteasa u otros fármacos o compuestos compatibles, cuando se considera que dicha combinación es conveniente o ventajosa para lograr los efectos deseados de los métodos descriptos aquí.

Métodos para preparar HIP Optimizado y análogos o derivados del mismo

[00192] Se puede utilizar cualquiera de las técnicas conocidas en el arte para sintetizar y purificar el HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo, incluyendo pero sin limitarse a, síntesis química de novo y purificación por precipitación, adsorción (por ejemplo, cromatografía de columna, adsorbentes de membrana, columnas de flujo radiales, adsorción de lote, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía por intercambio de iones, adsorbentes inorgánicos, adsorbentes hidrofóbicos, cromatografía de afinidad inmovilizada de metal-ión, cromatografía de afinidad) o filtración por gel, electroforesis, partición en fase líquida, partición con detergente, extracción con solvente orgánico y ultrafiltración. Durante la purificación, la actividad biológica de los péptidos ProIslet Optimizados, incluyendo HIP, o un análogo o derivado de los mismos puede controlarse mediante uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo*. La pureza del péptido ProIslet Optimizado o un análogo o derivado del mismo puede ensayarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en el arte, por ejemplo y sin limitarse a la electroforesis en gel. Véase, Alcances, *supra*. En algunas realizaciones, el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP, o un análogo o derivado del mismo utilizado en una composición descripta aquí, puede estar presente en un rango comprendido entre el 80 y 100 por ciento del total de mg de proteína o, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al

menos el 95%, o al menos el 98% del total de mg de proteína. En una realización, el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo utilizado en una composición es de al menos el 99% del total de proteína. En otra realización, el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo se purifica hasta obtener una aparente homogeneidad, probada por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. En una realización, el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP se sintetiza y prueba mediante HPLC hasta obtener una pureza superior al 95%.

[00193] Se pueden utilizar los métodos conocidos en el arte para producir de manera recombinante el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo. Se puede insertar una secuencia de ácido nucleico que codifica al péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo dentro de un vector de expresión para la propagación y expresión en células hospedantes.

[00194] Un constructo de expresión, como se utiliza aquí, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo, operativamente asociado a una o más regiones regulatorias que permiten la expresión de un HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo en una célula hospedante adecuada. "Operativamente asociado" se refiere a una asociación en la que las regiones regulatorias y el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo a ser expresado, se une y posiciona de manera tal que permita la transcripción y, en última instancia, la traducción.

[00195] Las regiones regulatorias necesarias para la transcripción del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo, puede ser provista por el vector de expresión. Además, un codón de iniciación de traducción (ATG) puede proveerse si se va a expresar una secuencia génica del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo que carece del codón de iniciación cognado. En un sistema hospedante-constructo compatible, los factores transcripcionales celulares, como por ejemplo, ARN polimerasa, se acoplarán a las regiones regulatorias en el constructo de expresión para realizar la transcripción del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo la secuencia HIP en el organismo hospedante. La naturaleza precisa de las regiones regulatorias necesarias para la expresión del gen puede variar de célula

hospedante a célula hospedante. En general, se requiere un promotor que sea capaz de acoplar la ARN polimerasa y promover la transcripción de una secuencia de ácido nucleico operativamente asociada. Dichas regiones regulatorias incluyen aquellas secuencias no codificantes 5' involucradas con la iniciación de la transcripción y traducción, como por ejemplo, la caja TATA, secuencia con capuchón, secuencia CAAT y similares. La región no codificante 3' para la secuencia de codificación puede contener secuencias reguladoras de terminación transcripcional como por ejemplo, terminadores y sitios de poliadenilación.

[00196] Para poder unir las secuencias ADN con funciones reguladoras, como por ejemplo, los promotores, a la secuencia génica del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo o para insertar una secuencia génica del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo en un sitio de clonación de un vector, se pueden acoplar enlazadores o adaptadores que proveen sitios de restricción compatibles adecuados a los extremos de los cADNs mediante las técnicas conocidas en el arte. A la escisión con una enzima de restricción puede seguir la modificación para crear extremos romos mediante la digestión o rellenando los terminales ADN de una sola hebra antes del acoplamiento. Alternativamente, se puede introducir un sitio de enzima de restricción deseado dentro del fragmento de ADN mediante la amplificación del ADN usando PCR con cebadores que contienen el sitio de enzima de restricción deseado.

[00197] Un constructo de expresión que comprende una secuencia del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo, operativamente asociada con las regiones reguladoras, puede introducirse directamente dentro de las células hospedantes adecuadas para la expresión y producción de un péptido ProIslet, incluyendo HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo sin clonación posterior. Los constructos de expresión pueden además contener secuencias ADN que facilitan la integración de una secuencia del péptido ProIslet, incluyendo HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo dentro del genoma de la célula hospedante, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. En esta instancia, no es necesario utilizar un vector de expresión que comprenda un origen de replicación adecuado para que las células hospedantes adecuadas se propaguen y expresen al Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo en las células hospedantes.

[00198] Puede utilizarse una variedad de vectores de expresión, incluyendo pero sin limitarse a plásmidos, cósmidos, fago, fagémidos o virus modificados. Dichos sistemas de expresión en hospedante representan vehículos mediante los cuales las secuencias de codificación de un gen del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un

5 análogo o derivado del mismo, puede producirse y subsiguientemente purificarse y, además, representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con secuencias de codificación de nucleótido adecuadas, expresar al Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo *in situ*. Éstos incluyen pero no se limitan a microorganismos como bacterias (*por ejemplo, E. coli* y *B. subtilis*)

10 transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN de cósmido recombinantes que contienen secuencias de codificación del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo; levadura (*por ejemplo, Saccharomyces, Pichia*) transformada con vectores de expresión que contienen secuencias de codificación del péptido ProIslet, incluyendo HIP Optimizado o un análogo o

15 derivado del mismo; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinante (*por ejemplo, baculovirus*) que contienen secuencias de codificación del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo; sistemas celulares vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (*por ejemplo, virus mosaico del coliflor, CaMV; virus mosaico del tabaco, TMV*) o

20 transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (*por ejemplo, plásmido Ti*) que contienen secuencias de codificación del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo; o sistemas celulares de mamífero (*por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0, y 3T3*) que alojan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (*por*

25 *ejemplo, promotor de metalotioneína*) o de virus de mamíferos (*por ejemplo, promotor tardío de adenovirus; promotor del virus vaccinia 7,5K*). Preferentemente, las células bacterianas como por ejemplo, *Escherichia coli* y células eucarióticas se utilizan para la expresión de un péptido ProIslet Optimizado recombinante, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo. Por ejemplo, se pueden utilizar células de mamífero como por

30 ejemplo, células de ovario de hámster Chino (CHO) con un vector que porta un elemento promotor del gen intermedio principal temprano del citomegalovirus para la expresión

eficaz de una secuencia del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo.

[00199] En sistemas bacterianos, la cantidad de vectores de expresión puede ser ventajosamente seleccionada según el uso pretendido para el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo que está siendo expresado. Por ejemplo, cuando se va a producir cuando un gran cantidad de un péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo, para la generación de las composiciones farmacéuticas de un péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo, pueden ser convenientes vectores que dirigen la expresión de elevados niveles de productos de proteínas de fusión que se purifican rápidamente. Los vectores incluyen pero no se limitan a vector de expresión en *E. coli* pCR2.1 TOPO (Invitrogen); vectores pIN, y vectores similares. Las series de vectores como pFLAG (Sigma), pMAL (NEB), y pET (Novagen) además pueden usarse para expresar las proteínas extrañas como proteínas de fusión con el péptido FLAG, proteína malE, o CBD. Estas proteínas recombinantes pueden dirigirse dentro del espacio periplásmico para su correcto plegamiento y maduración. La parte fusionada puede utilizarse para la purificación por afinidad de la proteína expresada. La presencia de sitios de escisión para proteasas específicas tipo enteroquinasa permite separar al péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo. Los vectores pGEX pueden además utilizarse para expresar proteínas extrañas como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de las células lisadas mediante adsorción o acoplamiento a perlas de glutatión-agarosa seguido por la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir trombina o sitios de escisión de proteasa factor Xa de manera que el producto génico blanco clonado pueda liberarse de la porción GST.

[00200] En un sistema en insectos, pueden usarse muchos vectores para expresar genes extraños, por ejemplo, virus de la polihedrosis nuclear en *Autographa californica* (AcNPV), como un vector para expresar genes extraños. El virus se desarrolla en células como *Spodoptera frugiperda*. Se puede clonar una secuencia de codificación del Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo individualmente en regiones no esenciales (*por ejemplo*, el gen de polihedrina) del virus y

colocarse bajo el control de un promotor AcNPV (*por ejemplo*, el promotor de polihedrina).

[00201] En células hospedantes de mamífero, se puede utilizar una cantidad de sistemas de expresión base viral. En casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, se puede ligar una secuencia de codificación de un péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo, a un complejo de transcripción de adenovirus/control de traducción, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede luego insertarse en el genoma del adenovirus mediante la recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, Región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar al Péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo en hospedantes infectados. Además, se pueden requerir señales de iniciación específica para lograr una eficaz traducción de las secuencias de codificación del péptido ProIslet Optimizado insertado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo. Estas señales incluyen al codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control traduccional exógenas y codones de iniciación pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Se puede aumentar la eficacia de la expresión mediante la inclusión de elementos potenciadores de transcripción adecuados, terminadores de transcripción y elementos similares.

[00202] Además, se puede elegir una cepa de célula hospedante que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína, pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedantes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas de células adecuadas o sistemas hospedantes para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. En este punto, se pueden utilizar células hospedantes eucarióticas que posean la maquinaria celular para un procesamiento adecuado del transcripto primario y

modificación post-traducciona del producto génico, por ejemplo, glicosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células hospedantes de mamífero incluyen pero no se limitan a células PC12, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produjo endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL703O, y HsS78Bst. Se puede utilizar la expresión en un sistema bacteriano o de levadura si se halla que las modificaciones post-traduccionales no son esenciales para una actividad deseada del HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo.

[00203] Para la producción de alto rendimiento a largo plazo del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo, adecuadamente procesado, se prefiere la expresión estable en células. Las líneas celulares que expresan de manera estable al péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo, pueden modificarse genéticamente mediante el uso de un vector que contiene un marcador seleccionable. A manera de ejemplo pero sin limitaciones, luego de la introducción de los constructos de expresión, las células modificadas genéticamente pueden dejarse desarrollar durante 1-2 días en un medio enriquecido y luego cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el constructo de expresión confiere resistencia a la selección y puede, según el constructo del vector y célula hospedante utilizados, permitir que las células integren de manera estable al constructo de expresión dentro de sus cromosomas y se desarrollen en cultivo para ser expandidas en líneas celulares. Dichas células pueden cultivarse durante en largo período de tiempo mientras que el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo se expresa de manera continua.

[00204] Se pueden utilizar una cantidad de sistemas de selección, incluyendo pero sin limitarse a, resistencia al antibiótico (marcadores tipo Neo, que confieren resistencia a la geneticina, o G-418; Zeo, para resistencia a la Zeocina; y Bsd, para resistencia a la blasticidina); resistencia a los antimetabolitos (marcadores tipo Dhfr, que confiere resistencia al metotrexato, gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; e higo, que confiere resistencia a la higromicina. Además, pueden utilizarse líneas celulares mutantes incluyendo pero sin limitarse a células, tk-, hgprt- o aprt-, en combinación con vectores que portan los genes correspondientes para la timidina quinasa, hipoxantina,

guanina o adenina fosforribosil-transferasa. Los métodos comúnmente conocidos en el arte de la tecnología ADN recombinante pueden ser aplicados de rutina para seleccionar al clon recombinante deseado, 150:1.

[00205] Se pueden cultivar células recombinantes en condiciones estándar de temperatura, tiempo de incubación, densidad óptica y composición de los medios. Sin embargo, pueden ser diferentes las condiciones de desarrollo de las células recombinantes de aquellas usadas para la expresión del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo. Las condiciones de cultivo y medios modificados pueden además utilizarse para aumentar la producción del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo. Se pueden aplicar cualquiera de las técnicas conocidas en el arte para establecer las condiciones óptimas para producir el péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo.

[00206] Una alternativa para la producción del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un fragmento del mismo mediante técnicas recombinantes o purificación a partir de fuentes naturales, es la síntesis del péptido. Por ejemplo, se puede sintetizar un HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo completo, o una proteína correspondiente a una porción del HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo, mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Se pueden utilizar la síntesis convencional de péptidos u otros protocolos de síntesis conocidos en el arte.

[00207] Las proteínas que tienen la secuencia de aminoácido del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo o porción del mismo pueden sintetizarse mediante la síntesis de péptidos en fase sólida. Durante la síntesis, se agregan, de manera escalonada, aminoácidos N- α -protegidos que tienen cadenas laterales protegidas a una cadena polipeptídica en crecimiento acoplada a su C-terminal y a un soporte polimérico insoluble, por ejemplo, perlas de poliestireno. Se sintetizan las proteínas por acoplamiento de un grupo amino de un aminoácido N- α -desprotegido a un grupo α -carboxilo de un aminoácido N- α -protegido que ha sido activado haciéndolo reaccionar con un reactivo como por ejemplo, dicitclohexilcarbodimida. La unión de un grupo amino libre con las perlas de carboxilo activado produce la formación del enlace peptídico. La mayoría de los grupos N- α -protectores comúnmente utilizados incluyen Boc, que es lábil al ácido, y Fmoc, que es lábil a la base. Los detalles de químicas adecuadas,

resinas, grupos protectores, aminoácidos protegidos y reactivos son conocidos en el arte y no se describe en detalle aquí.

5 **[00208]** La purificación del péptido ProIslet Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo resultantes se logra usando procedimientos convencionales como por ejemplo, HPLC preparativa usando permeación en gel, partición y/o cromatografía por intercambio de iones. La elección de las matrices y búferes adecuados es conocida en el arte y no se describe con detalles aquí.

10 **[00209]** Con la descripción detallada anterior de los reactivos y métodos de la invención, se proveen los siguientes Ejemplos para ilustrar varios aspectos de la invención.

EJEMPLO 1

15 **[00210]** Actividad HIP *In Vitro*. Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo en la University of Pennsylvania, Laboratorio de Islotes Humanos. Se cultivaron islotes humanos y fracciones ductales durante 10 días y luego se trataron en un estudio a ciegas. Se utilizaron métodos de radioinmunoensayo para medir los niveles de insulina en los cultivos pancreáticos humanos tratados con un péptido desorganizado que sirviera como control negativo, HIP3, HIP1, HIP2 e INGAP derivado de hámster como control positivo. Los péptidos fueron sintetizados por Bachem BioScience (95% de pureza, grado investigación).

20 **[00211]** Se trataron los cultivos en duplicado el día 10 y 12 y luego se lisaron para detectar el contenido de insulina después de 1 semana de tratamiento con péptidos HIP, control e INGAP. Durante el cultivo de 10 días, bajó la producción de insulina y luego, después del tratamiento con péptidos HIP, se volvió a producir insulina.

25 **[00212]** El gráfico de fracción ductal como se muestra en la Fig. 1 ilustra los niveles de insulina en el eje y medidos mediante radioinmunoensayo después de incubar en un cultivo con tejido ductal pancreático humano. El gráfico de fracción de islote indica los niveles de insulina después de la incubación en tejido de islote pancreático humano. Los niveles de insulina basales son significativamente mayores en la fracción de islote que en las fracciones ductales basales.

30 **[00213]** El tejido ductal y de islote fueron separados usando el método Ricordi. Ni la célula ductal ni el cultivo de islote fueron completamente homogéneos por naturaleza. Los estudios además sugieren que las células progenitoras, que son el blanco

para HIP, se hallaban en ambos cultivos, de islote y ductal. Se repitieron los estudios con hallazgos similares mostrados en el siguiente cuadro, con un aumento de cuatro veces en los niveles de insulina mediante radioinmunoensayo entre el tejido ductal cultivado con HIP 2.

5 **[00214]** Los estudios repetidos confirmaron el aumento en insulina tanto en los cultivos de células ductales como de islote predominantemente humanos, con niveles de insulina basal consistentemente de alrededor de 1/3 menores en los cultivos ductales basales comparados con los cultivos de islote, con aumentos similares en el contenido de insulina después de la incubación con péptidos HIP comparados con el control negativo.

10 EJEMPLO 2

[00215] Estudios *In Vivo*. HIP3, HIP1 y HIP2 han sido el objetivo de los estudios *in vivo* en ratones. Los estudios han demostrado que estas variantes HIP, cuando se introducen en ratones diabéticos, estimulan la diferenciación de células progenitoras dentro del páncreas en nuevas estructuras de islotes. Se ha desarrollado un modelo de diabetes en el ratón (Rosenberg y colab., 2004). La cantidad de sujetos fue seleccionada para obtener una cantidad suficiente de animales diabéticos para el estudio y dichos animales fueron asignados aleatoriamente a los grupos de estudio. A todos los animales se les administró dosis mediante inyección intraperitoneal dos veces al día (por la mañana y por la tarde) durante 28 días consecutivos. El tiempo de administración de la dosis permaneció sin cambios (± 2 horas) durante la fase de dosificación. Después de confirmar que el ratón se había vuelto diabético (glucosa en sangre superior a 16,7 mmol/L (300 mg/dL) durante al menos una semana, se les administraron las dosis a los ratones.

[00216] A los ratones se les inyectó por la vía intraperitoneal estreptozocina en una dosis de 40 mg/kg en búfer de citrato, pH 4,5, durante 5 días consecutivos en un intento de volverlos diabéticos. Los ratones debían tener un valor de glucosa en sangre superior a 16,7 mmol/L (300 mg/dL) durante al menos 1 semana para ser considerados diabéticos. Si el nivel de glucosa en sangre en cualquier animal ascendió hasta más de 400 mg/dL, dicho animal fue tratado con insulina. Cada 3 días, a la misma hora cada día, se le realizó un pequeño corte en la cola y se recolectó una gota de sangre. Se determinaron las mediciones de glucosa usando un medidor de glucosa. Las asignaciones de grupo y niveles de dosificación fueron las siguientes de la Tabla 1:

Tabla 2.

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosificación	Volumen de dosis	Cantidad de animales
1	Vehículo	0	100 µl	6
2	HIP3	250 µg	100 µl	6
3	HIP1	250 µg	100 µl	6
4	HIP2	250 µg	100 µl	6

5 [00217] La terminación del estudio incluía lo siguiente: cambios en la glucosa; cambios en los requerimientos de insulina; e histología de páncreas post mortem.

 [00218] Cambios en los requerimientos de insulina. Se observaron reducciones significativas tanto en los requerimientos de la insulina con en la tasa de disminución de los requerimientos de insulina entre los ratones tratados con HIP, como se muestra en la Fig. 2. Los ratones tratados con HIP 2 quedaron completamente libres de insulina para el día 21.

 [00219] Cambios en los niveles de glucosa. Hubo una reducción media en la glucosa entre la basal y los controles en todos los grupos tratados con HIP y, esta reducción fue significativa en todos los grupos tratados con HIP, como se muestra en la Fig. 3. Se observó una disminución del 14,7 % en la glucosa media entre HIP 1 y el control, una disminución del 29,4 % en la glucosa media entre HIP 2 y el control y una disminución del 57,3% de la glucosa media entre HIP3 y el grupo de control. Los datos indican la velocidad de declinación significativamente más rápida en los requerimientos de insulina entre los grupos de ratón tratados con HIP, comparados con los ratones diabéticos. Se observó una cantidad significativamente mayor de islotes después del tratamiento con HIP observado en los páncreas de ratones que fueron seccionados y revisados en cada ratón estudiado. Los páncreas fueron evaluados mediante un histólogo a ciegas, con los siguientes datos de la Tabla 3.

Tabla 3.

	Islotes totales (% de aumento)	Masa total de islotes (µm2) (% de aumento)
Placebo	280	854364
HIP2	454 (62%)	2161782 (153%)
HIP3	410 (46%)	1703513 (99%)

[00220] La diferencia en la cantidad de islotes entre HIP y placebo fue estadísticamente significativa (p=0,022). Incluso, se observó un aumento más pronunciado en el área de islotes entre ratones tratados con HIP y el grupo tratado con placebo. El área de islote en el grupo tratado con HIP2 fue de 360.297 µm(2) comparada con 142,394 µm(2) del grupo tratado con placebo, con 283,918 µm(2) para grupo tratado con HIP3 (p=0,05), como se muestra en la Fig. 4A. La Fig. 4B muestra que HIP2B aumenta la cantidad de islotes en ratones diabéticos. (a) Imágenes representativas de inmunomarcado con insulina en ratones tratados con placebo y HIP. (b) Los islotes marcados contra insulina se delinean en Amarillo para diferenciar estas estructuras de las células sanguíneas autofluorescentes.

[00221] El marcado inmunofluorescente para insulina realizado además en páncreas de ratón demostró un mayor grado de manchado de insulina en ratones tratados con HIP, como se muestra en la Fig. 5. Se cosechó este tejido de páncreas de ratón y se fijó en PFA al 4%, se bloqueó y seccionó. Objetivo 10X, 1,6 optivar.

EJEMPLO 3

[00222] El siguiente ejemplo describe métodos ejemplares para sintetizar y purificar HIP y HIP Optimizado.

[00223] La síntesis de péptidos HIP se realizó mediante el procedimiento general en fase de Merrifield (Merrifield, R. B. 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154) usando la química estándar de protección con Fmoc (Fields, G. B. y Noble, R. L. 1990, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 161-214).

[00224] Se escindió el péptido protegido acoplado a la resina y se desprotegió mediante un tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de un

depurador para obtener el producto crudo. Se obtuvo el producto de péptido purificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, fase inversa (HPLC).

5 **[00225]** La derivatización de péptidos con polietilén glicol (PEG) puede consistir en la introducción de unidades discretas de PEG en un rango de peso molecular entre 300 y 43.000.

10 **[00226]** Ejemplo A: Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH₂ (HIP2B) (NR ID DE SEC: 7). Comenzando con la resina Rink amida, resina de 4-[2',4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi, los aminoácidos protegidos con Fmoc se introducen secuencialmente y se acoplan usando HOBt y DCC (N-hidroxibenzotriazol y diciclohexilcarbodiimida). La desprotección del Fmoc de la resina de partida y el grupo protector Fmoc de cada aminoácido se logró con piperidina al 20% en dimetilformamida. Luego de la remoción del grupo protector Fmoc del aminoácido N-terminal, Ile, el péptido protegido ligado a la resina se acetiló con anhídrido acético al 20% en cloruro de metileno. La desprotección de los grupos de cadenas laterales y la escisión del péptido de la resina se logró con ácido trifluoroacético al 95% con agua 2,5 % y triisopropilsilano 2,5%. Luego de un tratamiento de una hora, se precipitó el péptido de la solución de escisión con dietiléter, se filtró y secó.

15 **[00227]** Purificación. El producto crudo se purificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento fase inversa (HPLC) en un soporte C-18 usando TFA 0,1% en agua y TFA 0,1% en acetonitrilo como los búferes A y B, respectivamente. Se utilizó un gradiente en aumento del buffer B para eluir el producto. El intercambio de TFA residual en acetato se logró volviendo a aplicar las fracciones del producto en una columna HPLC C-18, lavando con NH₄OAc 0,1 M acuoso y eluyendo el producto con un gradiente de ácido acético al 1% en agua y acetonitrilo como la fase móvil. Las fracciones del producto crudo se agruparon y liofilizaron. La identidad y homogeneidad del péptido se confirmó mediante el análisis composicional del aminoácido, HPLC analítico y análisis espectral de masa.

20 **[00228]** Ejemplo B: IGLHDPTQGTEPNG (HIP2) (NR ID DE SEC: 4). Comenzando con la resina Fmoc-Gly-Wang, se ensambló la secuencia del péptido de la misma forma que en el Ejemplo A. El término amino no se acetiló para proveer un péptido con un término amino y carboxilo libre sin bloquear. El producto purificado se aisló como en el Ejemplo A.

30

[00229] Ejemplo C: (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂)₂ (HIP2B CysDimer)

(NR ID DE SEC: 19). La síntesis del péptido en su forma tiol libre se realizó como se describió en el Ejemplo A. Se oxidó el producto crudo para formar un dímero disolviendo alrededor de 2 grs de péptido con 2 ml de ácido acético y una dilución con ~500 ml de agua destilada, se ajustó el pH a ~8,2 agregando una solución de NH₄OH al 20% en forma de gotas. Se dejó agitar la solución durante la noche a temperatura ambiente. La reacción no alcanzó a completarse durante la noche. Para completar la reacción se agregó una solución al 1 % de ferricianida de potasio hasta que persistiera un color verde amarillento permanente. Se juzgó que la reacción estaba completa tal como lo determina la prueba de Ellman y el análisis HPLC. La solución del péptido oxidado luego se agitó con 3-5 grs. de resina de intercambio de iones AG-1 X2 (forma cloruro) durante 30 minutos, se filtró y se ajustó el pH en ~5 con ácido acético antes de la purificación por HPLC.

[00230] Ejemplo D: (IGLHDPTQGTEPNGC)₂ (HIP2 Cys Dímero) (NR ID

DE SEC: 13). Comenzando con la resina Fmoc-Cys(Trt)-Wang se preparó la secuencia del péptido como en el Ejemplo 2. Se logró la precipitación del éter del producto crudo, oxidación en dímero y purificación HPLC como se describe en el Ejemplo C.

[00231] Ejemplo E: Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂ (HIP2B Cys) (NR ID

DE SEC: 16). La síntesis y purificación de la secuencia primaria monomérica se logra como en el Ejemplo A.

[00232] El siguiente ejemplo describe un método ejemplar para preparar

HIPs bloqueados. Los péptidos HIP bloqueados se prepararon mediante la Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés). La premisa fundamental de la síntesis en fase sólida es que los aminoácidos pueden ensamblarse dentro de un péptido de cualquier secuencia deseada mientras un extremo de la cadena se fija a un soporte insoluble. Como se mencionó anteriormente, en la SPPS práctica el término carboxilo del péptido se acopla al polímero. Después de que la secuencia deseada de aminoácidos ha sido ligada en el soporte, se puede aplicar un reactivo para escindir la cadena peptídica del soporte y liberar al péptido crudo en solución. Todas las reacciones involucradas en la síntesis se llevan a cabo hasta completarlas si es posible, de manera que se pueda obtener un producto homogéneo.

[00233] Cuando el C-terminal de un péptido es una amida, el derivado es una amida peptídica. Las amidas de péptido son derivados extremadamente importantes ya que muchas hormonas peptídicas naturales están presentes como amida. Para sintetizar amidas peptídicas se han desarrollado resinas en fase sólida que resultan en amidas peptídicas directamente luego de la escisión. Cuando el N-terminal es un grupo acetilo, el péptido se ensambla desde el C-terminal al N-terminal. El N-terminal luego se acetila usando anhídrido acético en presencia de una base.

[00234] Se utilizan los derivados de aminoácido Fmoc para construir la secuencia. Después de ligar la secuencia deseada de aminoácidos junto con el soporte, se acetila el péptido, se filtra y seca. La resina peptídica acetilada luego se escinde con ácido trifluoroacético (TFA) que contiene depuradores para liberar el péptido del soporte así como también, a todos los grupos protectores. Luego se realiza la purificación sobre el material crudo usando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

[00235] Ejemplo F: Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH₂ (HIP2B Cys-PEG) (NR ID DE SEC: 25). La forma purificada monomérica del péptido del Ejemplo 5 (1,1 equivalente) fue disuelta en un búfer de acetato (0,1M, pH=6.5). Se preparó una solución (1 equivalente) de polietilén glicol derivado de maleimida (PEG maleimida) en agua destilada y se agregó a la solución del péptido con agitación. Se ajustó el pH de la solución resultante a ~6,5 con una solución de NH₄OH diluido, se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se acidificó con unas pocas gotas de ácido acético y se purificó mediante.

[00236] Ejemplo G: IGLHDPTQGTEPNGC(PEG) (HIP2 Cys-PEG) (NR ID DE SEC: 22). Comenzando con la resina Fmoc-Cys(Trt)-Wang, la síntesis y purificación de la secuencia primaria como se describe en el Ejemplo B. La derivatización con maleimida PEG seguida por la purificación por HPLC es como en el Ejemplo F.

[00237] Ejemplo H: (PEG)-IGLHDPTQGTEPNG (PEG -HIP2) (NR ID DE SEC: 91). La secuencia del péptido ligada a la resina primaria se preparó como en el Ejemplo 2. Luego de la desprotección con Fmoc del N-terminal N1e, se derivatizó la resina peptídica protegida con PEG-ácido carboxílico usando HOBt y DCC como agentes de acoplamiento. La escisión y purificación del (PEG)-péptido de la resina fue como se describió en el Ejemplo A.

EJEMPLO 4

[00238] El siguiente ejemplo ilustra la farmacocinética de la administración intramuscular y subcutánea de HIP1, que se escinde en HIP2.

[00239] Se evaluó la farmacocinética de la administración de HIP en 20 ratas según la vía de administración. De manera similar a los hallazgos del INGAP derivados de hámster, la vía intramuscular (IM) proporcionó una mejor concentración en sangre del material, pero las determinaciones de vida media fueron inferiores a los 30 minutos según las mediciones ELISA, como se ilustra en la Figura 6.

[00240] La vía subcutánea (SC) de administración demostró una vida media levemente mayor, como se muestra en la Figura 7, pero los niveles detectados por ELISA fueron inferiores que los de la vía IM. La vía IM provee una vida media levemente mayor en sangre que la vía SC.

EJEMPLO 5

[00241] El siguiente ejemplo muestra la estabilidad del péptido HIP2B péptido en un estudio de congelamiento-descongelamiento.

[00242] Procedimiento experimental. Se inició el estudio con dos grupos de ocho muestras cada uno. Un grupo se mantuvo a 4-8 °C y el otro a 25 °C, como parte de un estudio de estabilidad de 2 meses. Cada muestra contiene 4,57 miligramos de HIP2B en 5 microlitros de agua destilada. Se retiró una muestra de cada grupo de temperatura y se colocó en un freezer a menos de 20 °C para almacenamiento, cada siete días hasta que se pudiera realizar el análisis LC/MS. Se evaluó una serie de muestras después de 1, 2 y 3 semanas en el estudio de estabilidad contra una muestra de control de HIP2B que se había preparado al iniciar el estudio y se almacenó a -20 °C. Después de tres semanas de prueba de estabilidad a cada una de las temperaturas descriptas anteriormente, todas las muestras se mantuvieron sin cambios, tal como lo determina LC/MS y, por lo tanto, se consideró estable a 1, 2 y tres semanas. Estos estudios de estabilidad de congelamiento-descongelamiento sugieren que el cambio de carbono ocurre en la unión de Pro-Asn en la secuencia HIP cuando se almacena en sulfóxido de dimetilo (DMSO), la secuencia permanece estable durante varios meses cuando se almacena en solución salina isotónica a -20°C.

EJEMPLO 6

[00243] HIP Optimizado demuestra una estabilidad aumentada del péptido en el transcurso del tiempo (T) con respecto a las proteasas séricas *In Vitro* (T).

[00244] Se incubaron los péptidos en plasma humano, a 37°C. Las incubaciones de la muestra se realizaron durante un período de 1 hora. Se utilizaron para seguir las reacciones, puntos de tiempo individuales de 1, 5, 10, 30, y 60 minutos. La desactivación de las proteasas plasmáticas en cada punto del tiempo se lograron calentando las muestras a 100 °C durante 1 minuto. Luego de realizarlo, se evaluaron las muestras tratadas mediante cromatografía de fase inversa en serie con espectrometría de masa, HPLC/LC-MS, contra las muestras de control.

[00245] Se evaluó el plasma tratado con los péptidos HIP y HIP Optimizado a 1, 5, 10, 30 y 60 minutos. Para cada punto de tiempo, se pipetearon 0,70 ml de plasma en un tubo de ensayo de 10 ml. A cada uno se agregaron 0,30 ml de la solución madre del péptido HIP o HIP Optimizado péptido (1,66 mg/ml) preparado en una solución salina regulada con fosfato. Las muestras plasma/péptido se incubaron a 37°C para cada punto en el tiempo calentando a 100 °C para inactivar la actividad proteolítica de las proteasas plasmáticas. Luego de la inactivación, se diluyeron las muestras con 1 ml de H₂O, se centrifugaron y se retiró el líquido sobrenadante para analizar.

[00246] Se analizaron las muestras en una columna C-18 fase inversa (50 mm x 2.0 mm) usando 0,07% TFA en H₂O como búfer A y 0,07% TFA en acetonitrilo como búfer B. Se utilizó un gradiente lineal de 98% A/2% B progresando a 30% A/70% B durante 10 min. a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. Se controló el eluyente mediante UV a una longitud de onda de 220 nm y mediante espectroscopía de masa. Las comparaciones de perfiles cromatográficos de los péptidos tratados con plasma (37°C) contra las muestras de referencia del péptido y controles de plasma se utilizaron para determinar la estabilidad relativa del péptido al tratamiento con plasma.

Controles

T = 0: Plasma (0,7 ml) más solución madre del péptido (0,3 ml), calentar 100°C 1 min. agregar 1 ml H₂O, centrifugar.

30 Control de Plasma en segundo plano: 0,7 ml plasma más PBS (0,3 ml), calentar 100°C 1 min., agregar 1 ml H₂O, centrifugar.

Péptido de referencia tratado con calor: Solución madre del péptido (0,3 ml) más 0,7 ml PBS, calentar 100°C 1 min., agregar 1 ml H₂O.

Péptido de referencia sin calor: Solución madre del péptido (0,3 ml) agregar 0,7 ml PBS más 1 ml H₂O.

5 *Resultados.*

HIP2 (IGLHDPTQGTEPNG) (NR ID DE SEC: 4) Es evidente la evidencia de proteólisis por la aparición de un componente nuevo ($\approx 5\%$) después de sólo 1 minuto de incubación de HIP2. El nuevo componente continúa aumentando en el tiempo. A los 30 min., representa $\approx 50\%$ y a los 60 min. la concentración es de $\approx 70\%$. Se identifica al metabolito principal como GLHDPTQGTEPNG (NR ID DE SEC: 92), indicando la pérdida primaria de isoleucina N-terminal. Además, existe evidencia de la presencia una pequeña cantidad de HDPTQGTEPNG (NR ID DE SEC: 93) resultante de la pérdida de IGL.

[00247] HIP2B (Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH₂) (NR ID DE SEC: 7) La forma C-amida N-acetilada de HIP2 parece ser completamente estable con respecto a las proteasas plasmáticas después de 1 hora de incubación a 37°C.

[00248] HIP3 (IGLHDPTQGTEPNGE) (NR ID DE SEC: 3) La proteólisis de HIP3 es más lenta con respecto a la de HIP2. Después de 60 min., la concentración inicial de HIP3 es $\approx 50\%$. El metabolito principal identificado es HDPTQGTEPNG (NR ID DE SEC: 93), indicando la pérdida de IG.

[00249] HIP3B (Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH₂) (NR ID DE SEC: 5) La forma bloqueada de HIP3 es completamente estable hasta 1 hora después de la incubación de plasma.

[00250] HIP2B Cys-Dímero (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂)₂ (NR ID DE SEC: 19) Este compuesto parece ser estable con respecto a las proteasas plasmáticas durante al menos 1 hora. Sin embargo, el tratamiento por calentamiento a 100°C de las muestras incubadas, así como también el control T = 0, indicaron la conversión del material de partida en un aducto de cistina cuya estructura es Ac-IGHDPTQGTEPNGC(C)-NH₂. (NR ID DE SEC: 94) La conversión parece deberse a un desplazamiento por parte de la cisteína, del plasma, cuando las muestras se calientan a 100°C.

[00251] HIP2B Cys-PEG (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH₂) (NR ID DE SEC: 22). Este constructo de peso molecular elevado es estable con respecto a las proteasas plasmáticas durante hasta 1 hora.

[00252] *Resultados.* La proteólisis de los péptidos HIP2 y HIP2B en plasma se muestra en la Fig. 8. Los resultados de HIP2 mostraron la aparición de un nuevo componente (~5%) después de sólo 1 minuto de incubación en plasma. Este nuevo componente continúa aumentando en el transcurso del tiempo y el metabolito principal se identifica como la secuencia HIP2 con pérdida primaria de la isoleucina N-terminal y, secundariamente, la pérdida de los primeros tres aminoácidos. HIP2B parece completamente estable para las proteasas plasmáticas después de 1 hora de incubación a 37°C. Las formas bloqueadas de HIP2 y HIP3 referidas como HIP2B y HIP3B son claramente más estables para las proteasas plasmáticas durante hasta 1 hora con respecto a las estructuras no bloqueadas. El dímero y derivados PEG de HIP2b son además muy estables.

15 EJEMPLO 7

[00253] Utilizando una técnica para desarrollar una línea celular humana inmortalizada establecida de células epiteloides pancreáticas conocida PANC-1, se evaluó el impacto *in vitro* del impacto de HIPs y HIP Optimizados sobre la producción de insulina. Esta línea celular demuestra la capacidad para diferenciar en otros tipos de células pancreáticas luego de la señalización adecuada. Por lo tanto, las células PANC-1 fueron utilizadas como sustituyente de las células progenitoras naturales del páncreas.

[00254] Se sembraron las células Panc-1 en matraces T75 en un medio DMEM que contenía suero fetal bovino al 10%. Se incubaron las células a 37°C, 5% CO₂ durante 24 horas y luego se trataron con HIPs a una concentración final de 167 nM. Este tratamiento se realizó una vez al día durante cuatro días. En el quinto día, se rompieron las células para obtener lisados celulares. En estos extractos celulares, se determinaron los niveles de proteínas totales y se utilizaron 50 microgramos de proteína total para realizar el análisis Western Blot. Las muestras que contienen 50 microgramos de proteínas fueron diluidas en un búfer de carga que contenía o no 5% del agente reductor de beta-mercaptoetanol, y se cargaron dentro de cada pocillo del gel. Después de la electroforesis y transferencia de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa, se detectó la presencia de

insulina mediante el uso como anticuerpo primario de un anticuerpo policlonal anti-insulina en pollo (ab14042, dilución de 1/2000), y como anticuerpo secundario al anticuerpo policlonal de HRP en conejo conjugado anti-pollo (dilución 1/1000 para el gel NIT y 1/2000 para el gel PANC-1).

5 **[00255]** La Fig. 9 es el análisis Western Blot que muestra la expresión de la insulina humana a partir de células PANC-1 como respuesta a la incubación con HIP, HIP Optimizado. El siguiente panel rotulado A muestra las bandas para insulina en las células Panc-1 cuando se cargaron las muestras en condiciones no reductoras. Los resultados indican que HIP2, HIP2B, y HIP2 dimerizados estimulan más producción de insulina HIP2
10 Pegilado o control. En condiciones reductoras, los enlaces de disulfuro que conectan dos cadenas de polipéptido en la insulina están reducidas y, por lo tanto, se separa la cadena y, en esta condición, el anticuerpo de insulina no reacciona con la insulina. En contraste con las condiciones no reductoras, la molécula de insulina está completa y es reconocida por el anticuerpo.

15 **[00256]** La Fig. 9B muestra las proteínas totales contenidas en las mismas membranas que en la Fig.9A. La determinación de los niveles de proteína totales mediante la tinción de Ponceau demuestra que las diferentes bandas contienen cantidades similares de proteínas. Se determinaron los niveles de proteínas totales en las células NIT-1 y PANC-1 y se utilizaron 50 microgramos de proteínas totales para realizar el análisis
20 Western Blot. Las muestras que contienen 50 microgramos de proteínas fueron diluidas en un búfer de carga que contenía o no 5% del agente reductor beta-mercaptoetanol, y se cargaron en cada pocillo del gel.

[00257] La tinción de Ponceau demuestra que las diferencias en la expresión de insulina que responden a diferentes HIPs y HIP Optimizados no tienen relación con la
25 cantidad de proteína cargada en los pocillos. Además, la falta de señal para insulina, por ejemplo, la membrana en condiciones reductoras, no se atribuye a la falta de proteína.

EJEMPLO 8

[00258] Efectos de péptidos HIP y HIP Optimizado sobre la morfología celular de líneas celulares de PANC-1. Se trataron las células con péptidos HIP y HIP
30 Optimizado durante cuatro días. En la Fig. 10A, tomada el día 7 con una magnificación de 200X, se pueden observar diferencias morfológicas entre la condición del control y las

células tratadas con HIPs y HIP Optimizados con células histológicamente más diferenciadas, particularmente en las células tratadas con HIP2B. La Fig. 10B muestra el avance de los cambios en la morfología celular durante 7 días, estando el control en la parte superior, HIP2 en la mitad, y HIP2B abajo. Las fotos se tomaron los días 1, 2, 3, 5, y 7 con una magnificación de 200X. Mientras que las células tratadas con control no sufrieron ningún cambio, las células tratadas con HIP2 y HIP2B se desvían significativamente de su aspecto inicial. La Fig. 10C muestra el avance de cambios morfológicos cuando HIP2 Dímero y HIP2 PEG se trataron en cultivo de células PANC-1. En síntesis, las células tratadas con el control no sufrieron ningún cambio visual significativo, las células tratadas con HIP2 y HIP2B se desvían significativamente de su aspecto inicial.

EJEMPLO 9

[00259] Actividad de HIP 2B en cultivo de tejido pancreático humano. El Laboratorio de Islotes Humanos de la University of Pennsylvania, mostró el impacto de los péptidos HIP y HIP Optimizado sobre los cultivos de células ductales pancreáticas humanas. La fracción ductal de las células pancreáticas humanas se cultivó durante 10 días en una matriz de colágeno y luego se trató cada día con HIP2B. Se marcaron las células mediante doble tinción con anticuerpo para CK19, un marcador para tejido ductal, y tinción con DAPI para mostrar núcleos e insulina. Como se muestra en la Fig. 11, las células sufrieron cambios morfológicos que indujeron la expresión de insulina en células que, de otro modo, era negativas para insulina.

EJEMPLO 10

[00260] Datos del estudio piloto del impacto de los péptidos HIP y HIP Optimizado en el modelo diabético no obeso.

[00261] Consecuentemente con los datos de ratones tratados con STZ (arriba) sobre la masa de islote aumentada, área y cantidad aumentada, los ratones modelo NOD del estudio piloto mostraron la evidencia preliminar del potencial de HIP Optimizado para proporcionar una mejor eficacia en términos de neogénesis de islote, medido según los niveles del péptido C en ratones luego del tratamiento con HIP durante 39 días.

[00262] Se utilizó el modelo diabético no obeso (NOD) como modelo para diabetes autoinmune tipo 1. Esta forma de diabetes es la más desafiante ya que el daño

subyacente en el páncreas y su producción de insulina se debe al ataque inmunológico. Por lo tanto, para poder mostrar una neogénesis definitiva de islote en esta forma de diabetes, se debe utilizar un agente de tolerancia inmunológica en combinación con HIP. El modelo de ratón NOD es un modelo extremadamente difícil debido a que muchos ratones pueden volverse diabéticos sólo transitoriamente y entran en remisión, mientras que otros ratones desarrollan diabetes severa. La intervención de tiempo en este modelo de ratón transgénico es difícil de determinar.

[00263] En un estudio preliminar que utiliza un agente de tolerancia inmunológica, lisofilina (LSF) en desarrollo, a tres ratones NOD que se volvieron diabéticos se les asignó aleatoriamente placebo más LSF, HIP2 más LSF y HIP2B más LSF. Como se muestra en la Fig. 12, del grupo que recibió LSF en el momento adecuado, dos ratones tratados con HIP respondieron con niveles de glucosa mejorados de manera estable durante el estudio, comparado con el ratón NOD tratado con LSF solo y que tuvo elevaciones graduales de glucosa durante todo el estudio. Aunque no es un estudio estadísticamente significativo, estos datos proveen evidencia muy convincente para la búsqueda de la combinación de un agente de tolerancia inmunológica y HIP para la diabetes tipo 1.

EJEMPLO 11

[00264] Impacto de HIP2B y HIP2 sobre el receptor HIP. Los siguientes grupos de estudios demuestran que HIP2B es tan eficaz como HIP2 en la interacción con el receptor de membrana citoplasmática para HIP y tráfico desde el receptor hasta el núcleo. El receptor para el Péptido ProIslet Humano fue marcado usando el método doble anticuerpo en una línea celular pancreática humana estable. El primer anticuerpo era un anticuerpo policlonal en conejo y el segundo era un anticuerpo cabra anti-conejo marcado con tinción fluorescente Cy3.

[00265] Estas células se desarrollan normalmente en un medio libre de suero y luego se trataron con tripsina, se desestabilizaron y se volvieron competentes para experimentar cambios en el desarrollo. Las células fueron cultivadas en un medio libre de suero (SFM) con y sin HIP, y en un medio libre de suero con tripsina (TSFM). Esto es para demostrar que la simple desestabilización no active los cambios en el desarrollo.

[00266] Cuando se trataron con HIP en condiciones estables, no resultaron cambios. Cuando se trató con HIP en condiciones competentes para el desarrollo, el receptor marcado responde a la presencia de HIP siendo encapsulado por la membrana citoplasmática y moviéndose hacia la membrana nuclear donde se reciben los signos para la diferenciación.

[00267] Cuando se trataron con HIP en condiciones estables, no resultaron cambios. Cuando se trataron con HIP en condiciones competentes para el desarrollo, el receptor marcado responde a la presencia de HIP siendo encapsulado por la membrana citoplasmática y moviéndose hacia la membrana nuclear donde se reciben los signos para la diferenciación.

[00268] La Fig. 13 demuestra que las células PANC-1 tratadas con tripsina e incubadas en un medio libre de suero se diferencian en agregados de células de islote. El receptor HIP se regula ascendentemente durante la diferenciación de células pancreáticas humanas y parece interactuar con HIP2 y HIP2B interactúa con el receptor HIP. HIP2 y HIP Optimizado2B estimuló el tráfico desde el receptor HIP hasta la membrana citoplasmática dentro de las células estimulando la diferenciación de las células progenitoras pancreáticas en nuevos islotes que producen insulina.

[00269] La Fig. 14 muestra al anticuerpo del receptor HIP anti-humano en conejo marcado con Cy3 en (A) TSFM solo y (B) TSFM con 150 μ M (HIP Optimizado2B) durante 48 horas. HIP estimula la proteína ligada a la membrana del receptor para ser englobada por la membrana citoplasmática y transportada hasta la membrana nuclear.

[00270] La Figura 15 muestra análisis inmunofluorescentes repetidos del impacto de HIP Optimizado2B sobre el receptor HIP (EXTL3). Los paneles superiores indican la tinción inmunofluorescente con Cy3 de EXTL3 (rojo). En el panel inferior de imágenes, la inmunotinción con Cy3 de EXTL3 ha sido superpuesta con la tinción DAPI (azul) del núcleo. Se desarrollaron células en un medio de crecimiento estándar como control y se compararon con las células desarrolladas en un medio libre de suero (SFM) en presencia o ausencia de HIP. Las flechas amarillas muestran ejemplos de la expresión de superficie de EXTL3 desarrollada en un medio de crecimiento estándar. Los bordes celulares están bien definidos indicando la expresión en superficie de EXTL3 en la membrana del plasma. La flecha amarilla delinea los bordes celulares mientras que el

núcleo se muestra en azul. Las imágenes medias son células desarrolladas en SFM. EXTL3 se localiza en el citoplasma como lo indica la tinción con Cy3 citoplasmático. Las flechas verdes muestran la falta de tinción en la posición del núcleo. Las flechas verdes en la imagen inferior de las células desarrolladas en SFM, muestran un manchado DAPI azul intenso del núcleo indicando la carencia de EXTL3 en el núcleo. En la imagen superior de las células desarrolladas en SFM y HIP, la presencia de la inmunotinción EXTL3 en el núcleo indicada por las flechas azules sugiere una traslocación de EXTL3 dentro del núcleo. En la imagen inferior de las células desarrolladas en SFM y HIP, las flechas azules indican la posición del núcleo. En la imagen inferior, existe una superposición de la tinción con EXTL3-Cy3 y la tinción con DAPI nuclear que corrobora la localización nuclear de EXTL3 (flechas azules). Barra a escala= 20 μ m en todas las imágenes.

[00271] La Figura 16 demuestra que HIP Optimizado2B aumenta la traslocación del receptor HIP (EXTL3) desde la membrana citoplasmática hasta el núcleo en las células PANC-1. Análisis Western Blot de los niveles HIP (EXTL3) en las fracciones citosólicas y nucleares aisladas en los puntos de tiempo indicados. El análisis Western Blot muestra niveles nucleares mayores del receptor HIP (EXTL3) observados 6 horas después del cultivo en SFM sin HIP. El agregado de HIP2 y HIP2B en el medio de cultivo aumentó la translocación nuclear de EXTL3, demostrada mediante niveles nucleares superiores de esta proteína a los 30 minutos. Estas comparaciones demuestra que, en presencia de HIP, se produce un aumento en el tiempo de translocación de EXTL3 desde el compartimiento citoplasmático hasta el núcleo y que se puede modular la translocación nuclear de EXTL3 mediante la presencia de HIP. Los Western Blots son resultados repetidos usando estas células y puntos en el tiempo.

EJEMPLO 12

[00272] En un estudio de asignación aleatoria, controlado con placebo de HIP2, HIP2B v. placebo, se trataron ochenta (80) ratones con STZ para inducir diabetes. Se controlaron los ratones hasta que alcanzaron un nivel de hiperglucemia coherente con el inicio de diabetes. Los niveles de glucosa basal para ratones intervenidos promediaron 300 +/- 6 mg/dL y no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa entre los grupos de intervención con HIP y el grupo placebo ($p=0,301$).

[00273] Después de 36 días, todos los ratones tratados con HIP no recibieron insulina y las glucosas tenían unas tendencias significativamente descendentes comparadas con el grupo de placebo. Se sacrificaron ratones seleccionados aleatoriamente durante el transcurso del estudio inmunohistoquímico de sus páncreas. Los análisis del péptido C en suero están en curso. Después de 39 días de intervención, los ratones restantes se analizarán diariamente según los niveles de glucosa y la salud en general durante los próximos 60 días.

[00274] La evaluación preliminar demuestra que el tratamiento con HIP resulta en una reducción del 38,7 % comparada con el placebo ($p < 0,05$). Además, la estabilización de HIP2 para formular HIP2B no disminuye la actividad *in vivo*.

[00275] Como se muestra en la Figura 17, el tratamiento con HIP resultó en niveles de glucosa que eran 116 mg/dL inferior al placebo ($\downarrow 38,7\%$ $p < 0,05$). Todos los ratones tratados con HIP no necesitaron insulina. El 56% (9/16) de los ratones tratados con HIP tenía niveles de glucosa de < 230 mg/dL. El 9% (1/11) de los ratones tratados con placebo tenía niveles de glucosa de < 230 mg/dL. El HIP 2B es significativamente más estable *in vitro* en suero a 37 grados. Además, HIP 2B tiene una vida media más larga en solución salina. Las modificaciones a HIP2 para formar HIP 2B no disminuyeron la actividad *in vivo*.

[00276] Para evaluar el potencial terapéutico de HIP2B, se utilizó un modelo de ratón con diabetes inducida con STZ. Se inyectaron sesenta ratones C57BL/6J por la vía intraperitoneal con STZ a una dosis de 50 mg/kg en un búfer de citrato, pH 4,5, durante 5 días consecutivos para volverlos diabéticos. Se asignaron aleatoriamente los ratones al estudio cuando el nivel de glucosa en sangre era de ≥ 200 mg/dl durante dos días consecutivos. Se controló la glucosa en sangre diariamente usando una gota de sangre recolectada de un pequeño corte realizado en la punta de la cola. Se determinaron las mediciones de glucosa usando un medidor de glucosa. Si el nivel de glucosa en sangre de cualquier animal alcanzaba los ≥ 324 mg/dL, se trataba al animal con insulina (1 Unidad por día, insulina glargina, por la vía intramuscular) hasta que la glucosa bajara por debajo de 324 mg/dL. Se mantuvo un registro de dosificación de insulina, de manera que pudieran realizarse las comparaciones de requerimiento de insulina.

[00277] Los animales fueron asignados a tres grupos, como se muestra en la Tabla 4. Se inyectaron por la vía intraperitoneal a los animales diabéticos dos veces al día (por la mañana y por la tarde) durante 39 días consecutivos con cualquier vehículo de control, HIP2 (300 µg) o HIP2B (300µg). Se sacrificaron los ratones de cada uno de los brazos de estudio (Grupos 1-3) el día 39. La noche anterior al sacrificio, se hizo ayunar a todos los ratones y se midió el nivel de glucosa por la mañana antes de ser sacrificados, esta valor se consideró como nivel de glucosa en ayunas. Se mantuvo al resto de los grupos de animales sin intervención médica desde el día 40 al 60. Cuando era apropiado, se realizaron mediciones de glucosa diarias por la mañana y se les administró insulina. Las variables sometidas a estudio incluyeron lo siguiente: 1) cambios en la glucosa en sangre y 2) cambios en los requerimientos de insulina.

Tabla 4: Asignación aleatoria de ratones diabéticos inducidos con STZ

Grupo	Tratamiento	Dosificación	Nivel de dosis	Volumen de la dosis	Cantidad de animales
1	Vehicle	2 Inyecciones IP diarias x 39 días	0	100 µl	20
2	HIP2	2 Inyecciones IP diarias x 39 días	300 µg	100 µl	20
3	HIP2B	2 Inyecciones IP diarias x 39 días	300 µg	100 µl	20

[00278] Durante el transcurso del estudio, ambos grupos, HIP2 y HIP2B experimentaron una disminución significativa en los niveles de glucosa en sangre con respecto al grupo de control. Sin embargo, no hubo diferencia en el nivel de glucosa en sangre entre los dos grupos HIP. La Figura 17 demuestra que, para el día 36, las modificaciones a HIP 2 para formar HIP 2B no disminuyeron la actividad *in vivo*. El tratamiento con HIP resultó en niveles de glucosa que eran de 116 mg/dL menos que el placebo (↓38,7% p<0,05). Todos los ratones tratados con HIP no necesitaron insulina. Cincuenta y cinco (56) % (9/16) de los ratones tratados con HIP tuvieron niveles de glucosa de <230 mg/dL. Nueve (9) % (1/11) de los ratones tratados con placebo tuvieron niveles de glucosa de < 230 mg/dL.

[00279] La Figura 17 es un gráfico que muestra los niveles de glucosa promedio diarios en un modelo de ratón diabético provocado por STZ luego de la administración de HIP2, HIP2B y placebo. El nivel de glucosa basal media era de 300 mg/dL $\pm$ 2 mg/dL, sin presentar diferencias significativas entre los grupos tratados con placebo o HIP ($p=0,301$).

[00280] La Figura 18 es un gráfico que muestra los niveles de glucosa diarios entre los grupos de ratones tratados con HIP2B (verde), de control (púrpura) y tratados con placebo. Las pendientes de las líneas de cada grupo (Figura 18) representan la velocidad de cambio en los niveles de glucosa, referida como “velocidad de regeneración”. El tratamiento con HIP2B resultó en una tasa de caída (velocidad de regeneración) en niveles de glucosa de -0,602 comparada con la tasa de subida en los niveles de glucosa dentro del grupo tratado con placebo que tiene una tasa de subida en la glucosa de +0,381 durante el transcurso del estudio desde el día 1 al 39.

[00281] La Figura 19 muestra las diferencias en glucosa entre el día 1 y el día 38 del estudio comparando HIP2B, HIP2 y placebo. La Figura 19 muestra el control mejorado de la glucosa entre los receptores de los grupos de ratones tratados con HIP Optimizado2B (amarillo), HIP2 (verde) y control (azul) al comienzo y al final de la intervención. El grupo de control tuvo un aumento medio partiendo de la línea base de 28,9 mg/dL a 334,6 mg/dL. Los grupos HIP2B y HIP2 tuvieron reducciones significativas con respecto a la línea de base con una glucosa media sin ayuno de 235,3 mg/dL en el grupo de HIP2B ($p=0,024$ del control) y 231,6 mg/dL en el grupo de HIP2 ($p=0,029$ del control).

[00282] La Figura 20 muestra los niveles de glucosa en ayunas al cierre del estudio entre los grupos de tratamiento. El grupo de tratamiento con HIP Optimizado2B tenía un valor de glucosa media en ayunas al final del estudio de 106,7 mg/dL $\pm$ 0,58 mg/dL ($p=0,046$) comparado con los controles tratados con placebo que tenían un valor de glucosa media en ayunas de 258,00 $\pm$ 84,5 mg/dL. Los ratones tratados con HIP2 no bloqueado tenían un valor de glucosa media en ayunas de 115,3 mg/dL $\pm$ 16,5 mg/dL ($p=0,050$) comparados con el grupo tratado con placebo.

[00283] La Figura 21 muestra los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa realizada en animales luego del transcurso del tratamiento y antes de sacrificarlos.

HIP2B Optimizado es significativamente más estable *in vitro* en suero a 37 grados. Además, HIP2B Optimizado tiene una vida media más larga en solución salina. Las modificaciones a HIP 2 para formar HIP 2B no disminuyeron la actividad *in vivo*.

Ejemplo 13

5

[00284] Para evaluar el potencial terapéutico y la dosis mínima eficaz de HIP2B necesaria para mejorar significativamente el control glucémico, se llevó a cabo un estudio dosis-respuesta utilizando un modelo de ratón con diabetes inducida por STZ.

[00285] La Figura 22 muestra los resultados del análisis dosis-respuesta de HIP2B llevado a cabo para evaluar y comparar los efectos de HIP Optimizado2B sobre el control de glucosa cuando se administra en diferentes dosis a un modelo de diabetes en ratón para determinar la dosis potencial menor que produce la máxima eficacia. Este estudio era un ensayo de asignación aleatoria para determinar el impacto de cinco concentraciones de HIP2B sobre el control glucémico y atenuación de la diabetes en un modelo de ratón tratado con STZ. Los grupos de tratamiento estaban comprendidos entre un máximo de 1000 microgramos BID a 0,1 microgramos BID de HIP Optimizado2B en 100 ul de solución salina isotónica. Los seis grupos de estudio se listan a continuación.

Artículo de prueba	Dosificación equivalente en el hombre (60 kg)	Dosis ratón/día = mg/kg/día (peso ratón ~20 gramos)
1	100 mg/kg/día 6.000 mg/día	1.000 mcg/100µl BID= 2 mg/día = 100 mg/kg/día
2	10 mg/kg/día 600 mg/día	100 mcg/100µl BID= 0,2 mg/día = 10 mg/kg/día
3	1 mg/kg/día 60 mg/día	10 mcg/100µl BID= 0,02 mg/día = 1 mg/kg/día
4	0,1 mg/kg/día 6 mg/día	1 mcg/100µl BID= 0,002 mg/día = 0,1 mg/kg/día
5	0,01 mg/kg/día 60 mg/día	0,1 mcg/100µl BID= 0,0002 mg/día = 0,01 mg/kg/día
6	Placebo salino	Placebo salino 100 µl BID

[00286] Se controlaron los niveles de glucosa diariamente en ratones a ~0900-1100, independientemente de los patrones de alimentación de los ratones. Debido a las variaciones de glucosa potencial en el momento de las mediciones de glucosa diaria, se calcularon los valores móviles de glucosa promedio de cinco días diariamente para cada

grupo de tratamiento. El impacto de las concentraciones de HIP2B se evaluó mediante 1) niveles promedio de glucosa y 2) el grado en que las concentraciones diferentes de HIP2B atenuaron el desarrollo de la toxicidad por glucosa, tal como se determina mediante excursiones glucémicas entre los grupos de intervención comparados con el grupo de control.

[00287] La Figura 22 ilustra el estudio dosis-respuesta llevado a cabo en ratones tratados con STZ y confirma que es equivalente la eficacia entre los ratones diabéticos tratados con 10, 100 y 1000 microgramos BID. A una dosis inferior a 1 mg/kg se presentó una señal de eficacia disminuida en los ratones que se corresponde con niveles de dosificación de 0,1 y 0,01 mg/kg.

[00288] HIP Optimizado2B es, en muchas formas, diferente de las terapias tradicionales como por ejemplo, la insulina, para el tratamiento de la diabetes. HIP2B inicia una cascada de señalización que conduce la neogénesis de islotes. En contraste con la insulina, donde la eficacia de respuesta se mide principalmente mediante su capacidad para disminuir la glucosa de forma inmediata, la respuesta farmacodinámica del agente para la neogénesis de islotes se mide durante días y semanas. De esta manera, la eficacia de los agentes para la neogénesis de islotes como por ejemplo, HIP2B e INGAP puede evaluarse no sólo mediante la restauración a largo plazo del control glucémico luego de una dosificación repetida diariamente, sino además mediante la atenuación de la hiperglucemia y/o la velocidad a la que se alcanza la euglucemia. Todos los grupos de tratamiento con HIP alcanzaron la euglucemia.

[00289] Se calculó la respuesta de atenuación de dosis como el cambio en la glucosa promedio que obtiene la respuesta mayor posible igual al máximo grado de atenuación de la diabetes. En esta evaluación, se informa el cambio en la respuesta por dosis unitaria, calculado mediante la diferencia en las excursiones glucémicas máximas para cada grupo de tratamiento durante todo el estudio, comparada con las excursiones glucémicas del grupo de control. El grupo de control no experimentó atenuación de la enfermedad y logró una inducción de la enfermedad del 100%. El grado en el cual las dosis de HIP2B atenuaron este efecto se describe como el % de atenuación de la enfermedad en cada grupo de tratamiento con respecto al grupo de placebo.

[00290] La Figura 23 ilustra el impacto de diferir la concentración de HIP2b sobre la atenuación de la diabetes. Cada uno de los tres niveles de tratamiento atenuaron la severidad de la diabetes en el mismo grado. Las dos dosis menores de tratamiento con HIP (0,1 y 1 microgramo por día administrado BID) no demostró una respuesta tan óptima como lo hicieron las tres dosis mayores.

[00291] En niveles de dosificación de 0,1 y 1 microgramo BID, la respuesta de HIP2B mostró atenuación de la enfermedad superior a la del placebo. Al aumentar la concentración de HIP2B a 10 microgramos BID, se obtuvo la mayor eficacia y atenuación de la diabetes. En niveles de dosis de 1.000, 100, y 10 microgramos BID, se atenuó la diabetes entre 60-70% del estado de enfermedad máxima observado en el grupo de placebo. A partir de estos resultados, concluimos que el nivel de dosis menor de HIP2B proporcionará una eficacia óptima dentro del rango de 1-10 microgramos BID en ratones o una dosis humana equivalente de 0,5-1,0 mg/kg en humanos (30-60 mg BID). Esta dosis es de alrededor de 1/10 de la dosificación utilizada en las pruebas con INGAP Fase2B (600 mg/día).

Ejemplo 14

[00292] Se realizó un estudio farmacocinético para confirmar la mejora en la biodisponibilidad lograda con la estructura de HIP Optimizado2B. La biodisponibilidad absoluta y el estudio farmacodinámico se llevó a cabo con ratas Sprague Dawley luego de la administración de la dosis intravenosa y subcutánea de HIP2 (Figura 24), HIP Optimizado2B e INGAP. La finalidad era determinar la absorción, biodisponibilidad absoluta y niveles en plasma de HIP2, HIP Optimizado2B e INGAP en ratas macho luego de dos vías diferentes de administración.

[00293] A seis grupos de ratas macho Sprague Dawley se les administró HIP2, HIP2B o INGAP por la vía intravenosa y subcutánea de la manera explicada en la tabla siguiente.

Grupo	Vía de administración	Artículo de prueba	Conc. nom (mg/ml)	Vol de dosis (ml/kg)	Nivel de dosis Nom (mg/kg)
1	Subcutáneo	HIP2	2	2	4
2	Intravenoso	HIP2	2	2	4
3	Subcutáneo	HIP2B	2	2	4
4	Intravenoso	HIP2B	2	2	4
5	Subcutáneo	INGAP	2	2	4
6	Intravenoso	INGAP	2	2	4

Se recolectaron diez muestras seriales de plasma sanguíneo (0,03 ml cada) de un catéter en la vena yugular de cinco animales por grupo a los 5, 10, 15, 30 minutos, 45 minutos seguido por muestras a 1, 2, 3, 8, y 24 horas post-dosis. El plasma se recolectó en
 5 tubos que contenían EDTA. Luego de la recolección, se mantuvieron las muestras frías sobre bolsas refrigerantes antes de centrifugar y transferir a tubos para microcentrífuga pre-etiquetados a -70°C o menos.

[00294] Las muestras de plasma de rata de 200 µl cada una se agregaron a un tubo para microcentrífuga que contenía 1 ml de acetonitrilo (ácido trifluoroacético al
 10 0,07%, TFA) y se agitó con un mezclador de vórtice durante 1 min., seguido por la centrifugación para remover las proteínas en plasma precipitadas. La solución sobrenadante se retiró y evaporó usando un Speed Vac, hasta secarse. Al tubo para microcentrífuga que contenía pellets secos se agregaron 200 µl de acetonitrilo : agua 20:80 (que contenía 0,07% TFA). La muestra se centrifugó para retirar cualquier material insoluble y la solución
 15 sobrenadante se transfirió a viales analíticos para el análisis LC/MS MS. Se calibró el espectrómetro de masa para detectar el/los ión/iones hijos más abundante/s observados para cada una de las respectivas muestras de referencia de HIP2B (M=286,0), HIP2 (M=287,1) y INGAP (M=212,2; 356,1; 373,9).

Las muestras de plasma HIP Optimizado2B, HIP2 e INGAP se analizaron en una
 20 columna C-18 fase inversa (50 mm x 2.0 mm, Varian Pursuit XRS3) usando 0,07% TFA en H₂O como búfer A y 0,07% TFA en acetonitrilo como búfer B. Se utilizó un gradiente lineal de 98% A /2% B progresando hasta 100% B durante 9 minutos a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min.

[00295] Se trataron los siguientes controles en plasma como se describió
 25 anteriormente y se utilizaron para determinar la curva de concentración estándar:

1. Plasma testigo como control de fondo
2. Cinco muestras de plasma estándar que contenían $6,7 \times 10^4$, $6,7 \times 10^3$, $6,7 \times 10^2$, 67 y 6,7 ng/ml de HIP2B, HIP2 e INGAP

[00296] Además se analizaron muestras de dosis retenidas de HIP
 30 Optimizado2B, HIP2 e INGAP mediante LC/MSMS para poder determinar la

concentración de cada una en el momento de la inyección. Los análisis confirmaron que la concentración, dentro del error experimental, eran de 2mg/ml.

Todos los animales parecían normales en todo momento post-dosis y luego de cada vía de administración.

5 HIP2 e INGAP: Luego de la administración intravenosa o subcutánea de HIP2, se observaron niveles muy bajos de HIP2 sólo a cinco minutos después de la dosis, estando todas las muestras subsiguientes por debajo del límite de cuantificación. Luego de la administración intravenosa o subcutánea de INGAP, todas las muestras de plasma estaban por debajo del límite menor de cuantificación. Como resultado, no pudieron ser calculados
10 los parámetros de farmacocinética para HIP2 e INGAP luego de la administración de la dosis por la vía intravenosa y subcutánea.

[00297] Luego de la administración intravenosa de HIP2B, HIP2B las concentraciones en plasma declinaron de manera monofásica, con una vida media en plasma promedio de la fase terminal de 0,19 horas (11 minutos). C_{max} media era de 8237
15 ng/ml que ocurrió en el primer punto en el tiempo del muestreo de 5 minutos. C_0 media se estimó en 18805 ng/ml. $AUC_{0-\infty}$ media era de 2231 ng*hr/ml. La eliminación media del plasma aparente era de 1,9 l/hr/kg con un volumen medio aparente de distribución de 0,48 l/kg.

[00298] Luego de la administración subcutánea de HIP Optimizado2B, HIP2B absorbido declinó de manera monofásica con una vida media en plasma de fase terminal promedio de 0,34 horas (20 minutos). $AUC_{0-\infty}$ media era de 1932 ng*hr/ml. Cl/F media aparente era de 2,1 l/hr/kg con una V_2/F media aparente de 1 l/kg. La biodisponibilidad absoluta subcutánea de HIP2B era del 87%.

La Figura 25 muestra que la farmacocinética de la administración subcutánea de los
25 niveles en plasma de HIP Optimizado2B, HIP Optimizado2B eran detectables hasta 2 horas con un $t_{1/2,e}$ de ~20 minutos.

[00299] Las concentraciones de INGAP en plasma no eran detectables en ningún momento, indicando que INGAP se elimina y/o metaboliza rápidamente.

Los niveles de HIP Optimizado2B en plasma era significativamente superiores con
30 respecto a HIP2 o INGAP luego de la administración de una dosis subcutánea. En base a los perfiles cromatográficos LC/MS multi-pico en plasma observados, es menos probable

que HIP Optimizado2B sea metabolizado rápidamente in vivo comparado con HIP2 e INGAP. La biodisponibilidad de HIP2B es del 87%.

[00300] La Figura 24 muestra el análisis LC/MS MS de las muestras de HIP Optimizado2B, HIP2 e INGAP derivadas de plasma de rata como parte de un análisis PK donde se administraron dosis de HIP2B, HIP2 e INGAP mediante inyección subcutánea o intravenosa a una dosis de 4 mg/kg.

[00301] Luego de la administración subcutánea, los niveles HIP2B fueron detectables hasta 1,5 horas. El T_{1/2} es de aproximadamente 0,5 hrs. Se detectaron niveles muy bajos de HIP2 a los 5 minutos sin detección subsiguiente después de los 5 min. En base al perfil cromatográfico LC/ML multi-pico observado de HIP Optimizado2B, es metabolizado menos rápidamente in vivo comparado con HIP2.

[00302] Las concentraciones de INGAP no fueron detectables en ningún punto del tiempo, indicando que se elimina o metaboliza rápidamente.

La tabla a continuación sintetiza estos datos.

15

Análisis PK comparativo

Péptido	Vía	Dosis (mg/kg)	C ₀ (ng/ml)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	C _{1h} (ng/ml)	AUC _{0-∞} (ng*H/ml)	T _{1/2} (h)	F
HIP2B	SQ	4	na	2739	0,167	611,5	1.932	0,34	0,87
	IV	4	18.805	8237	0,083	114	1.614,3	0,19	na
HIP2	SQ	4	na	32	0,083	0	2,7	0,02	na
	IV	4	18.805	29	0,083	0	441,0	0,02	na
INGAP	SQ	4	na	0	na	0	0,0	<0,025	0,00
	IV	4	18.805	0	na	0	439,5*	<0,025	na

n= 5; na, no se aplica

* extrapolado

[00303] Se concluye que los niveles en plasma de HIP Optimizado2B son significativamente superiores con respecto a HIP2 o INGAP luego de la administración subcutánea.

20

Los niveles HIP2B en plasma son significativamente superiores con respecto a HIP o INGAP luego de la administración IV. Luego de la inyección intravenosa, HIP

Optimizado2B muestra una reducción dependiente del tiempo con concentraciones no detectables en 45 min. El $T_{1/2}$ es de aproximadamente 9 minutos. Sólo se observó HIP2 en el punto de tiempo de 5 minutos y no fue detectable INGAP en ningún momento, indicando que ambos se eliminan o metabolizan rápidamente.

- 5 **[00304]** Aunque la presente invención ha sido descrita con detalles considerables con respecto a ciertas realizaciones preferidas de la misma, otras versiones son posibles. Por lo tanto, el espíritu y alcance de las reivindicaciones anexas no deben limitarse a la descripción y las versiones preferidas contenidas dentro de esta memoria descriptiva.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido ProIslet caracterizado porque comprende una modificación de optimización, donde dicha modificación de optimización se selecciona del grupo formado por un grupo acetilo N-terminal, un grupo amida C-terminal, y un residuo de cisteína C-terminal.
5
2. El péptido de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha modificación de optimización se selecciona del grupo formado por (i) un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal y, (ii) un grupo acetilo N-terminal y un residuo de cisteína C-terminal.
- 10 3. El péptido de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho péptido es un péptido HIP1 modificado, un péptido HIP2 modificado, o un péptido HIP3 modificado.
4. El péptido de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho péptido es un péptido humano REG3A modificado, un péptido humano REG3G modificado, un péptido humano REG1A modificado, un péptido humano REG1B modificado, un péptido humano REG4
15 modificado, un péptido INGAP en hámster, un péptido REG2 en hámster modificado, un péptido REG3G en hámster modificado, un péptido REG1 en rata modificado, un péptido PAP/REG3B en rata modificado, un péptido PAP3 en rata modificado, un péptido REG3G en rata modificado, péptido REG 1 en ratón modificado, péptido REG2 en ratón modificado, péptido REG3A en ratón modificado, péptido REG3B en ratón modificado,
20 péptido REG3G en ratón modificado, péptido REG3S en ratón modificado, péptido REG4 en ratón modificado, péptido bovino PTP modificado.
5. El péptido de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho péptido comprende una secuencia de aminoácido del NR ID DE SEC: 5, NR ID DE SEC: 6, NR ID DE SEC: 7, NR ID DE SEC: 8, NR ID DE SEC: 9, NR ID DE SEC: 10, NR ID DE SEC: 11, NR
25 ID DE SEC: 12, NR ID DE SEC: 13, NR ID DE SEC: 14, NR ID DE SEC: 15, NR ID DE SEC: 16, NR ID DE SEC: 17, o NR ID DE SEC: 19.
6. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un péptido ProIslet Optimizado en una cantidad terapéuticamente eficaz.

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, caracterizada porque dicho péptido es un péptido ProIslet que comprende una modificación de optimización, donde dicha modificación de optimización se selecciona del grupo formado por un grupo acetilo N-terminal, un grupo amida C-terminal, y un residuo de cisteína C-terminal .
- 5 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, caracterizada porque dicha cantidad terapéuticamente eficaz se selecciona del grupo formado por alrededor de 20 mg y alrededor de 30-60 mg.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, caracterizada porque dicha cantidad terapéuticamente eficaz es equivalente a una dosis seleccionada del grupo
10 formado por entre alrededor de 0,5 y alrededor de 5 mg/kg, entre alrededor de 0,5 y alrededor de 1,0 mg/kg, alrededor de 0,1 mg/kg, alrededor de 0,5 mg/kg, alrededor de 1,0 mg/kg, alrededor de 5 mg/kg, y 8-20 mg/kilogramos.
- 10 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, caracterizada porque cantidad terapéuticamente eficaz es de alrededor de 400-800 mg por día, 60 y alrededor de 180
15 mg/día, o entre alrededor de 60 y alrededor de 120 mg/día.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 caracterizada porque además comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Un método para estimular la neogénesis de islotes o estimular la regeneración de células de islote pancreático, caracterizado porque comprende administrar el péptido de la
20 reivindicación 1.
13. Un método para tratar una patología asociada con la función pancreática deteriorada en un sujeto que necesita dicho tratamiento, caracterizado porque comprende administrar al sujeto un péptido de la reivindicación 1.
14. El método de la reivindicación 12, caracterizado porque dicho péptido se administra
25 en una cantidad terapéuticamente eficaz.
15. El método de la reivindicación 13, caracterizado porque dicho péptido se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

16. El método de la reivindicación 13, caracterizado porque la patología asociada con la función pancreática deteriorada se selecciona entre: diabetes tipo 1, nuevo inicio de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes autoinmune latente de la adultez, pre-diabetes, glucemia basal alterada, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico/síndrome dismetabólico, sobrepeso, obesidad, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, trastornos de la alimentación, ciclos anovulatorios y síndrome de ovario poliquístico.

17. El método de la reivindicación 12, caracterizado porque además comprende administrar un agente para la regeneración de células de islote pancreático.

18. El método de la reivindicación 17, caracterizado porque el agente para la regeneración de células de islote pancreático se selecciona entre péptidos ProIslet Humanos, análogos del péptido ProIslet Humano, amilina, pramlintide, exendina-4, GIP, GLP-1, Agonistas del receptor GLP-1, Análogos GLP-1, péptido INGAP en hámster, liraglutide, e inhibidor de dipeptidil peptidasa.

19. El método de la reivindicación 13, caracterizado porque además comprende administrar un agente que inhibe, bloquea o destruye células autoinmunes que se dirigen a las células endócrinas pancreáticas.

20. El método de la reivindicación 19, caracterizado porque el agente que inhibe, bloquea o destruye células autoinmunes que se dirigen a las células de islote pancreático se selecciona entre uno o más de los siguientes agentes: anticuerpos anti CD-3 incluyendo hOKT3γ1(Ala-Ala) (teplizumab); ChAglyCD3 que dirige la respuesta inmunológica y específicamente bloquea los linfocitos T que producen la muerte de las células beta en la diabetes tipo 1; el antígeno 4 del linfocito T citotóxico, CLTA-4 Ig (Abatacept); Sirolimus (Rapamicina) solo o en combinación con Tacrolimus (FK506) o IL-2 (rapamune); Rapamune solo o en combinación con Proleuquina (aldesleuquina); una proteína de choque térmico 60 (Diapep277); una vacuna elaborada con anti-ácido glutámico decarboxilasa anti-ácido glutámico decarboxilasa 65 (GAD65); lisofilina, IBC-VSO, vacuna, interferón alfa; una vacuna que utiliza células T reguladoras antígeno CD4⁺CD25⁺ específicas; vacuna de células dendríticas supresoras de la diabetes, GSK189075, fármacos de

diazoxida y estatina incluyendo la atorvaestatina utilizada como un agente para conservar la función de las células beta, Micofenolato Mofetil solo o en combinación con Daclizumab; agente anti-CD20, Rituximab; Campath-1H (anticuerpo Anti-CD52), lisofilina; globulina anti-linfocito T policlonal (ATG/Timoglobulina), Factor de estimulación de colonias de granulocitos, Neulasta (Pegfilgrastim), Vitamina D, ambos suplementos: 25 hidroxí y 1,25 hidroxivitamina D; vacuna IBC-VSO, que es una forma sintética, metabólicamente inactiva de insulina diseñada para prevenir la destrucción de células beta pancreáticas; interferón alfa; una vacuna que utiliza células T reguladoras específicas del antígeno CD4+CD25+ o cualquier agente o agentes diseñados para suprimir el ataque inmunológico sobre las células beta dentro de los islotes de Langerhans, Prochymal (Células madre humanas adultas), el antiinflamatorio Anakinra y el agente antiinflamatorio, Deoxispergualina, un agente antiinflamatorio que bloquea la producción de citoquina proinflamatoria e inhibe las células T y las células B.

K. Resumen: Las realizaciones se refieren a péptidos ProIslet, preferentemente, HIP, que exhiben una estabilidad y eficacia aumentadas, y a los métodos para utilizarlos para tratar una patología asociada con la función pancreática alterada, incluyendo diabetes tipo 1 y 2 y sus síntomas.

AUMENTO EN EL CONTENIDO DE INSULINA HUMANA LUEGO DE UN TRATAMIENTO DE UNA SEMANA CON EL PÉPTIDO PIG3181 HUMANO

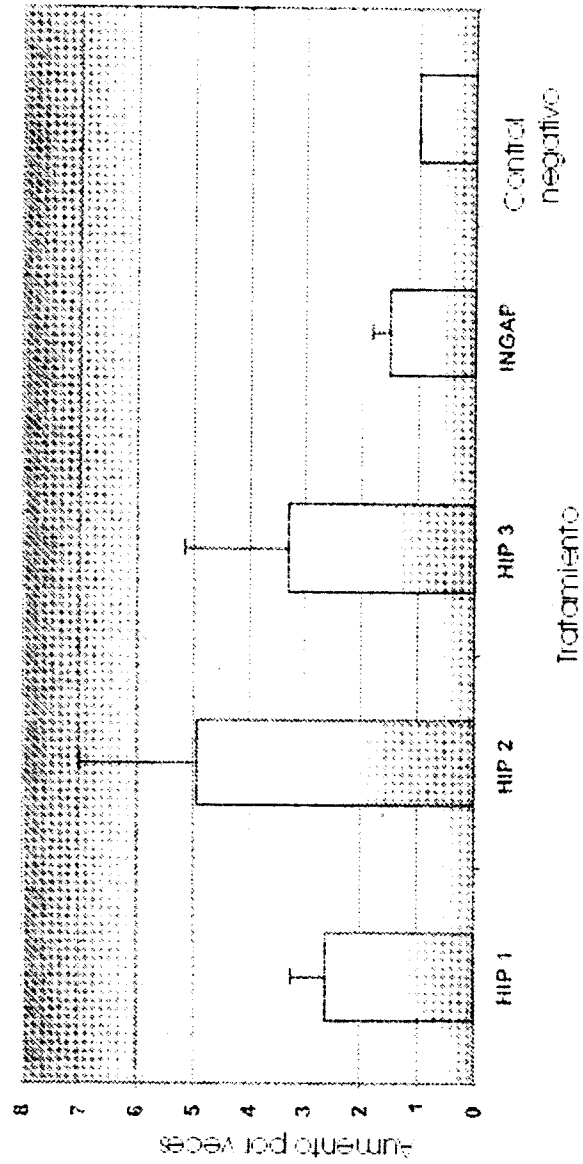


Fig. 1

1/27

CAMBIO PORCENTUAL EN LOS REQUERIMIENTOS DE INSULINA
EN LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO DESDE EL DÍA 9 AL DÍA 28

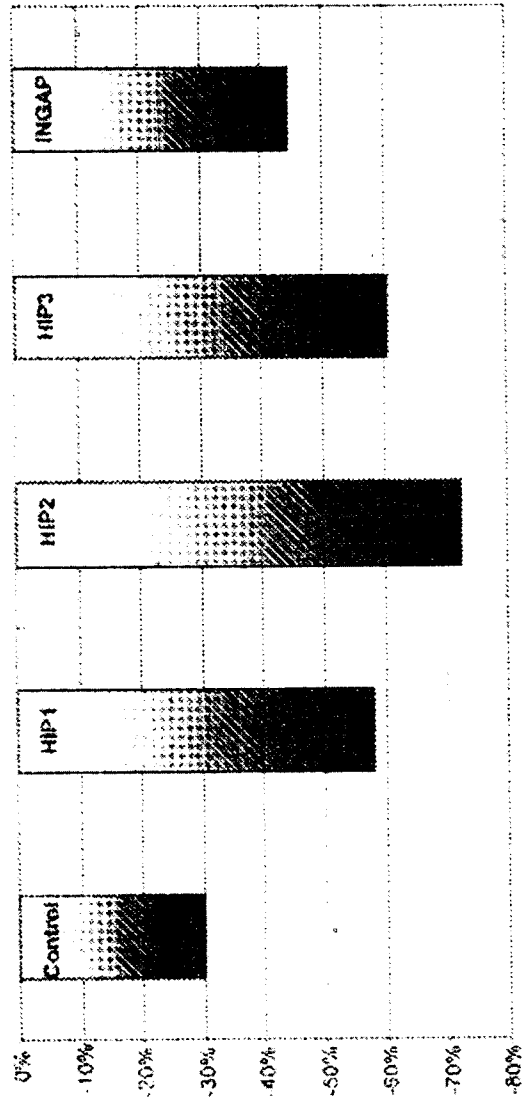


Fig. 2

2/27

GLUCOSA EN MODELO MURINO POR GRUPO DE TRATAMIENTO
EN EL DÍA 27

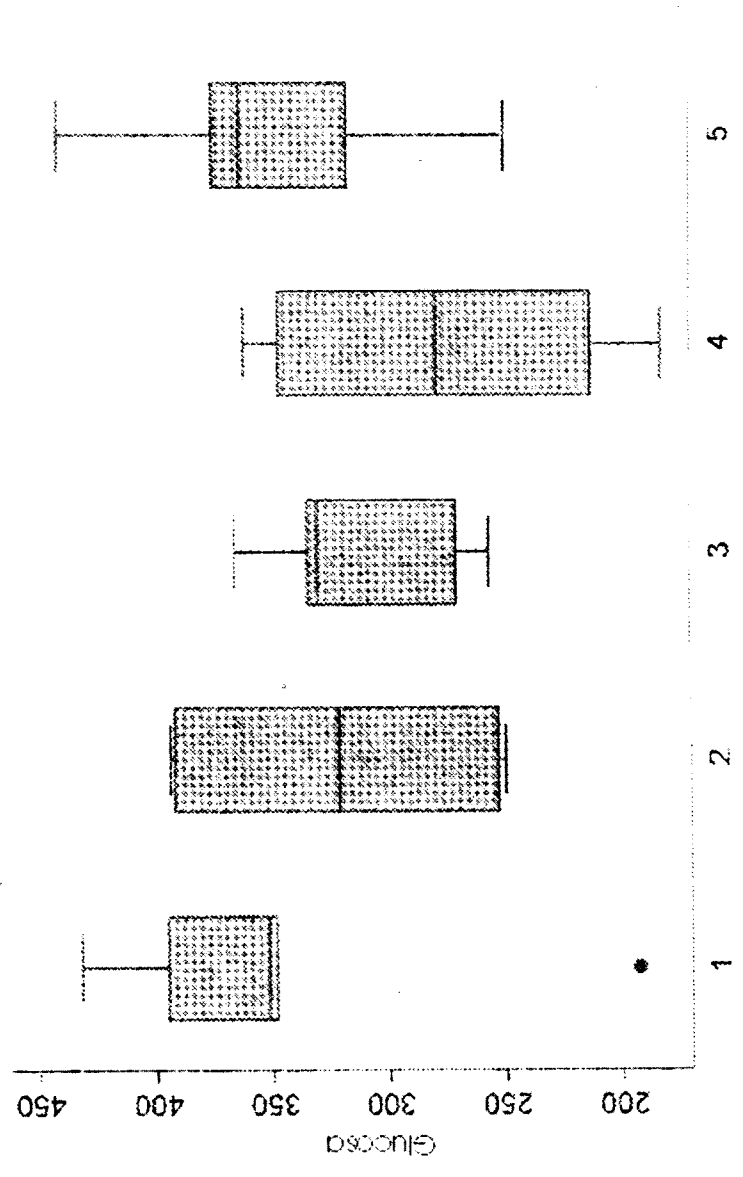


Fig. 3
3/27

CANT. DE ISLOTES CONTADOS EN TODAS LAS SECCIONES/ANIMALES

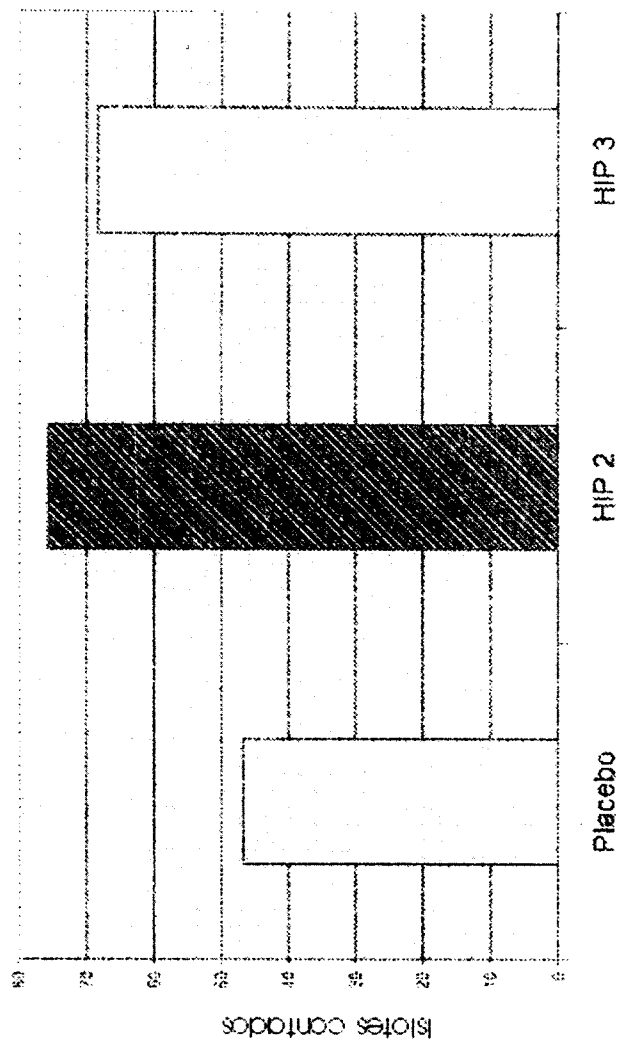


Fig. 4A

4/27

Páncreas de animal diabético tratado con placebo	Páncreas de animal diabético tratado con HIP	Páncreas de animal diabético tratado con HIP
---	---	---

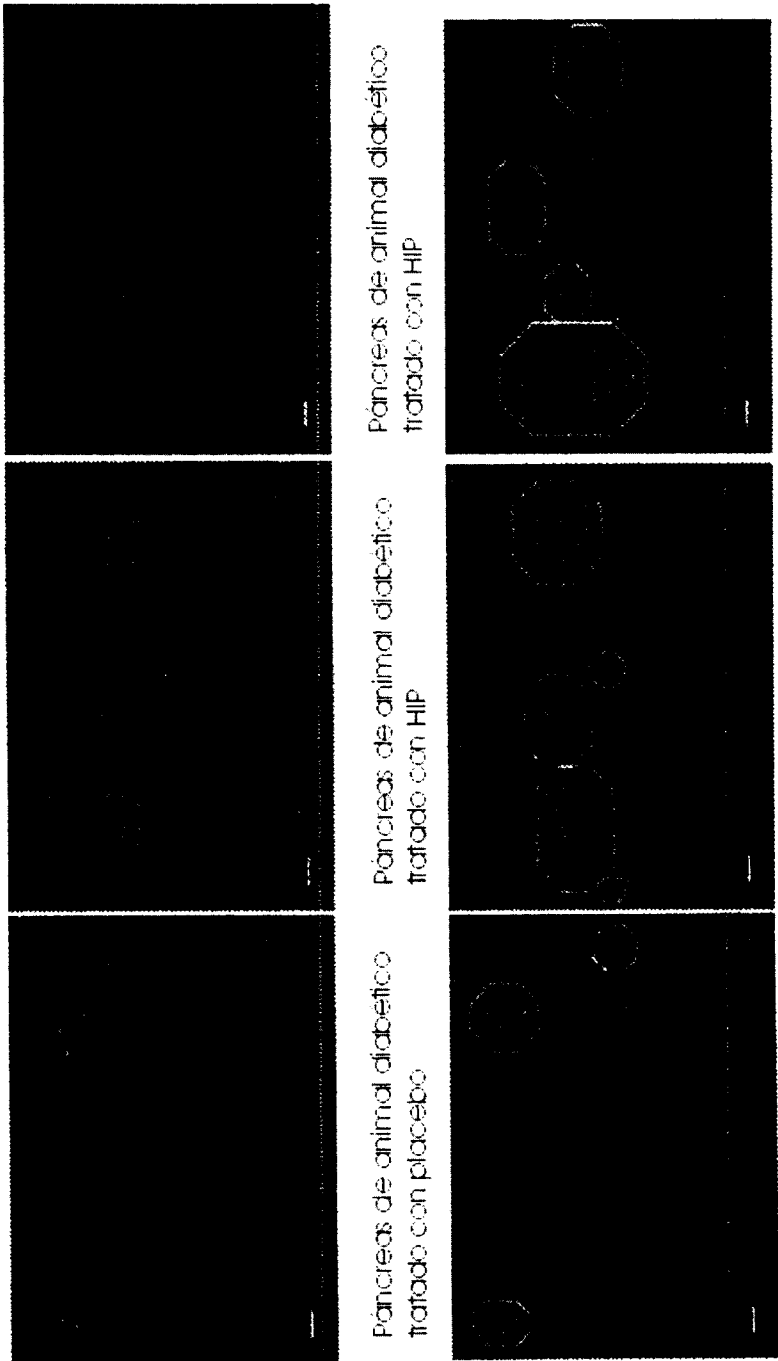
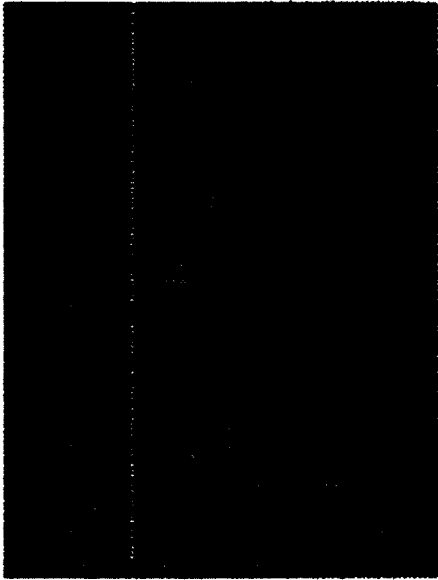
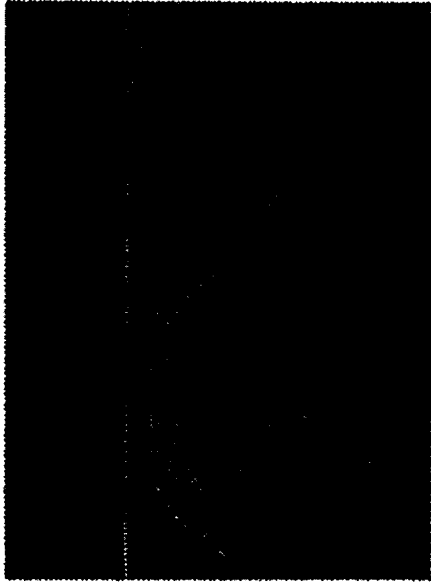


Fig. 4B
5/27



Control



TRATADO CON HIP

Fig. 5

6/27

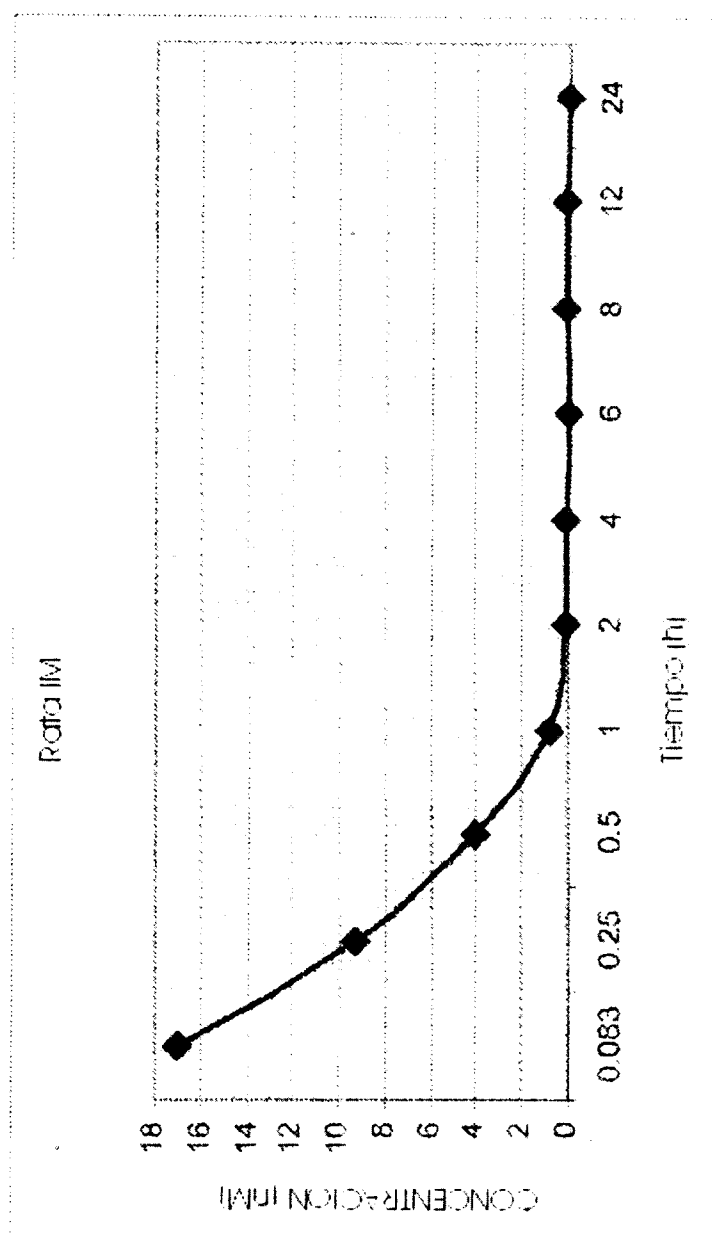


Fig. 6

7/27

Ratón Sca (subcutánea)

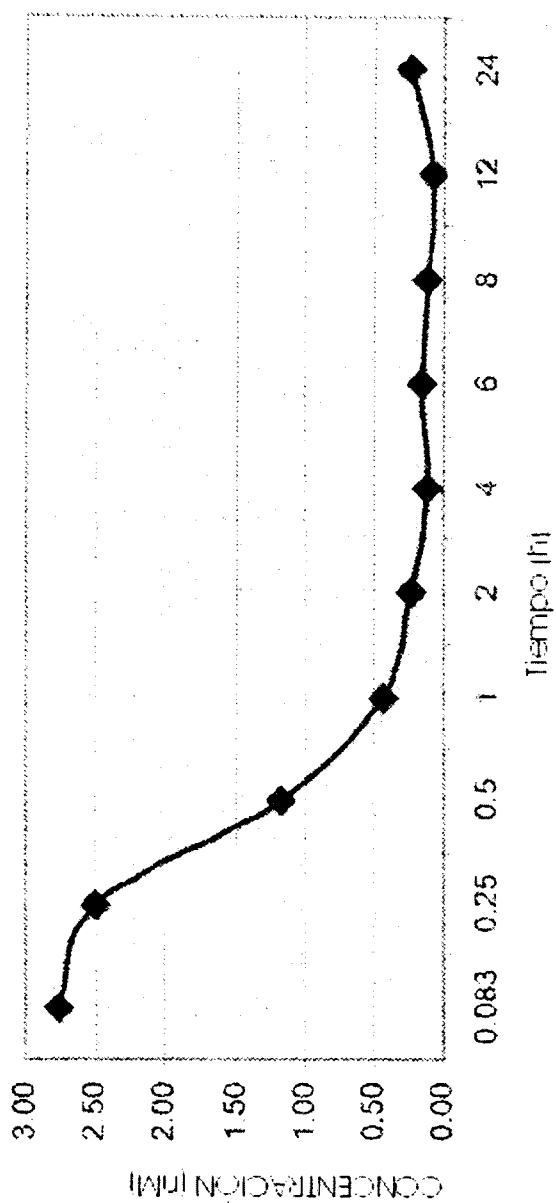


Fig. 7

8/27

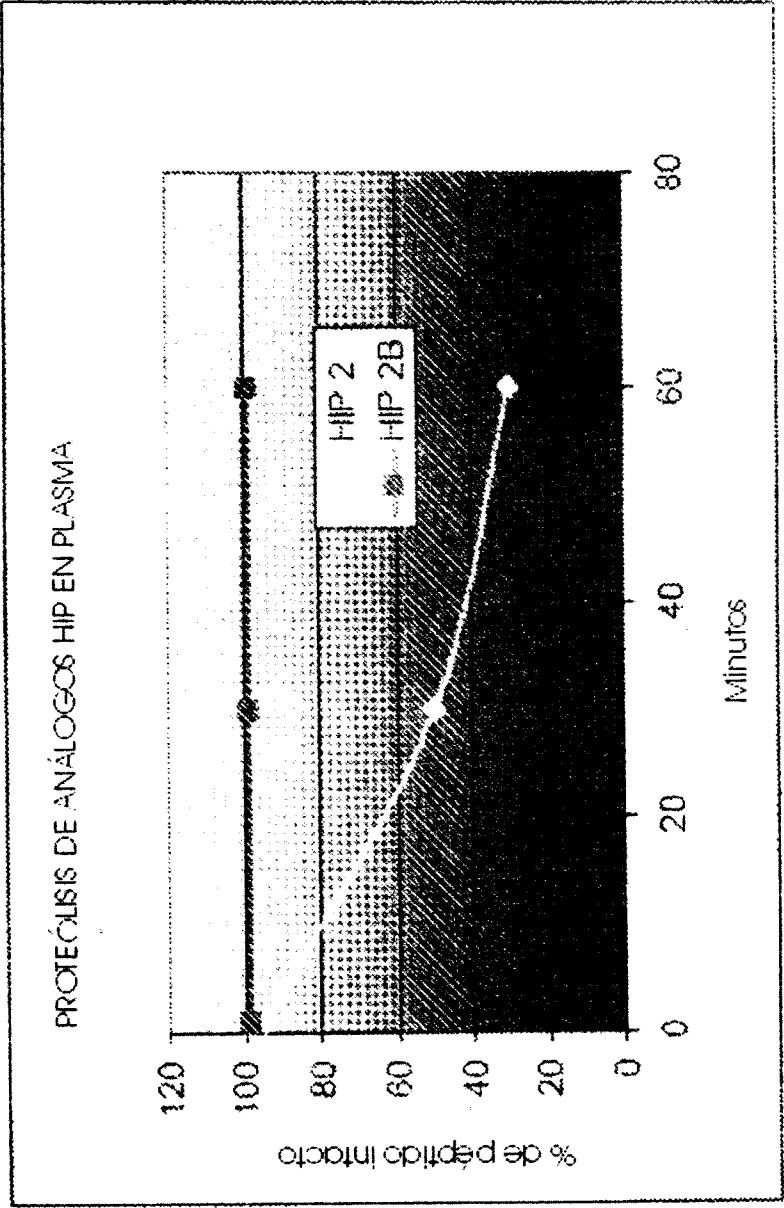
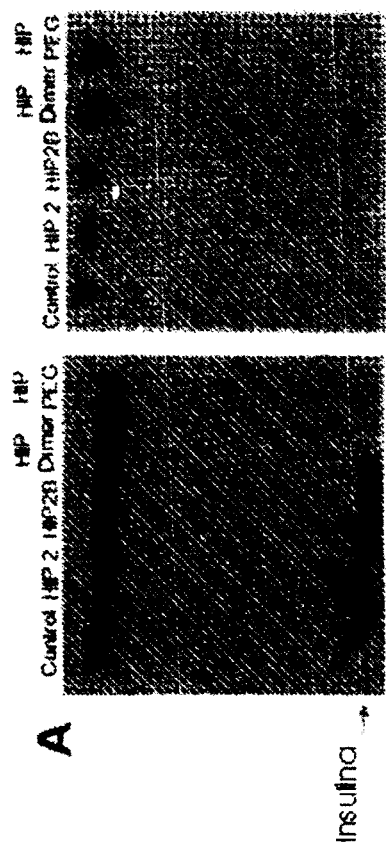


Fig. 8

9/27



Células PANC-1

Células PANC-1

Condições no reductoras

B



Fig. 9

10/27

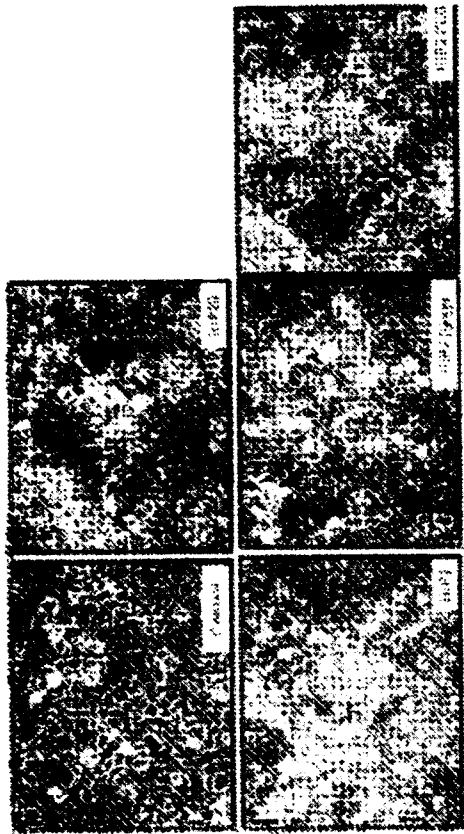


Fig. 10A

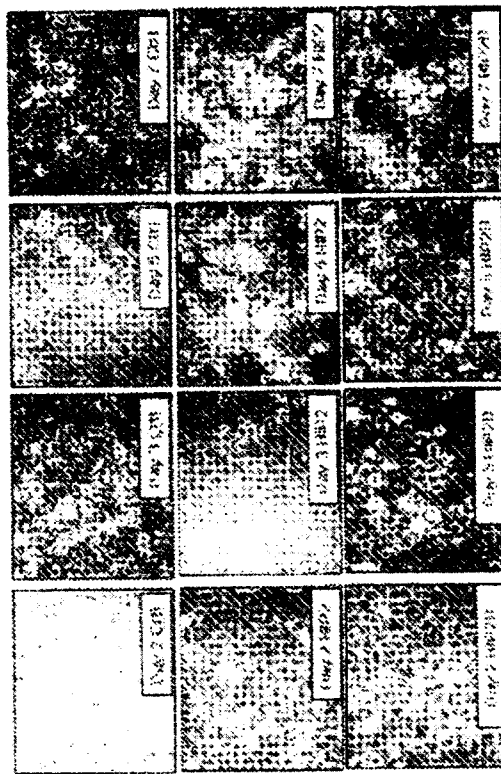


Fig. 10B

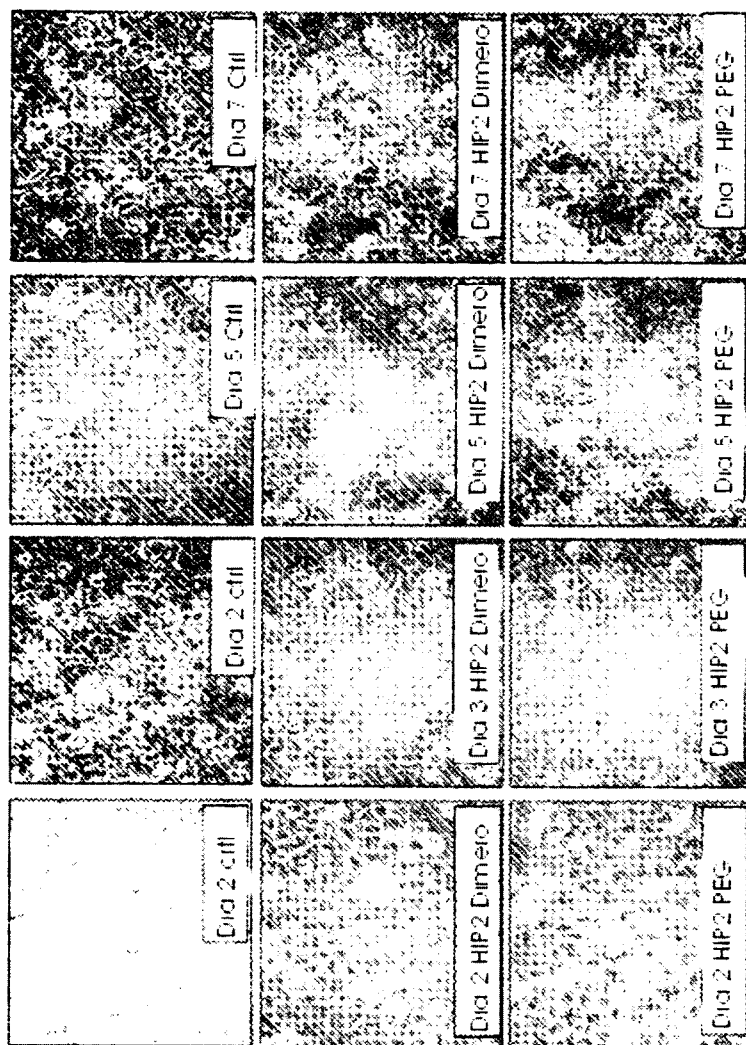


Fig. 10C

12/27

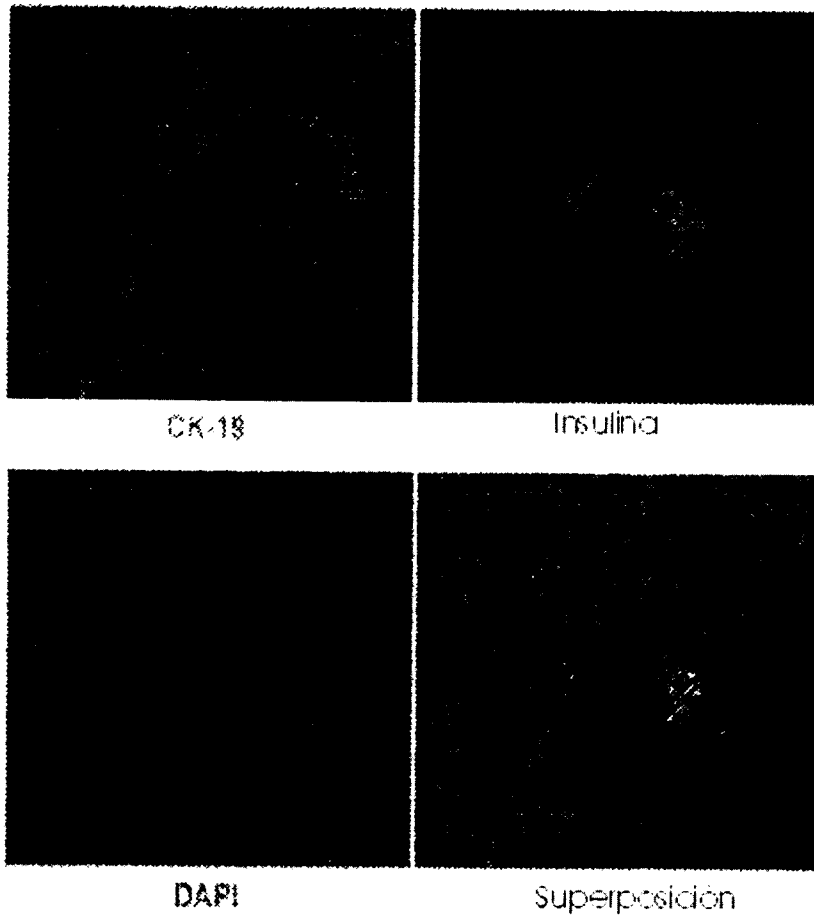


Fig. 11

13/27

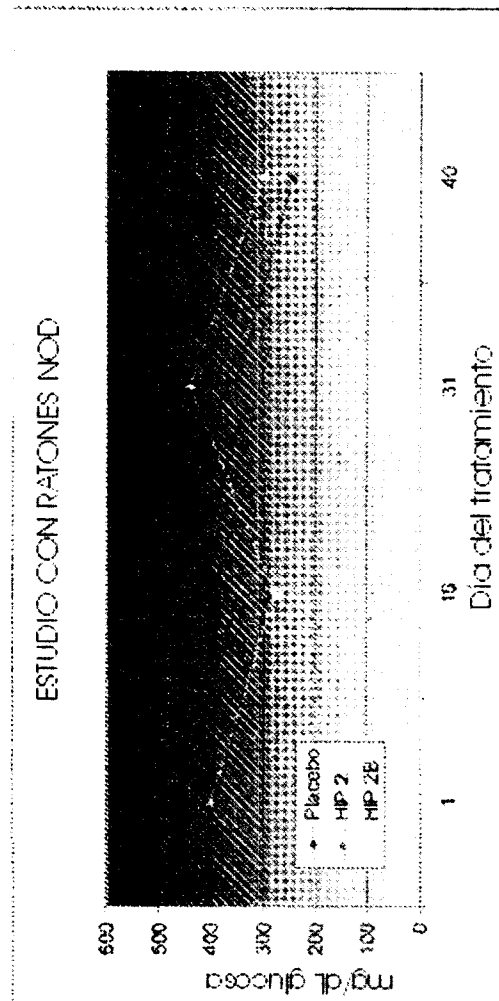


Fig. 12

14/27

TRANSLOCACIÓN DEL RECEPTOR HIP LUEGO DE LA ESTIMULACION DE
HIP Y HIP OPTIMIZADO

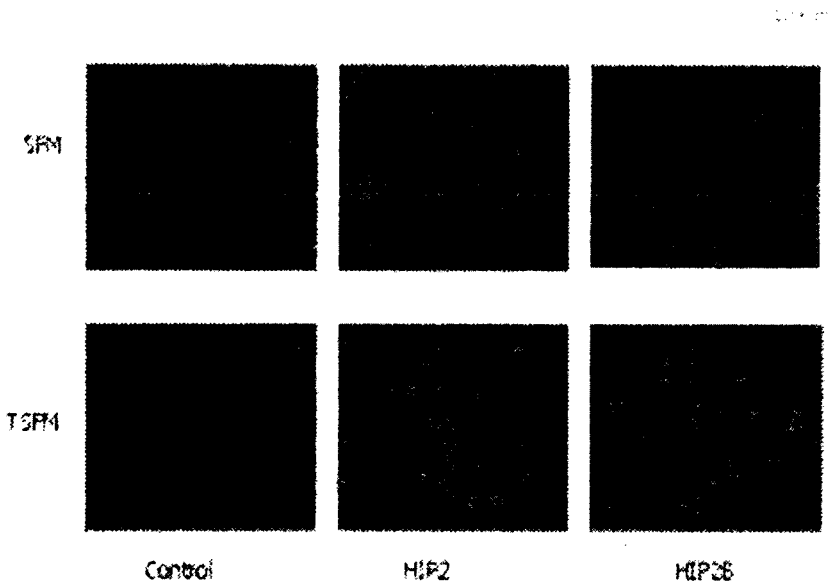
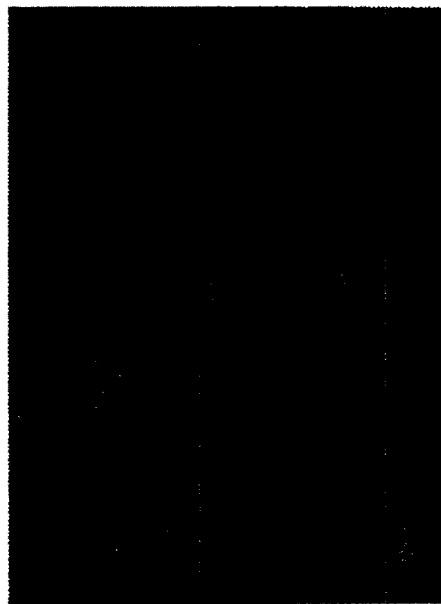


Fig. 13
15/27

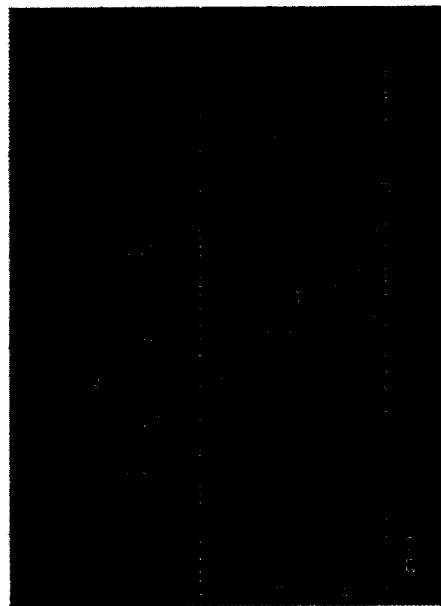
EXPOSICIÓN AJUSTADA

220 ms

HIP2B



HIP2



SFM

TSFM

Fig. 14

16/27

Translocación del receptor HIP desde la membrana citoplasmática hacia el núcleo luego de la estimulación con péptidos HIP2 optimizados

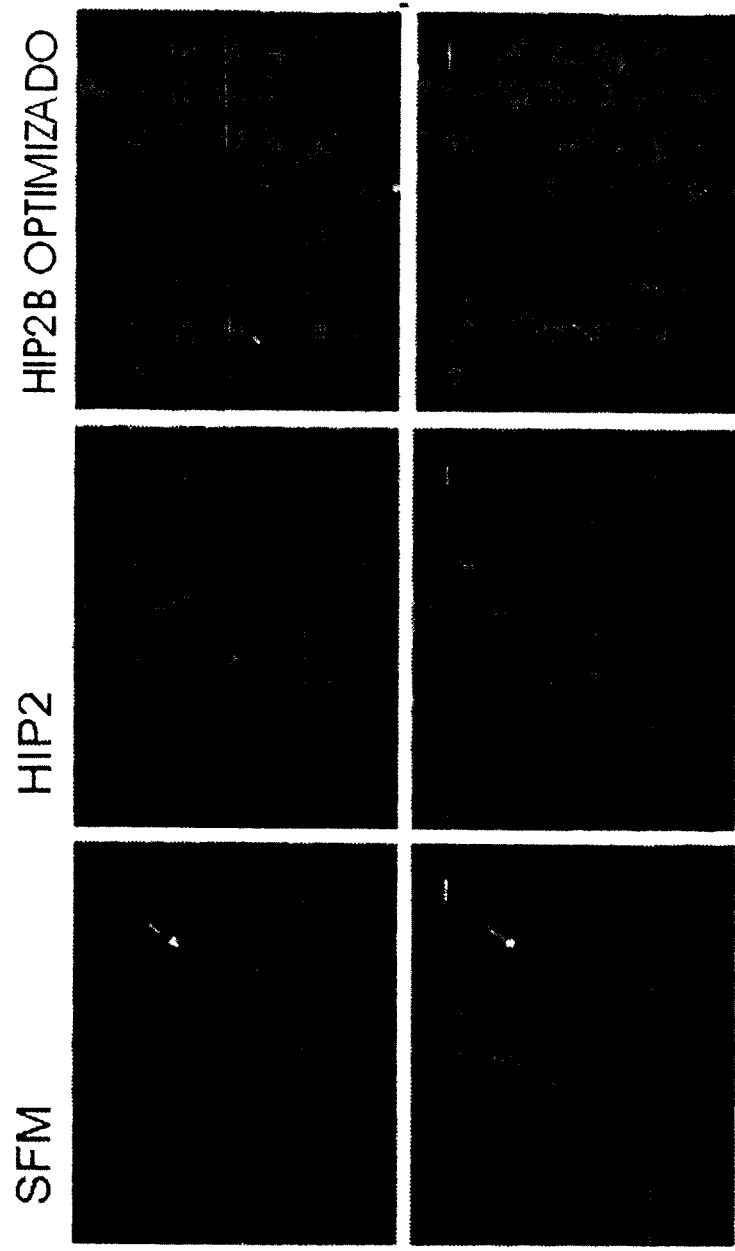


Fig. 15
17/27

Impacto de HIP2B Optimizado sobre el tiempo de translocación desde el citoplasma hasta el núcleo

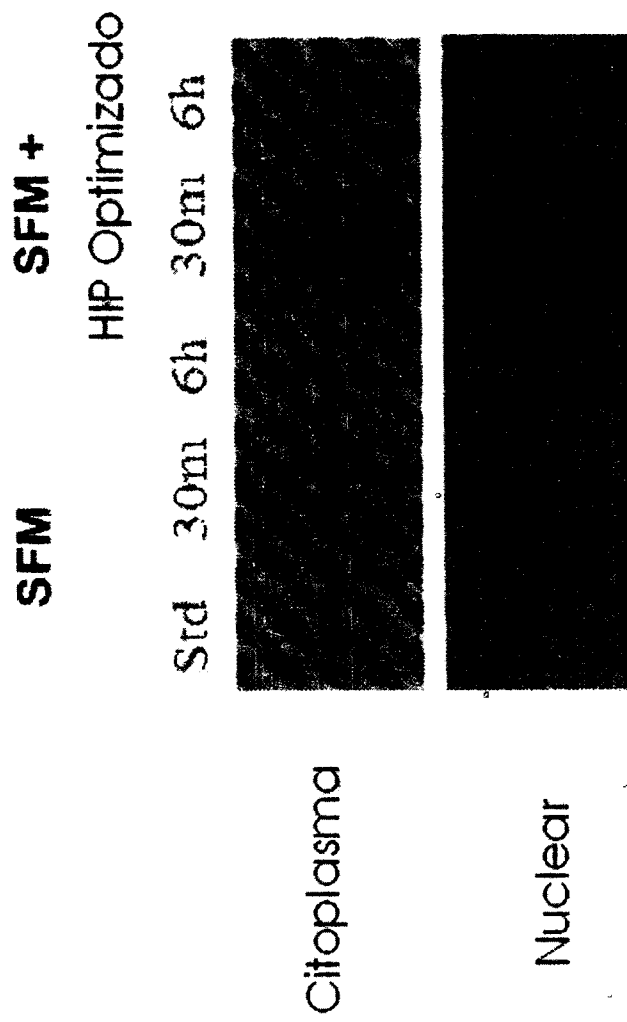


Fig.16
18/27

Modelo de ratón diabético por STZ
HIP2 y HIP2B versus Placebo
Niveles promedio diarios de glucosa

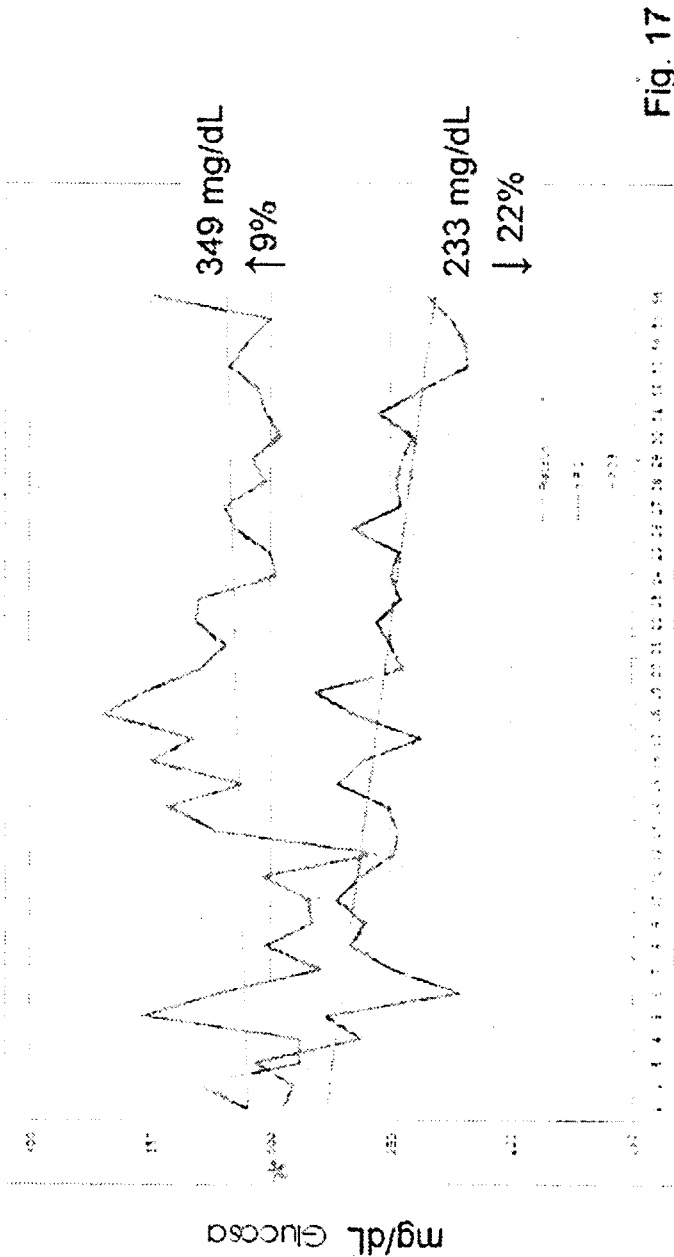


Fig. 17
19/27
Días de tratamiento
* Glucosa basal media 300 +/- 2% mg/dL sin diferencias significativas entre los grupos (p=0.301)

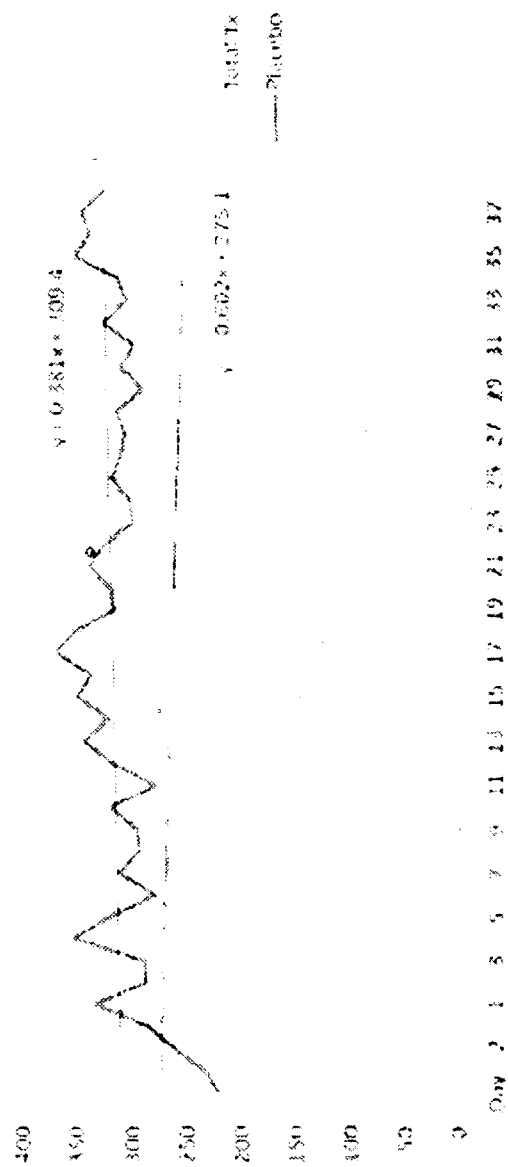


Fig. 18

20/27

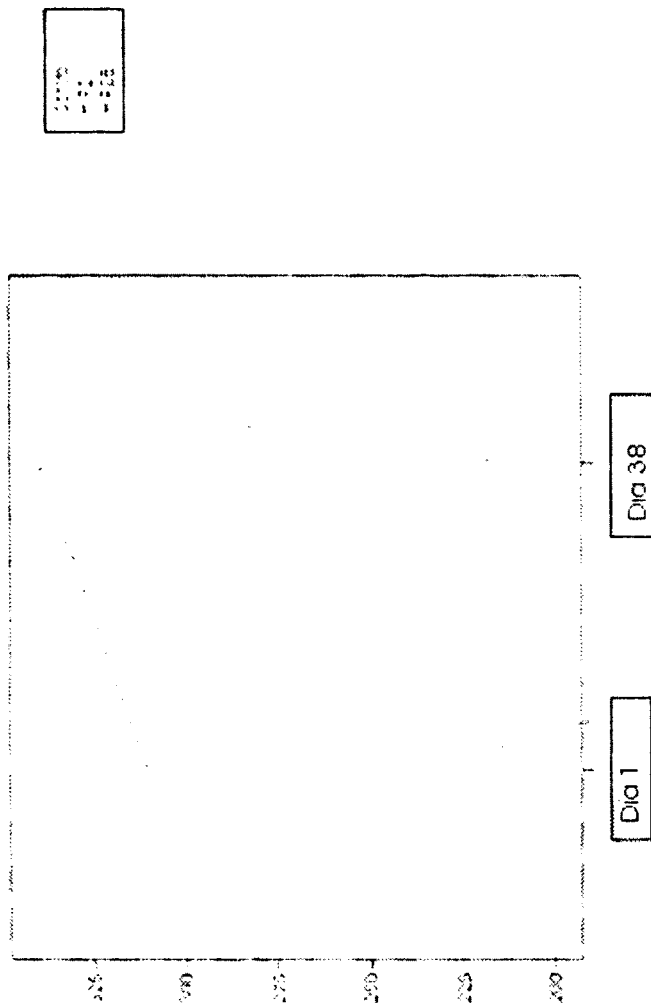


Fig. 19
21/27

Niveles de glucosa en ayunas (mg/dL) después del tratamiento
CON HIP2B Optimizado



Fig. 20
22/27

Resultados de la Prueba de Tolerancia a la glucosa luego de la administración de HIP2B Optimizado

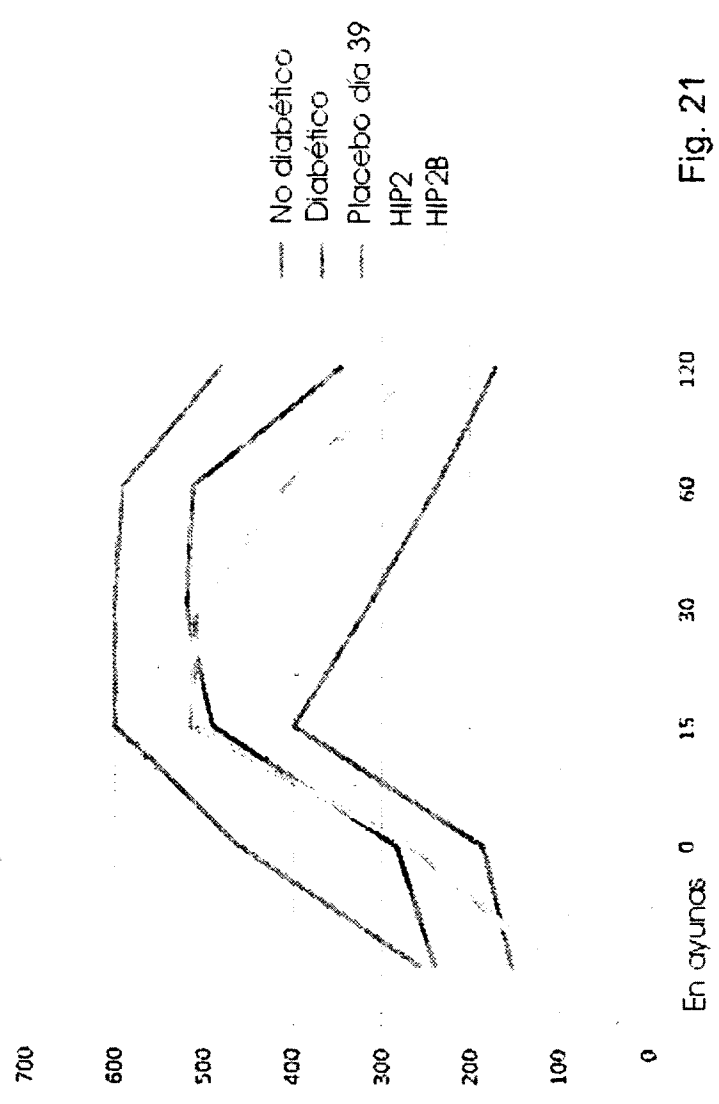


Fig. 21
23/27

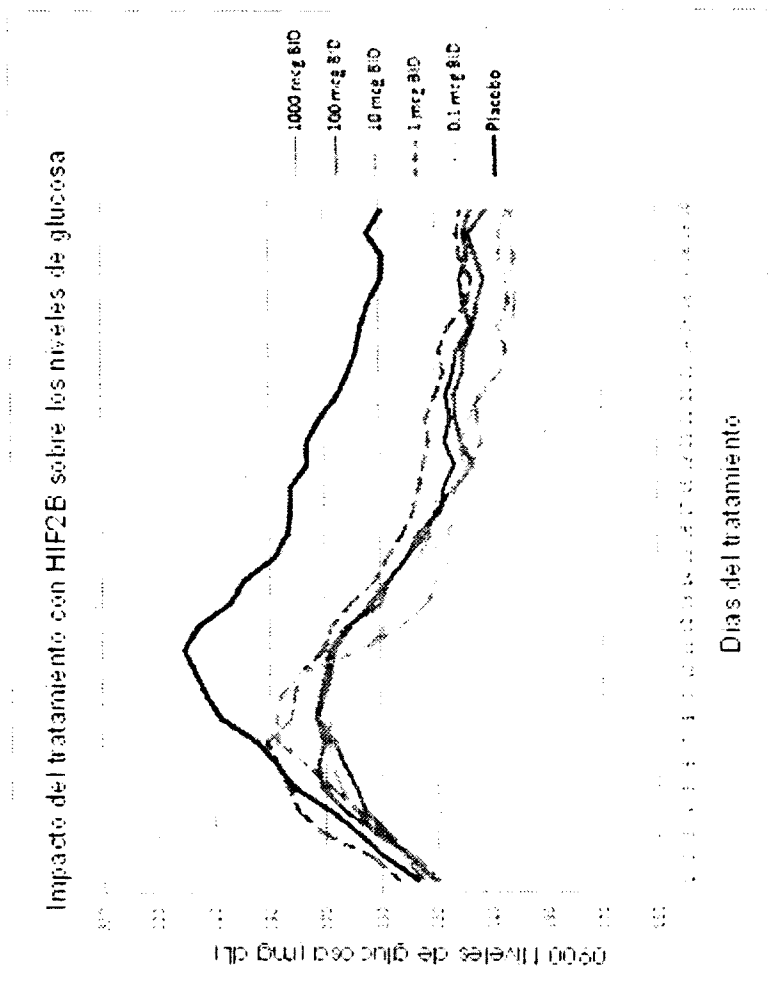


Fig. 22
24/27

Impacto de las concentraciones de HIP2B sobre la atenuación de la diabetes

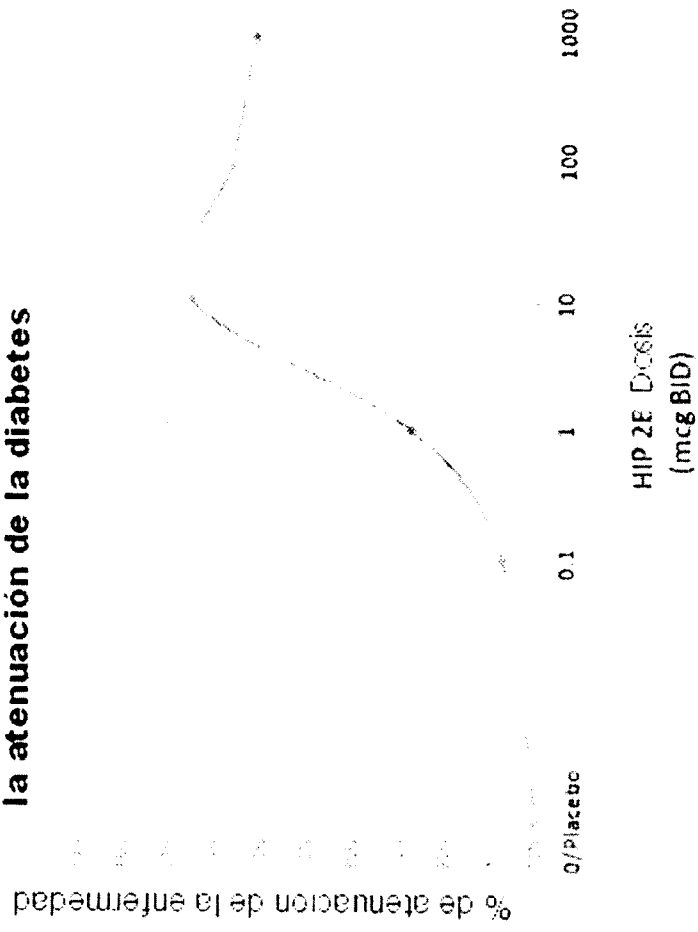


Fig. 23
25/27

Comparación de estudio PK de HIP2B, HIP2 e INGAP

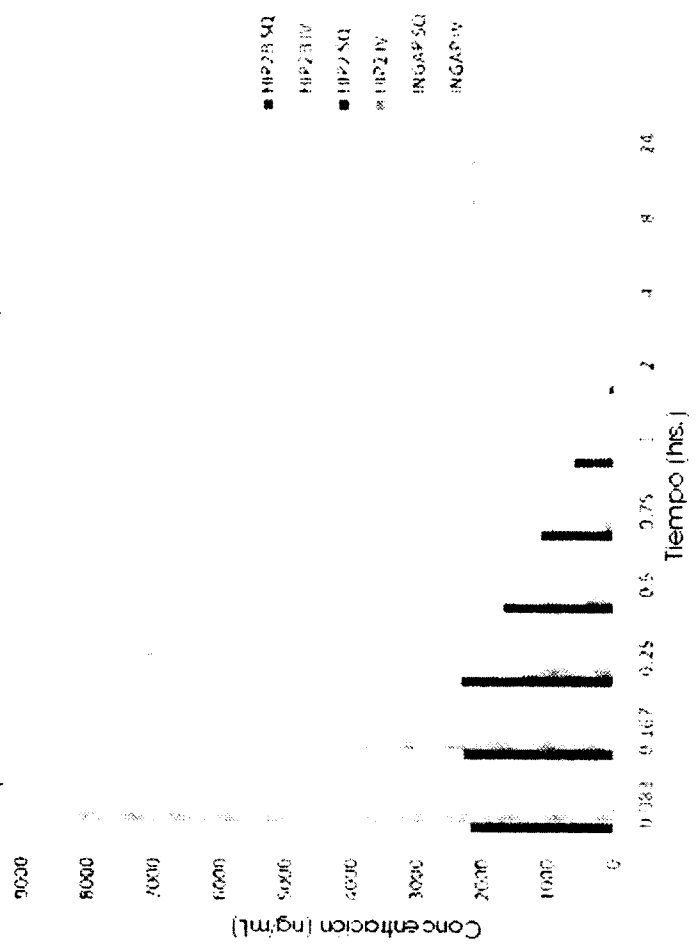


Fig. 24
26/27

FARMACOCINÉTICA SQ DE HIP2b

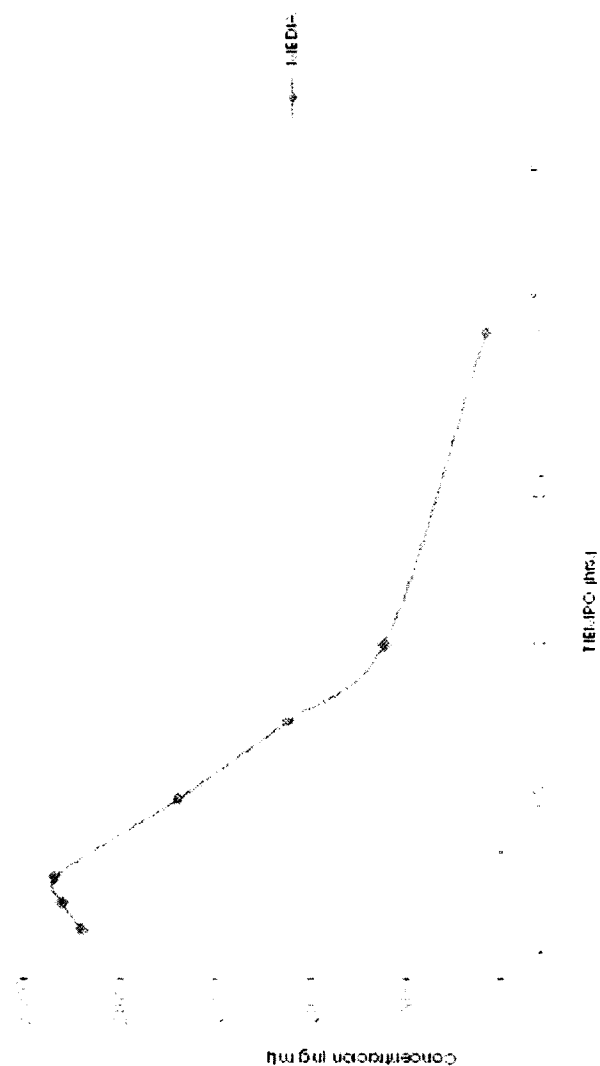


Fig. 25
27/27

P1979-80 Spanish Sequence Listing
Listado de Secuencias

<110> CureDM, Inc.
Levetan, Clara S.

<120> COMPOSICIONES Y METODOS PARA UTILIZAR POLIPEPTIDOS PROISLET Y ANALOGOS
DEL MISMO

<130> 132163.00502

<150> US 60/969,019
<151> 2007-08-30

<150> US 60/979,526
<151> 2007-10-12

<150> US 60/991,964
<151> 2007-12-03

<150> US 61/031,479
<151> 2008-02-26

<160> 94

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 528
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atgctgcctc ccatggccct gccagtgta tcttgatgc tgctttcctg cctcatgctg 60
ctgtctcagg ttcaagggtga agaaccacag agggaaactgc cctctgcacg gatccgctgt 120
cccaaaggct ccaaggccta tggctccac tgctatgcct tgtttttgtc accaaaatcc 180
tggacagatg cagatctggc ctgccagaag cggccctctg gaaacctggt gtctgtgctc 240
agtggggctg agggatcctt cgtgtcctcc ctggtgaaga gcattggtaa cagctactca 300
tacgtctgga ttgggctcca tgacccaca cagggcaccg agcccaatgg agaaggttgg 360
gagtggagta gcagtgatgt gatgaattac tttgcatggg agagaaatcc ctccaccatc 420
tcaagccccg gccactgtgc gagcctgtcg agaagcacag catttctgag gtggaaagat 480
tataactgta atgtgaggtt accctatgtc tgcaagttca ctgactag 528

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
1 5 10 15

<210> 3

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(1)
 <223> ACLARACION

<220>
 <221> AMIDACION
 <222> (15)..(15)

<400> 5

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(1)
 <223> ACLARACION

<220>
 <221> AMIDACION
 <222> (15)..(15)

<400> 6

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
 1 5 10 15

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo. sapiens

<220>
<221> SITIO
<222> (1)..(1)
<223> ACILACION

<220>
<221> AMIDACION
<222> (14)..(14)

<400> 7

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DISULFID
<222> (15)..(15)

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<400> 11

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DISULFID

<222> (17)..(17)

<400> 12

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
1 5 10 15

Cys

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DISULFID

<222> (15)..(15)

<400> 13

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SITIO

<222> (1)..(1)

<223> ACILACION

<220>

<221> AMIDACION

<222> (16)..(16)

<400> 14

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(1)
 <223> ACILACION

<220>
 <221> AMIDACION
 <222> (16)..(16)

<400> 15

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(1)
 <223> ACILACION

<220>
 <221> AMIDACION
 <222> (15)..(15)

<400> 16

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(1)
 <223> ACILACION

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (16)..(16)

<220>
 <221> AMIDACION
 <222> (16)..(16)

<400> 17

p1979-80 Spanish Sequence Listing

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITIO
<222> (1)..(1)
<223> ACILACION

<220>
<221> DISULFID
<222> (16)..(16)

<220>
<221> AMIDACION
<222> (16)..(16)

<400> 18

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITIO
<222> (1)..(1)
<223> ACILACION

<220>
<221> DISULFID
<222> (15)..(15)

<220>
<221> AMIDACION
<222> (15)..(15)

<400> 19

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITIO

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<222> (16)..(16)
<223> PEGYLATION

<400> 20

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITIO
<222> (16)..(16)
<223> PEGYLATION

<400> 21

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITIO
<222> (15)..(15)
<223> PEGYLATION

<400> 22

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITIO
<222> (1)..(1)
<223> ACILACION

<220>
<221> SITIO
<222> (16)..(16)
<223> PEGYLATION

<220>
<221> AMIDACION
<222> (16)..(16)

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<400> 23

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys
1 5 10 15

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITIO
<222> (1)..(1)
<223> ACILACION

<220>
<221> SITIO
<222> (16)..(16)
<223> PEGYLATION

<220>
<221> AMIDACION
<222> (16)..(16)

<400> 24

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITIO
<222> (1)..(1)
<223> ACILACION

<220>
<221> SITIO
<222> (15)..(15)
<223> PEGYLATION

<220>
<221> AMIDACION
<222> (15)..(15)

<400> 25

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<400> 26

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 27

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser
1 5 10 15

<210> 28

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu Ser
1 5 10 15

Cys Leu Ile Leu Leu Cys Gln Val Gln Gly Glu Glu Thr Gln Lys Glu
20 25 30

Leu Pro Ser Pro Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly
35 40 45

Ser Pro Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Met Asp Ala
50 55 60

Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Arg Ser Ile Ser
85 90 95

Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly
100 105 110

Ser Glu Pro Asp Gly Asp Gly Trp Glu Trp Ser Ser Thr Asp Val Met
115 120 125

Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Lys Asn Pro Ser Thr Ile Leu Asn Pro Gly
130 135 140

His Cys Gly Ser Leu Ser Arg Ser Thr Gly Phe Leu Lys Trp Lys Asp
145 150 155 160

P1979-80 Spanish Sequence Listing

Tyr Asn Cys Asp Ala Lys Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Lys Asp
165 170 175

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
1 5 10 15

<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<400> 31

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly
1 5 10 15

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 32

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser
1 5 10 15

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly
1 5 10 15

<210> 34
<211> 16
<212> PRT

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<213> Rattus norvegicus

<400> 34

Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly
1 5 10 15

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 35

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala Gly
1 5 10 15

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 36

Trp Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala Asp
1 5 10 15

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 37

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala Gly
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 38

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 39

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10 15

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 41

Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 42

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 43

Trp Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

<400> 44

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
 1 5 10 15

<210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<400> 45

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

P1979-80 Spanish Sequence Listing

1

5

10

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 46

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 48

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 49

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
1 5 10

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Canis familiaris

<400> 50

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
1 5 10

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Ovis aries

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<400> 51

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
1 5 10

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 52

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly
1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly
1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 54

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly
1 5 10 15

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 55

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Ser Glu Pro Asp Ala Gly
1 5 10

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 56

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala Asp
1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<212> PRT
<213> Ovis aries

<400> 57

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala Gly
1 5 10 15

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10 15

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Asp
1 5 10 15

<210> 60
<211> 14
<212> PRT
<213> Pan troglodytes

<400> 60

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 61

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 62

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<210> 63
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 63

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 64

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
 1 5 10

<210> 65
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 65

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
 1 5 10

<210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

<400> 66

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
 1 5 10

<210> 67
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 67

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp
 1 5 10

<210> 68
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

P1979-80 Spanish Sequence Listing

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 69

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 70
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70

Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Arg Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 71
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 71

Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Ser Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 72
<211> 14
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 72

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp
1 5 10

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 73

Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 74
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<400> 74

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gly Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 75

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg
1 5 10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Ala Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Tyr Glu Pro Asn Arg
1 5 10

<210> 79

<211> 14

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 79

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg
1 5 10

<210> 80

P1979-80 spanish Sequence Listing

<211> 14
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 80

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 81
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10

<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 82

Ile Gly Leu His Asp Leu Ser Leu Gly Ser Leu Pro Asn Glu
1 5 10

<210> 83
<211> 14
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 83

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Ala Asn Ala
1 5 10

<210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 84

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10

<210> 85
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp
1 5 10

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<210> 86
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 86

Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Lys Gln Leu Trp Gln Trp
 1 5 10

<210> 87
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Pan troglodytes

<400> 87

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
 1 5 10

<210> 88
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 88

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
 1 5 10

<210> 89
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Canis familiaris

<400> 89

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala
 1 5 10

<210> 90
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

<400> 90

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala
 1 5 10

<210> 91
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

P1979-80 Spanish Sequence Listing

<220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(1)
 <223> PEGYLATION

<400> 91

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 92
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92

Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93

His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
 1 5 10

<210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(1)
 <223> ACILACION

<220>
 <221> AMIDACION
 <222> (15)..(15)

<220>
 <221> SITIO
 <222> (15)..(15)
 <223> CYSTEINE ADDUCT

<400> 94

Ile Gly His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys Cys
 1 5 10 15



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: **5 DE ABRIL DE 2010**

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **CURED M, INC.**

(72) Inventor(es) **Claresa S. LEVETAN y Victor M. GARSKY**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País

ESTADOUNIDENSE	60/969,019	30/08/2007	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE	60/979,526	12/10/2007	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE	60/991,964	03/12/2007	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE	61/031,479	26/02/2008	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **05/03/2009**

Fecha de presentación de la solicitud: **29/08/2008**

N° publicación: **WO 2009/029847**

No. de solicitud: **PCT/US2008/074868**

(54) Título: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA UTILIZAR PÉPTIDOS PROISLET Y SUS ANÁLOGOS**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: **5 DE ABRIL DE 2010**

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **CURED M, INC.**

(72) Inventor(es) **Claresa S. LEVETAN y Victor M. GARSKY**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
ESTADOUNIDENSE		60/969,019		30/08/2007		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE		60/979,526		12/10/2007		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE		60/991,964		03/12/2007		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE		61/031,479		26/02/2008		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **29/08/2008**

No. de solicitud: **PCT/US2008/074868**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **05/03/2009**

No. de publicación: **WO 2009/029847**

(84) Título: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA UTILIZAR PÉPTIDOS PROISLET Y SUS ANÁLOGOS**

Resumen:

Un péptido Prolslet caracterizado porque comprende una modificación de optimización, donde dicha modificación de optimización se selecciona del grupo formado por un grupo acetilo N-terminal, un grupo amida C-terminal, y un residuo de cisteína C-terminal.



No. 10-037698- -00000-0000

Fecha: 2010-04-05 16:41:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 176

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita 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 ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO
Apoderado(a) y/o Representante de
CUREDM, INC

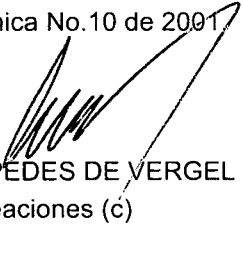
REFERENCIA	Radicación No.	10 037698
	Solicitud internacional	PCT/US2008/074868
	Fecha inicio fase nacional	30/03/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	NO 06390

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos 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 CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

14 MAYO 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

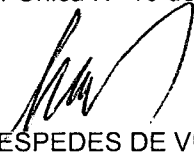
Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO
Apoderado(a) y/o Representante de
CURED M, INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 037698
	Solicitud internacional	PCT/US2008/074868
	Fecha inicio fase nacional	30/03/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	06391

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

14 MAYO 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11