

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-171916-00000-0000

Fecha: 2012-10-01 16:33:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: NUEVOS PÉPTIDOS Y MÉTODOS PARA SU PREPARACIÓN Y
USO.

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

DIRECCIÓN: Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 28 de Septiembre de 2012

P2012/000073

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & A

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-171916- 00000-0000

Fecha: 2012-10-01 16:33:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000073

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center,
Indianápolis, Indiana 46285

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700

Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2011/029501

Fecha

Marzo 23, 2011

Publicación Internacional No. WO 2011/119657 A1

Fecha

Septiembre 29, 2011

6

Título (54) NUEVOS PÉPTIDOS Y MÉTODOS PARA SU PREPARACIÓN Y USO.

Clasificación Internacional (51) A61K 38/16; C07K 14/47; C07K 14/62; A61K
38/30; A61K 38/26; C07K 14/605.

Prioridad

SI ☒

NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Marzo 26, 2010

(31) Número de Solicitud

61/317,850

9

Comprobante de pago No. 12-0089995

Fecha

Agosto 31, 2012



ANEXOS

2



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 08-110.817



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



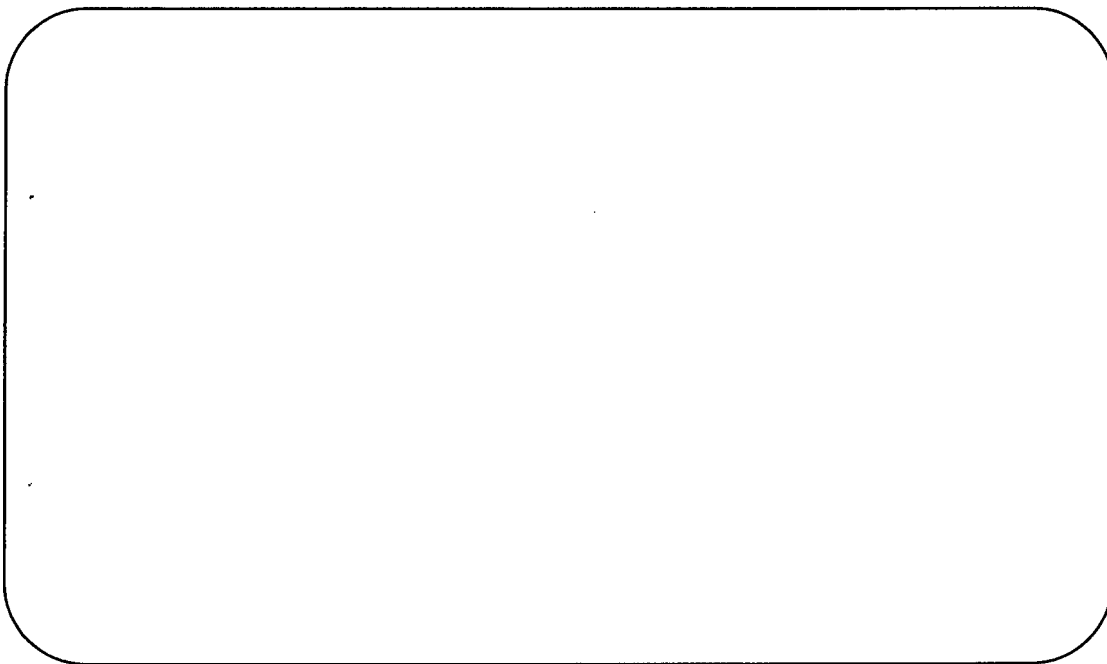
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

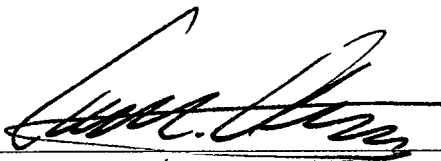


FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2011/029501

Jorge ALSINA-FERNANDEZ

Eli Lilly and Company
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Española

Krister Bengt BOKVIST

Eli Lilly and Company
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Sueca

Lili GUO

Eli Lilly and Company
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285
Estados Unidos de América
Nacionalidad: China

John Philip MAYER

Eli Lilly and Company
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0089995
		Bogotá D.C., Agosto 31 de 2012 - 16:19:58

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	494783634	31/08/2012	5.310.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00 590.000.00
			\$590.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-171916- -00000-0000
Fecha: 2012-10-01 16:33:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO ☐

☐ 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)

CD 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 ☐

FC Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA	
		RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			Planilla:

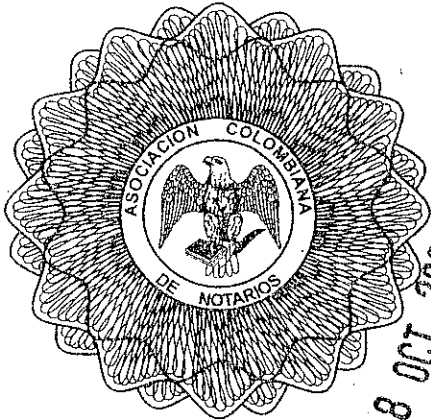
ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	17		
2			
3			
4	12-171916 - 0		
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
~~7~~	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

1 Anexa CA

WK 9397304



28 OCT. 2008

ESCRITURA PUBLICA NUMERO : (1 2 2 7)

MIL DOSCIENTOS VEINTISIETE

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, a los Veintiocho -- (28) días del mes de Octubre -- -- del año dos mil ocho (2008), ante mi MARIA EUGENIA

ROJAS DE URUETA NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE PODER.-----

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS Y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA.-----

C.C. No. 79.376.996 Y 79.782.747.-----

Comparecieron JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS, mayor de edad vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.376.996 de estado civil casado con sociedad conyugal vigente y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y dijeron:-----

PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cinco (5) folios autenticados, un poder y sus traducciones los cuales son del siguiente tenor:-----

PODER-----

El suscrito ELI LILLY AND COMPANY, domiciliado en Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285 US por medio del

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri, poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de patentes, modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial o extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones y demandas que por motivo de encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultades para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.-----

Firma (ilegible) -----

Fecha 17 July 2003 -----

City, Country/ Ciudad, País: Indianápolis, Indiana, United Status of America.- -----

Traducccion oficial del Inglés por Marlén Neira Castro resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia.- -----

APOSTILLA EN PODER DE DE REPRESENTACION DE ELI LILLY AND COMPANY.

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapoles, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Meter G. Stringer, Director Ejecutivo y patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.- -----

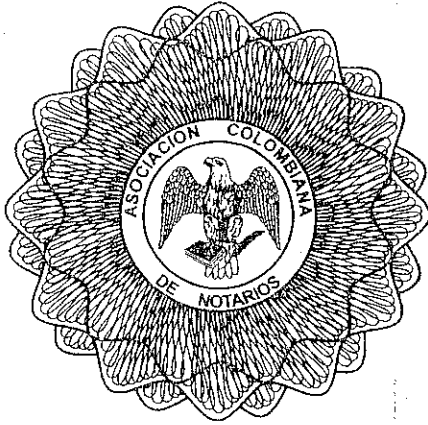
Todd Rokita Secretario de Estado -----

Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana -----

APOSTILLA

(Convencion de la Haya del 5 octubre 1961)

WK 9397305



1. País: Estados Unidos de América-
este documento público -----
2. Ha sido firmado por: Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario
de la Corte del Circuito en y para el
condado Jonson -----
- 4 Lleva el sello del Secretario de la Corte
del Circuito en y para el estado de Indiana -----

Certificado

5. En: Indianapoles, Indiana -----
6. El: 22 de julio de 2003.-----
7. Por el Secretario de Estado de Indiana 8 No. A2003-1279-----
9. Gran Sello del Estado de Indiana -----
10. Firma ilegible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana
- * Vigente desde el 1 de mayo de 2003, todas las apostillas de
Secretario y de Estado de Indiana tienen el sello impreso
electrónicamente. -----
- The Statehouse, Indianapoles, Indiana 46204, (307) 232-6531, fax
(317) 233-3283- -----

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario
Catherine Michel certifica que Meter G. Stringer, domiciliado en
7620 Castleton Faros, West Drive Indianápolis, Indiana- 46256
Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes
Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianápolis,
Indiana, Estados Unidos.--

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial inglés-
Español- Inglés-----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.- -----

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento:
Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de
Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité Ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.-----

Firma del notario público Catherine Michel certifica sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008- residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana.-----

Es traducción fiel de inglés, con copia archivo para confrontación, Bogotá 28 de julio-2003.-----

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial Inglés-Español- Inglés -----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.------

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

Se advierte que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -----

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).-----

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
ELI LILLY AND COMPANY

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Peter G. Stringer, Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.

Todd Rokita Secretario de Estado
Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América- Este documento Público
2. ha sido firmado por Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario de la Corte del Circuito en y para el condado Johnson
4. Lleva el sello del Secretario de la Corte del Circuito en y para el estado de Indiana

CERTIFICADO

5. En Indianapolis, Indiana
6. El 22 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado de Indiana
8. No. A2003- 1127
9. Gran Sello del Estado de Indiana
10. Firma legible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana

* Vigente desde el 1 mayo de 2003, todas las apostillas del Secretario de Estado de Indiana tienen el sello impreso electrónicamente.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, fax (317) 233-3283

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario Catherine Michel certifica que Peter G. Stringer, domiciliado en 7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana - 46256 Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos.


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento: Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.

Firma del notario público Catherine Michel certifica

Sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008 - residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana

--

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 28 de julio-2003.

Marlen Neira C



MARLEN NEIRA CASTRO

Traductor e Intérprete Oficial

Inglés - Español - Inglés

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER – TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

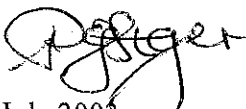
The undersigned,

domiciled in

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents, Utility Models and Industrial Designs** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma



Date/Fecha: / 7 July 2003

City, Country/Ciudad, País: Indianapolis, Indiana, United States of America

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de **Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

NOTARIA VERIFICADA
BOGOTÁ - República de Colombia



Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA



APOSTILLE

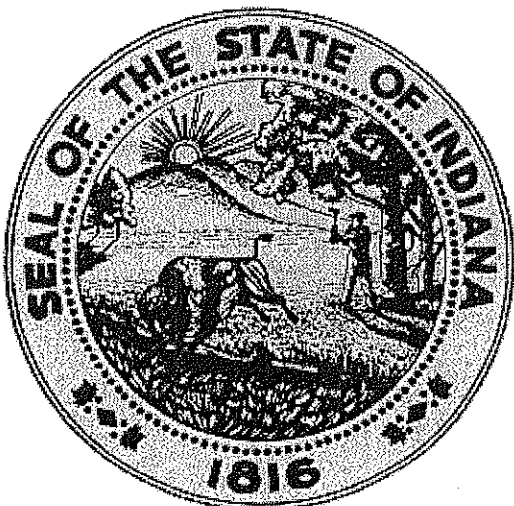
(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Catherine Michel*
3. acting in the capacity of circuit court clerk in & for *Johnson County*
4. and bears the seal/stamp of circuit court clerk in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Twenty-second day of July, 2003*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. *A2003- 11279*
9. Seal/Stamp:

10. Signature:




Todd Rokita

Indiana Secretary of State

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, Fax (317) 233-3283

OLARTERAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
/ 7 July 2003
The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in
7620 Castleton Farms, West Drive,
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Executive Director, International
Patents
of ELI LILLY AND COMPANY

3. That ELI LILLY AND COMPANY
having its principal place of business located in
Indianapolis, Indiana, United States of
America

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Delegation of Authority Concerning Certain
Patent Matters, executed January 20, 2003;
pursuant to the authority granted to the
General Counsel of the Company by the
executive Committee of the Board of
Directors of Eli Lilly and Company

NOTARY PUBLIC (Signature):



Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Peter G. Stringer
mayor de edad y domiciliado
Indianapolis, Indiana 46256 US
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de

de

4. Que
con sede principal ubicada en

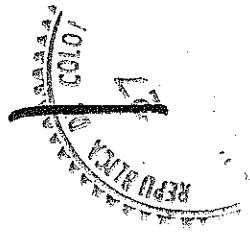
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARIO PUBLICO
Catherine Michel
Notario Eugenio Rojas de Hueta

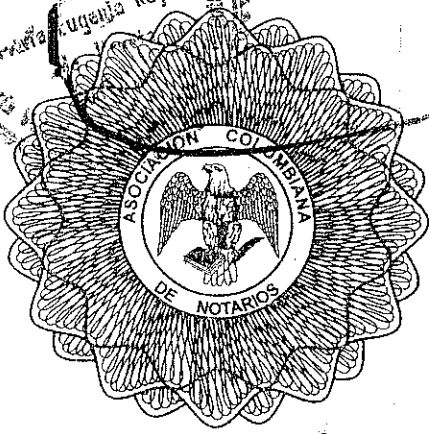
Catherine Michel
My Commission Expires October 21, 2008
Resident of Johnson County



ESPACIO EN BLANCO

ESPACIO EN BLANC

WK 9397306



ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y
AUTORIZACION.- Leído el presente
instrumento por el (los) compareciente
(s) y advertido (s) sobre las
formalidades legales, lo aprueban y
firman conmigo y ante mí la(el)
Notaria(o) quién lo autoriza. ---Se

utilizaron las hojas de papel Notarial Nos. WK 9397304, WK 9397305 Y
WK 9397306 .

DERECHOS LEGALES: \$ 39.630.00

RESOLUCION 8850 DE 2007

IVA \$ 10.781.00

James Ian Raisbeck Llínas

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS

C.C.No. 79.376.996 BOGOTA

TEL: 601-7700

Carlos Reinaldo Olarte Garcia

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

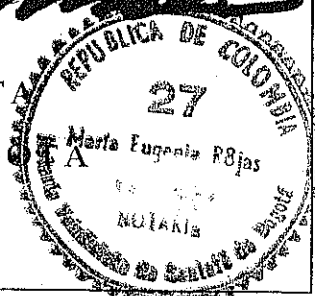
C.C.No. 79.782.747 BOGOTA.

TEL: 601-7700

Maria Eugenia Rojas de Urqueta

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTÁ

redb.



ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

Es fiel y Segunda ^(2ª)
fotocopia de la Escritura Pública No. 1227
de fecha 28 de Octubre de 2008
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 28 OCT 2008
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá



ESPACIO EN BLANCO

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application ELI LILLY AND COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 61/317,850 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from ALSINA-FERNANDEZ, Jorge to ELI LILLY AND COMPANY, dated 29 March 2010 (29.03.2010)
VIII-3-1(i v)		an assignment from BOKVIST, Krister Bengt to ELI LILLY AND COMPANY, dated 29 March 2010 (29.03.2010)
VIII-3-1(i v)		an assignment from GUO, Lili to ELI LILLY AND COMPANY, dated 29 March 2010 (29.03.2010)
VIII-3-1(i v)		an assignment from MAYER, John Philip to ELI LILLY AND COMPANY, dated 29 March 2010 (29.03.2010)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 September 2011 (29.09.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/119657 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/30* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *A61K 38/26* (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01) *C07K 14/605* (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2011/029501

(22) International Filing Date:

23 March 2011 (23.03.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/317,850 26 March 2010 (26.03.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ALSINA-FERNANDEZ, Jorge** [ES/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate, Indianapolis, Indiana 46285 (US). **BOKVIST, Krister Bengt** [SE/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US). **GUO, Lili** [CN/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US). **MAYER, John Philip** [US/US]; Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).

(74) Agents: **DINGESS-HAMMOND, Elizabeth A.** et al.; Eli Lilly And Company, Patent Division, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

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

(54) Title: NOVEL PEPTIDES AND METHODS FOR THEIR PREPARATION AND USE

(57) Abstract: The present invention is in the field of treatment of diabetes and relates to peptides that exhibit activity for both glucose-dependent insulintropic peptide receptor (GIP-R) and glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1-R) and are selective over glucagon receptor (Gluc-R). Specifically provided are GIP analogs with amino acid substitutions introduced to modulate activity for both GIP-R and GLP-1-R and maintain selectivity over Gluc-R.



WO 2011/119657 A1

NOVEL PEPTIDES AND METHODS FOR THEIR PREPARATION AND USE

The present invention is in the field of treatment of diabetes and relates to peptides that exhibit activity for both glucose-dependent insulintropic peptide receptor (GIP-R) and glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1-R) and are selective over glucagon receptor (Gluc-R). Specifically provided are GIP analogs with amino acid substitutions introduced to modulate activity for both GIP-R and GLP-1-R and maintain selectivity over Gluc-R.

GIP, known both as gastric inhibitory peptide or glucose-dependent insulintropic peptide, is a 42-amino acid gastrointestinal regulatory peptide that has been shown to stimulate insulin secretion from pancreatic beta cells in the presence of glucose, thus playing a physiological role in glucose homeostasis. GLP-1 is a 37-amino acid peptide that protects pancreatic beta cells and inhibits glucagon secretion, gastric emptying and food intake which lead to weight loss. GIP and GLP-1 are known as incretins. Incretin receptor signaling exerts physiologically relevant action critical for glucose homeostasis. Glucagon is a 29-amino acid peptide that is produced by the pancreas. This hormone signals the liver to release glucose which results in an increase in blood glucose. Thus, stimulation of Gluc-R is undesirable in a diabetic setting.

In difference to what is observed in healthy subjects, GIP alone has a very modest glucose-lowering effect in type 2 diabetic humans. However, after some glucose-lowering is achieved, the efficacy of GIP is increased and becomes close to that observed in a normoglycaemic subject. On the other hand, GLP-1 is effective at glucose-lowering in both healthy and diabetic subjects but causes nausea and thus, full efficacy of GLP-1 may never be realized. Further, both GIP and GLP-1 are inactivated rapidly by the ubiquitous protease, dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), which produces peptides that are incapable of stimulating insulin secretion and therefore, can only be used for short-term metabolic control.

Certain GIP analogs have been described in WO 2010/016940 and WO 2010/016944. Certain glucagon analogs have been described as exhibiting both GIP and GLP-1 activity in WO 2010/011439.

Current treatment for diabetes includes insulin secretagogues, such as sulfonylureas and glitinides, which often exhibit a progressive reduction in efficacy and may cause hypoglycemia in patients with Type 2 diabetes. As such, there is a need to

identify new agents which potentiate insulin secretion in a sustained glucose-dependent manner. It is also desirable to identify new agents that possess the glucose-lowering effects of GLP-1 without the nausea and to further identify new agents that have increased metabolic stability.

5 The present invention provides new potent and efficacious peptides with amino acid substitutions introduced to modulate activity for both GIP and GLP-1 while maintaining selectivity over glucagon. This invention achieves the glucose-lowering effects of GLP-1 and harnesses the glucose-stimulated insulin secretion effects of GIP. Moreover, certain compounds of the invention provide effective treatments to reduce
10 body weight.

The present invention provides a peptide comprising the sequence:

```

15 Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
      5                                10
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Xaa1-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
15      20                                25
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-
      30                                35                                40
20 Xaa2-Xaa3 (SEQ ID NO:1)

```

wherein Xaa¹ at position 22 is Nal or Phe; Xaa² at position 43 is Cys or absent;
Xaa³ at position 44 is Cys or absent; the C-terminal amino acid is optionally amidated;
and provided that where Xaa² at position 43 or Xaa³ at position 44 is Cys, then either or
25 both are optionally PEGylated.

One embodiment of the present invention relates to peptides where Xaa¹ is Phe. A preferred embodiment of the present invention relates to peptides where Xaa¹ is Nal.

One embodiment of the present invention relates to peptides where Xaa² and Xaa³ are absent. A preferred embodiment of the present invention relates to peptides where Xaa² and Xaa³ are each Cys. In said embodiment, it is preferred that the carboxyl group of the Cys at position 44 is amidated.

A further preferred embodiment of the present invention relates to peptides where the peptide is PEGylated at either Cys at positions 43 and 44 with a 20 kDa PEG

molecule. In said embodiment, it is preferred that the carboxyl group of the C-terminal Cys is amidated. Another preferred embodiment of the present invention relates to peptides where the peptide is PEGylated at both Cys at positions 43 and 44 with a 20 kDa PEG molecule. In said embodiment, it is preferred that the carboxyl group of the C-terminal Cys is amidated.

One embodiment of the present invention relates to peptides wherein Xaa¹ is Phe; and Xaa² and Xaa³ are absent. In said embodiment, it is preferred that the carboxyl group of the C-terminal Gln at position 42 is amidated. A preferred embodiment of the present invention relates to peptides wherein Xaa¹ is Nal; and Xaa² and Xaa³ are absent. In said embodiment, it is preferred that the carboxyl group of the C-terminal Gln at position 42 is amidated.

A more preferred embodiment of the present invention relates to peptides wherein Xaa¹ is Phe; Xaa² and Xaa³ are both Cys and both are optionally PEGylated and the carboxyl group of Cys at position 44 is optionally amidated. An especially preferred embodiment of the present invention relates to peptides wherein Xaa¹ is Nal; Xaa² and Xaa³ are Cys and either or both Cys are optionally PEGylated and the carboxyl group of the Cys at position 44 is optionally amidated.

An especially preferred embodiment of the present invention is
Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-
Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Aib-Lys-
Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys (PEG20K) -
Cys (PEG20K) (SEQ ID NO: 2)

and the Cys at position 44 is amidated. This peptide is referred to as Aib², Aib¹³, Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP.

A most preferred embodiment of the present invention is
Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-
Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Aib-Lys-
Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys (PEG20K) -
Cys (PEG20K) (SEQ ID NO: 3)

and the Cys at position 44 is amidated. This peptide is referred to as Aib², Aib¹³, Nal²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP.

The present invention also provides a method for treating diabetes mellitus in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective

amount of a peptide of the invention. The present invention further provides a method for treating non-insulin-dependent diabetes mellitus in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a peptide of the invention. The present invention further provides a method for treating insulin-dependent diabetes mellitus in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a peptide of the invention.

Moreover, the present invention also provides a method for treating a condition selected from the group consisting of obesity, metabolic syndrome, coronary artery disease, and atherosclerosis by administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a peptide of the invention. Furthermore, the present invention provides a method for inducing weight loss by administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a peptide of the invention. The present invention also provides a method for treating frailty or increasing bone strength by administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a peptide of the invention.

Furthermore, this invention provides a peptide of the invention for use in therapy. In a particular embodiment, the invention provides a peptide of the invention for use for the treatment of diabetes mellitus. This invention provides a peptide of the invention for use for the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. This invention provides a peptide of the invention for use for the treatment of insulin-dependent diabetes mellitus. Also, this invention provides a peptide of the invention for use for the treatment of obesity. Additionally, this invention provides a peptide of the invention for use for the treatment of a condition selected from the group consisting of obesity, metabolic syndrome, coronary artery disease, and atherosclerosis. This invention further provides a peptide of the invention for use for inducing weight loss. Also this invention provides a peptide of the invention for use for the treatment of frailty or increasing bone strength.

This invention also provides the use of a peptide of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetes mellitus. This invention also provides the use of a peptide of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of obesity. This invention further provides the use of a peptide described above for the manufacture of a medicament for the treatment of a condition selected from the group consisting metabolic syndrome, coronary artery disease, and atherosclerosis. This invention further provides the use of a peptide of the invention for the manufacture of a

medicament for the inducement of weight loss. This invention also provides the use of a peptide of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of frailty or the increase of bone strength.

Additionally, this invention provides a pharmaceutical formulation comprising a peptide of the invention with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient. Further, this invention provides a pharmaceutical formulation adapted for the treatment of diabetes mellitus. This invention provides a pharmaceutical formulation adapted for the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. This invention provides a pharmaceutical formulation adapted for the treatment of insulin-dependent diabetes mellitus. Further, this invention provides a pharmaceutical formulation adapted for the treatment of obesity. This invention also provides a pharmaceutical formulation adapted for the treatment of a condition selected from the group consisting of metabolic syndrome, coronary artery disease, and atherosclerosis. This invention provides a pharmaceutical formulation adapted for the inducement of weight loss. This invention further provides a pharmaceutical formulation adapted for the treatment of frailty or the increase of bone strength. In a particular embodiment, the formulation further comprises one or more other therapeutic agents.

This invention also provides pharmaceutical compositions comprising a peptide of the invention with one or more pharmaceutically acceptable carriers, diluents, or excipients. In a particular embodiment, the composition further comprises one or more other therapeutic agents.

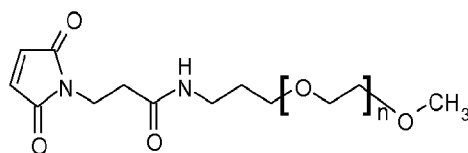
The present invention additionally provides stable molecules that are less susceptible to rapid metabolic deactivation by DPPIV.

The sequences of the present invention contain the standard single letter or three letter amino acid codes for the twenty naturally occurring amino acids. The other amino acid codes used are defined as follows: Aib = alpha-amino isobutyric acid; Nal = 1-naphthylalanine.

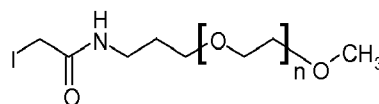
The term "C-terminal amino acid" refers to the last amino acid in the sequence of a peptide that contains a free carboxyl group. The C-terminal amino acid of the present invention may be Gln at position 42, Cys at position 43, or Cys at position 44.

The term "polyethylene glycol" or "PEG" refers to a polyalkylene glycol compound or derivative thereof, with or without coupling agents or derivatization with

coupling or activating moieties. In its typical form, PEG is a linear polymer with terminal hydroxyl groups and has the formula $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$, where n is from about 8 to 4000. mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol. Because PEGs are typically generated and used as mixtures of PEG compounds varying to some degree in their molecular weight, one of ordinary skill in the art generally describes the molecular weight of a PEG attached to a compound by describing the mean molecular weight of the PEG reagent used in the PEGylation reaction that generated the particular PEGylated compound. Numerous derivatives of PEG exist in the art. The PEG molecules covalently attached to the peptides of the present invention may be 10,000 Daltons, 20,000 Daltons, 30,000 Daltons or 40,000 Daltons. The mean of the PEG molecules is preferably 18,000 to 22,000 Daltons. More preferably, the mean is 19,000 to 21,000 Daltons. Most preferably the mean is 20,000 to 21,000 Daltons. The PEG molecules may be linear or branched and may be present singularly or in tandem. The PEGylated peptides of the present invention preferably have tandem linear PEG molecules attached to the C-terminus of the peptide. In particular, the PEG molecules are preferably attached to the two cysteine residues at the C-terminal end of the peptide by an mPEG-20kDa maleimide (mPEG MAL) (I) or an mPEG-20kDa iodoacetamide (II) where n is 10 to 2500. Preferably, n is 350 to 600. More preferably, n is 425 to 475.



I



II

The term “PEGylation” as used herein means the covalent attachment of one or more PEG molecules as described above to the peptides of the present invention. For example, a peptide of the present invention is PEGylated at Cys at positions 43 and 44 with a 20kDa PEG molecule covalently linked to the thiol group of each Cys.

The following abbreviations are used herein: “t-Bu” refers to *tert*-butyl; “fmoc” refers to fluorenylmethyloxycarbonyl; “Pbf” refers to 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl; “Trt” refers to trityl or triphenylmethyl; “OtBu” refers to *tert*-butoxyl; “Boc” refers to *tert*-butoxycarbonyl; “PyBOP” refers to (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate; “DIEA”

- refers to diisopropylethylamine; "HEK" refers to human embryonic kidney; "Tris" refers to 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol; "BSA" refers to bovine serum albumin; "HEPES" refers to 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid; "PBS" refers to phosphate buffered saline; "NSB" refers to non-specific binding;
- 5 "HBSS" refers to Hank's buffered salt solution; "IBMX" refers to 1-methyl-3-(2-methylpropyl)-7H-purine-2,6-dione; and "DMSO" refers to dimethyl sulfoxide.

Peptide Synthesis

- All peptides of the present invention are generated by solid-phase peptide synthesis on a Protein Technologies Inc. Symphony® automated peptide synthesizer.
- 10 Synthesis is performed on Fmoc-Rink amide polystyrene resin (Rapp Polymere Tubingen, Germany) with substitution approximately 0.7 mmol/g. The synthesis is performed using Fmoc/t-Bu solid phase peptide synthesis. Amino acid side-chain derivatives used are: Arg(Pbf), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc) and Tyr(tBu). Coupling is carried out with
- 15 approximately 6 equivalents of amino acid activated with diisopropylcarbodiimide (DIC) and hydroxybenzotriazole (HOBt) (1:1:1 molar ratio) in dimethylformamide (DMF) for 90 minutes at room temperature. The following conditions were used for the coupling of the Fmoc-(1-Nal)-OH at position 22: Fmoc-(1-Nal)-OH (3 equiv), PyBOP (3 equiv), and DIEA (6 equiv) in DMF for 3 h at room temperature. The following conditions were
- 20 used for the coupling of the Fmoc-Ile-OH at position 12: Fmoc-Ile-OH (6 equiv), PyBOP (6 equiv), and DIEA (12 equiv) in DMF for 10 h at room temperature.

- Concomitant cleavage from the resin and side chain protecting group removal are carried out in a solution containing trifluoroacetic acid (TFA) : triisopropylsilane : 1,2-ethanedithiol : methanol : thioanisole 90:4:2:2:2 (v/v) for 2 h at room temperature. The
- 25 solution is filtered and peptides are precipitated with cold diethyl ether, redissolved in 30-40 mL of 10 % acetonitrile in water, and purified on a C₁₈ reversed-phase HPLC column (typically a Waters SymmetryPrep™ 7 µm, 19 x 300 mm) at a flow rate of 18 mL/min. Samples are eluted with a two-stage linear AB gradient of 0 to 18 % B over 5 min followed by 18 to 45 % B over 110 minutes where A = 0.05% TFA/water and B =
- 30 0.05% TFA/acetonitrile. Product generally elutes at 28-35 % acetonitrile. Peptide purity and molecular weight are confirmed on an Agilent 1100 Series LC-MS system with a

single quadrupole MS detector. Analytical HPLC separation is done on a Zorbax® Eclipse™ XDB-C8, 5 µm, 4.6 mm i.d. x 15 cm column with a linear AB gradient of 6 to 60 % B over 15 minutes in which A = 0.05 % TFA/H₂O and B = 0.05% TFA/acetonitrile and the flow rate is 1 mL/min. All peptides are purified to > 95 % purity and are confirmed to have molecular weight corresponding to the calculated value within 1 amu.

EXAMPLE 1

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
 5 10
 10 Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
 15 20 25
 Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln
 30 35 40
 (SEQ ID NO: 4)

15 EXAMPLE 2

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
5 10
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
15 20 25
20 Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln
30 35 40
(SEQ ID NO: 5)

INTERMEDIATE 1

```

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
25          5          10
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
15          20          25
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys-
30          30          35          40
Cys
(SEQ ID NO: 6)

```

INTERMEDIATE 2

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
5 10
35 Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-

Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys-
Cys

5 (SEO ID NO: 7)

PEGylation of peptide with mPEG-MAL-20 kDa

The lyophilized peptide is weighed out (typically 30-50 mg). A 2.1 fold molar equivalent of mPEG-20kDa maleimide ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{-maleimide}$) (NOF SUNBRIGHT ME-200MA) (mPEG MAL) is weighed out and combined with the peptide. The reactants are dissolved in a 50/50 (v/v) water/acetonitrile mixture to a peptide concentration of approximately 20 mg/mL. The peptide solution is diluted two-fold with 100 mM ammonium acetate, 10 mM EDTA, pH 7. The resultant mixture is stirred at room temperature. The reaction mixture is monitored by analytical reversed phase HPLC (analytical HPLC separation is done on a Waters SymmetryShield™ C18, 3.5 μm , 4.6 mm i.d. x 10 cm column at 60 °C with a two-stage linear AB gradient of 0 to 30 % B over 5 minutes and 30 to 90 % B over the subsequent 30 min in which A = 0.05 % TFA/ H_2O and B = 0.05% TFA/acetonitrile and the flow rate is 1 mL/min.), and typically after 1-2 h reaction time, shows almost complete disappearance of the peptide peak. Two peaks due to mono- and di-PEGylated peptide appear with the di-PEGylated peptide typically constituting 90-95 % of the total peak area.

The sample is then typically diluted to about 40 mL with acidified water (0.05% TFA/water) and purified by C₁₈ reversed-phase HPLC column (typically a Waters SymmetryPrep™ 7 μm, 19 x 300 mm) at a flow rate of 10 mL/min. with a two-stage linear AB gradient of 0 to 25 % B over 15 min followed by 25 to 55 % B over 100 min. where A = 0.05% TFA/water and B = 0.05% TFA/acetonitrile. Product generally elutes at 35 – 40 % acetonitrile. The purified peptide is quantified by UV absorbance at 280 nm using a calculated molar extinction coefficient based on the peptide sequence. Yield after purification is typically in the range of 70 % based on the amount of starting peptide.

30

EXAMPLE 3

Aib², Aib¹³, Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP

EXAMPLE 4

Aib², Aib¹³, Nal²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP

5 The peptides of Example 3 and Example 4 have been PEGylated using mPEG-MAL.

PEGylation of peptide with mPEG-Iodoacetamide-20 kDa

The lyophilized peptide is weighed out (typically 30-50 mg). A 2.1 fold molar
10 equivalent of mPEG-20kDa iodoacetamide ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_2\text{-I}$)
(NOF SUNBRIGHT ME-200IA) is weighed out and combined with the peptide. The
reactants are dissolved in an aqueous buffer solution pH 8.5 (boric acid, potassium
chloride, sodium hydroxide buffer 0.1 M + 10 mM EDTA) + 20% acetonitrile (v/v) to a
peptide concentration of approximately 10 mg/mL. The resultant mixture is then stirred
15 at room temperature. The reaction mixture is monitored by analytical reversed phase
HPLC (analytical HPLC separation is done on a Waters SymmetryShield™ C18, 3.5
micron, 4.6 mm i.d. x 10 cm column at 60 °C with a two-stage linear AB gradient of 0 to
30 % B over 5 minutes and 30 to 90 % B over the subsequent 30 min in which A = 0.05
% TFA/H₂O and B = 0.05% TFA/acetonitrile and the flow rate is 1 mL/min.), and
20 typically after 18 h reaction time, shows almost complete disappearance of the peptide
peak. Two peaks due to mono- and di-PEGylated peptide appear with the di-PEGylated
peptide typically constituting 90-95 % of the total peak area.

The sample is then typically diluted to about 50 mL with acidified water (0.05%
TFA/water) and purified by C₁₈ reversed-phase HPLC column (typically a Waters
25 SymmetryPrep™ 7 μm, 19 x 300 mm) at a flow rate of 10 mL/min. with a two-stage
linear AB gradient of 0 to 25 % B over 15 min followed by 25 to 55 % B over 100 min.
where A = 0.05% TFA/water and B = 0.05% TFA/acetonitrile. Product generally elutes
at 35 – 40 % acetonitrile. The purified peptide is quantified by UV absorbance at 280 nm
using a calculated molar extinction coefficient based on the peptide sequence. Yield after
30 purification is typically in the range of 70 % based on the amount of starting peptide.

Alternatively, the lyophilized peptide is weighed out (typically 30-50 mg). A 2.1
fold molar equivalent of mPEG-20kDa iodoacetamide ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$

-11-

(CH₂)₃NHCOCH₂-I) (NOF SUNBRIGHT ME-200IA) is weighed out and combined with the peptide. The reactants are dissolved in an aqueous buffer solution pH 8.0 (0.1 M bicarbonate buffer + 10 mM EDTA) + 20% acetonitrile (v/v) to a peptide concentration of approximately 8 mg/mL. The resultant mixture is then stirred at room temperature in the dark. The reaction mixture is monitored by analytical reversed phase HPLC (analytical HPLC separation is done on a Waters SymmetryShield™ C18, 3.5 micron, 4.6 mm i.d. x 10 cm column at 60 °C with a two-stage linear AB gradient of 0 to 30 % B over 5 minutes and 30 to 90 % B over the subsequent 30 min in which A = 0.05 % TFA/H₂O and B = 0.05% TFA/acetonitrile and the flow rate is 1 mL/min.), and typically after 3 h reaction time, shows almost complete disappearance of the peptide peak. Two peaks due to mono- and di-PEGylated peptide appear with the di-PEGylated peptide typically constituting 90-95 % of the total peak area.

The sample is then typically diluted to about 50 mL with acidified water (0.05% TFA/water) and purified as described above. Yield after purification is typically in the range of 70 % based on the amount of starting peptide.

EXAMPLE 5: SEQ ID: 3

Aib², Aib¹³, Nal²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP

The peptide of Example 5 is PEGylated using mPEG-Iodoacetamide.

ASSAYS

In vitro

The compounds exemplified herein were tested as essentially as described below and exhibit a binding affinity (K_i) to GIP-R and GLP-1-R of lower than 100 nM and a selectivity ratio versus Gluc-R of at least 100 times. Further, the compounds herein exhibit a ratio of activity in the binding assays for GIP-R and GLP-1-R between 4:1 to 1:2 (GIP-R:GLP-1-R) (4:1 indicates higher potency at GIP-R; 1:2 indicates higher potency at GLP-1-R).

Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide Receptor (GIP-R) Binding Assay

The human glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor binding assay uses hGIP-R (Usdin,T.B., Gruber,C., Modi,W. and Bonner,T.I., GenBank: AAA84418.1) cloned into pcDNA3.1 (Promega)-NeoR plasmid. The hGIP-R-pcDNA3.1/Neo plasmid

-12-

is transfected into Chinese Hamster Ovary cells, CHO-S, for suspension cultures and selected in the presence of 500 µg/mL Geneticin (Invitrogen).

Crude plasma membranes are prepared using cells from suspension culture. The cells are lysed on ice in hypotonic buffer containing 25 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM
5 MgCl₂, DNase1, 20 µ/mL, and Roche Complete™ Inhibitors without EDTA. The cell suspension is homogenized with a glass dounce homogenizer using a Teflon® pestle for 25 strokes. The homogenate is centrifuged at 4 °C at 1800 x g for 15 minutes. The supernatant is collected and the pellet is resuspended in hypotonic buffer and rehomogenized. The mixture is centrifuged at 1800 x g for 15 minutes. The second
10 supernatant is combined with the first supernatant. The combined supernatants are recentrifuged at 1800 x g for 15 minutes to clarify. The clarified supernatant is transferred to high speed tubes and centrifuged at 25000 x g for 30 minutes at 4°C. The membrane pellet is resuspended in homogenization buffer and stored as frozen aliquots at -80 °C freezer until use.

15 GIP is radioiodinated by the I-125-lactoperoxidase procedure (Markalonis, J.J., *Biochem. J.* 113:299 (1969)) and purified by reversed phase HPLC at Perkin-Elmer/NEN (NEX-402). The specific activity is 2200 Ci/mmol. K_D determination is performed by homologous competition using cold hGIP instead of saturation binding. The receptor binding assay is carried out using a Scintillation Proximity Assay (SPA) (Sun, S.,
20 Almaden, J., Carlson, T.J., Barker, J. and Gehring, M.R. Assay development and data analysis of receptor-ligand binding based on scintillation proximity assay. *Metab Eng.* 7:38-44 (2005)) with wheat germ agglutinin (WGA) beads (GE Health Care) previously blocked with 1% fatty acid free BSA (Gibco, 7.5% BSA). The binding buffer contains 25 mM HEPES, pH 7.4, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.1% fatty acid free BSA, 0.003%
25 Tween20, and Roche Complete™ Inhibitors without EDTA. hGIP and the peptide analogs are dissolved in PBS and stored at -80 °C. The peptides analogs are serially diluted into binding buffer. Next, 10 µL diluted peptide is transferred into Corning® 3632 clear bottom assay plates containing 40 µL assay binding buffer or cold GIP (NSB at 0.1 µM final). Then, 90 µL membranes (4 µg/well), 50 µL [¹²⁵I] GIP (Perkin Elmer
30 Life and Analytical Sciences at 0.15 nM final in reaction), and 50 µL of WGA beads (150 µg/well) are added, sealed, and mixed end over end. Plates are read with a MicroBeta® scintillation counter after 12 hours of settling time at room temperature.

Results are calculated as a percent of specific I-125-GIP binding in the presence of compound. The Absolute IC₅₀ concentration of compound is derived by non-linear regression of percent specific binding of I-125-GIP vs. the concentration of compound added. The IC₅₀ concentration is converted to Ki using the Cheng-Prusoff equation where
5 the K_D is estimated to be 0.174 nM (Cheng, Y., Prusoff, W. H., *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108, (1973)).

Table 1

Example	Ki
1	0.044 nM
2	0.023 nM
3	9.79 nM
4	8.23 nM
5	9.22 nM

These data demonstrate that the peptides of Table 1 bind to GIP-R and may activate that
10 receptor in turn triggering GIP-dependent physiological responses.

Glucagon-Like-Peptide 1 (GLP-1-R) Receptor Binding Assay

The GLP-1 receptor binding assay uses cloned human glucagon-like peptide 1 receptor (hGLP-1-R) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD,
15 *Biochem Biophys Res Commun.* 196(1): 141-6, 1993) isolated from 293HEK membranes. The hGLP-1-R cDNA is subcloned into the expression plasmid pH_D (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. *Bio/Technology* 5: 1189-1192, 1987). This plasmid DNA is transfected into 293HEK cells and selected with
20 200µg/mL Hygromycin.

Crude plasma membranes are prepared using cells from suspension culture. The cells are lysed on ice in hypotonic buffer containing 25 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, DNaseI, 20 µ/mL, and Roche Complete™ Inhibitors without EDTA. The cell suspension is homogenized with a glass dounce homogenizer using a Teflon® pestle for
25 25 strokes. The homogenate is centrifuged at 4 °C at 1800 x g for 15 minutes. The supernatant is collected and the pellet is resuspended in hypotonic buffer and

rehomogenized. The mixture is centrifuged at 1800 x g for 15 minutes. The second supernatant is combined with the first supernatant. The combined supernatants are recentrifuged at 1800 x g for 15 minutes to clarify. The clarified supernatant is transferred to high speed tubes and centrifuged at 25000 x g for 30 minutes at 4 °C. The
5 membrane pellet is resuspended in homogenization buffer and stored as frozen aliquots at -80 °C freezer until use.

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is radioiodinated by the I-125-lactoperoxidase procedure and purified by reversed phase HPLC at Perkin-Elmer/NEN (NEX308). The specific activity is 2200 Ci/mmol. K_D determination is performed by homologous
10 competition instead of saturation binding due to high propanol content in the I-125 GLP-1 material. The K_D is estimated to be 0.96 nM and is used to calculate K_i values for all compounds tested.

The receptor binding assay is carried out using a Scintillation Proximity Assay (SPA) with wheat germ agglutinin (WGA) beads previously blocked with 1% fatty acid
15 free BSA (Gibco). The binding buffer contains 25 mM HEPES, pH 7.4, 2.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0.1% fatty acid free BSA, 0.003% Tween20, and Roche Complete™ Inhibitors without EDTA. Glucagon-like peptide 1 is dissolved in PBS at 1 mg/mL and immediately frozen at -80 °C in 30 µL aliquots. The glucagon-like peptide 1 aliquot is diluted and used in binding assays within an hour. The peptide analog is dissolved in
20 PBS and serially diluted in binding buffer. Next, 10 µL diluted compounds or PBS is transferred into Corning® 3632 clear bottom assay plates containing 40 µL assay binding buffer or cold glucagon (NSB at 1 µM final). Then, 90 µL membranes (1 µg/well), 50 µL I-125 Glucagon-like peptide 1 (0.15 nM final in reaction), and 50 µL of WGA beads (150 µg/well) are added, sealed, and mixed end over end. Plates are read with a PerkinElmer
25 Life and Analytical Sciences Trilux MicroBeta® scintillation counter after 12 hours of settling time at room temperature.

Results are calculated as a percent of specific I-125-Glucagon-like peptide 1 binding in the presence of compound. The Absolute IC_{50} concentration of compound is derived by non-linear regression of percent specific binding of I-125-Glucagon-like
30 peptide 1 vs. the concentration of compound added. The IC_{50} concentration is converted to K_i using the Cheng-Prusoff equation .

Table 2

Example	K _i
1	0.096 nM
2	0.059 nM
3	9.00 nM
4	5.27 nM
5	6.20 nM

These data demonstrate that the peptides in Table 2 bind to GLP-1-R and may thus activate that receptor in turn triggering GLP-1-dependent physiological responses.

Glucagon Receptor (hGlucR) Binding Assay

5 The Glucagon receptor binding assay utilizes cloned human glucagon receptor (Lok, S, *et. al.*, *Gene* 140 (2), 203-209 (1994)) isolated from 293HEK membranes. The hGlucR cDNA is subcloned into the expression plasmid pHD (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W., *et. al.*, *Bio/Technology* 5: 1189-1192 (1987)). This plasmid DNA is
10 transfected into 293HEK cells and selected with 200 µg/mL Hygromycin.

Crude plasma membranes are prepared using cells from suspension culture. The cells are lysed on ice in hypotonic buffer containing 25 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, DNaseI, 20 µ/mL, and Roche Complete™ Inhibitors without EDTA. The cell suspension is homogenized with a glass dounce homogenizer using a Teflon® pestle for
15 25 strokes. The homogenate is centrifuged at 4 °C at 1800 x g for 15 minutes. The supernatant is collected and the pellet is resuspended in hypotonic buffer and rehomogenized. The mixture is centrifuged at 1800 x g for 15 minutes. The second supernatant is combined with the first supernatant. The combined supernatants are recentrifuged at 1800 x g for 15 minutes to clarify. The clarified supernatant is
20 transferred to high speed tubes and centrifuged at 25000 x g for 30 minutes at 4 °C. The membrane pellet is resuspended in homogenization buffer and stored as frozen aliquots at -80 °C freezer until use.

Glucagon is radioiodinated by I-125-lactoperoxidase procedure and purified by reversed phase HPLC at Perkin-Elmer/NEN (NEX207). The specific activity is 2200
25 Ci/mmol. K_D determination is performed by homologous competition instead of

saturation binding due to high propanol content in the I-125 glucagon material. The K_D is estimated to be 2.62 nM and is used to calculate K_i values for all compounds tested.

The receptor binding assay is carried out using a Scintillation Proximity Assay (SPA) with wheat germ agglutinin (WGA) beads previously blocked with 1% fatty acid free bovine serum albumin (BSA) (Gibco, 7.5% BSA). The binding buffer contains 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.4, 2.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0.1% fatty acid free BSA, 0.003% Tween20, and Roche Complete™ Inhibitors without EDTA. Glucagon is dissolved in 0.01 N HCl at 1 mg/mL and immediately frozen at $-80^\circ C$ in 30 μL aliquots. The Glucagon aliquot is diluted and used in the binding assay within an hour. The peptide analog is dissolved in phosphate buffered saline (PBS) and serially diluted in binding buffer. Next, 10 μL diluted compounds or PBS is transferred into Corning® 3632 clear bottom assay plates containing 40 μL assay binding buffer or cold glucagon (non-specific binding (NSB) at 1 μM final). Then, 90 μL membranes (3 μg /well), 50 μL I-125 Glucagon (0.15 nM final in reaction), and 50 μL of WGA beads (150 μg /well) are added, sealed, and mixed end over end. Plates are read with a PerkinElmer Life and Analytical Sciences Trilux MicroBeta® scintillation counter after 12 hours of settling time at room temperature.

Results are calculated as a percent of specific I-125-glucagon binding in the presence of compound. The absolute IC_{50} concentration of compound is derived by non-linear regression of percent specific binding of I-125-glucagon vs. the concentration of compound added. The IC_{50} dose is converted to K_i using the Cheng-Prusoff equation.

Table 3

Example	K_i
1	> 23,600 nM
2	> 23,600 nM
3	>7,890 nM
4	>7,490 nM
5	>7,490 nM

These data demonstrate that the peptides of Table 3 are less selective for Gluc-R and thus do not initiate Gluc-R-mediated physiological responses.

Functional activation of hGIP-R cells to generate intracellular cAMP

The cAMP functional assay uses the same cloned GIP-R cell line isolated for the hGIP-R binding assay described above. Cells are stimulated with the peptides and the cAMP generated within the cell is quantified using the CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF®
 5 Assay kit, (62AM4PEB). Briefly, cAMP induced within the cell is detected by binding to the cAMP-d2 capture antibody in the presence of cell lysis buffer. A second detection antibody, anti-cAMP Cryptate, is added to create a sandwich that is then detected using a Perkin-Elmer Life Sciences Envision® instrument.

The hGIP-R-CHO-S cells are harvested from sub-confluent tissue culture dishes
 10 with Enzyme-Free Cell Dissociation Solution, (Specialty Media 5-004-B). The cells are pelleted at low speed and washed 3 times with cAMP Assay Buffer [25 mM Hepes in HBSS-with Mg and Ca (GIBCO, 14025-092) with 0.1% Fatty Acid Free BSA (Gibco, 7.5% BSA), 500 μ M IBMX] then diluted to a final concentration of 312,000 cells per mL. hGIP and peptides are prepared as a 5X stock solutions and serially diluted into the
 15 cAMP Assay Buffer as well as a cAMP standard curve that is prepared from frozen stocks of 2,848 nM cAMP in PBS stored at -20 °C. To start the assay, 40 μ L of cell suspension are transferred to Black, non-tissue culture treated, half-well plates (CoStar 3694) followed by the addition of 10 μ L of the 5X peptide dilutions. The cells are left at room temperature for 1 h. The reaction is stopped by addition of 25 μ L of the cAMP-d2-
 20 capture antibody (CisBio) diluted into the CisBio lysis buffer then gently mixed in titer-tek shaker. After 15 minutes of lysis, 25 μ L of the detection antibody, anti-cAMP Cryptate (CisBio), is added, gently mixed. The lysed cell and antibody mixtures are read after 1 h at room temperature using the Perkin-Elmer Envision®. Envision® units are converted to nM cAMP/well using the cAMP standard curve. The nmoles cAMP
 25 generated in each well is converted to a percent of the maximal response observed with the hGIP control. A relative EC₅₀ value is derived by non-linear regression analysis using the percent maximal response vs. the concentration of peptide added.

Table 4

Example	EC ₅₀
1	0.005 nM
2	0.023 nM

-18-

3	0.244 nM
4	0.277 nM
5	0.207 nM

These data demonstrate that the peptides of Table 4 bind and activate GIP-R and can thereby initiate GIP-R-mediated physiological responses

Functional activation of hGLP-1-R cells to generate intracellular cAMP

- 5 The cAMP functional assay uses a clonal line of hGLP-1-R expressing cells isolated from the transfection of the hGLR-1-R cloned into pcDNA3.1/Neo (Promega) ((Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 1993 Oct 15;196(1):141-6)) and transfected into 293HEK cells. The hGLP-1-R cells are stimulated with the peptides and the cAMP generated within the cell is
- 10 quantified using the CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF® Assay kit, (62AM4PEB). Briefly, cAMP induced within the cell is detected by binding to the cAMP-d2 capture antibody (CisBio) in the presence of cell lysis buffer. A second detection antibody, anti-cAMP Cryptate (CisBio), is added to create a sandwich that is then detected using a Perkin-Elmer Envision® instrument.
- 15 The hGLP-1-R-293HEK cells are harvested from sub-confluent tissue culture dishes with Enzyme-Free Cell Dissociation Solution, (Specialty Media 5-004-B). The cells are pelleted at low speed and washed 3 times with cAMP DMEM Assay Buffer [10 mM Hepes in DMEM (Gibco-31053) with 0.5% FBS and 2 mM glutamine, and 500 μ M IBMX] then diluted to a final concentration of 50,000 cells per mL. hGLP-1 and peptides
- 20 are prepared as 5X stock solutions and serially diluted into the cAMP DMEM Assay Buffer as well as a cAMP standard curve that is prepared from frozen stocks of 2,848 nM cAMP in PBS stored at -20 °C. To start the assay, 40 μ L of cell suspension are transferred to Black, non-tissue culture treated, half-well plates (CoStar 3694) followed by the addition of 10 μ L of the 5X peptide dilutions. The cells are left at room
- 25 temperature for 1 h. The reaction is stopped by addition of 25 μ L of the cAMP-d2-capture antibody (CisBio) diluted into the CisBio lysis buffer then gently mixed in titer-tek shaker. After 15 minutes of lysis, 25 μ L of the detection antibody, anti-cAMP Cryptate (CisBio), is added, gently mixed. The lysed cell and antibody mixtures are read after 1 hour at room temperature using the Perkin-Elmer Envision®. Envision® units are

converted to nM cAMP/well using the cAMP standard curve. The nmoles cAMP generated in each well is converted to a percent of the maximal response observed with the hGLP-1 control. A relative EC₅₀ value is derived by non-linear regression analysis using the percent maximal response vs. the concentration of peptide added.

5

Table 5

Example	EC ₅₀
1	0.036 nM
2	0.045 nM
3	1.11 nM
4	0.844 nM
5	0.959 nM

These data demonstrate that the peptides of Table 5 bind and activate GLP-1-R and can thereby initiate GLP-1-R-mediated physiological responses

In vivo

Effects on food intake, body weight and body composition in diet-induced obese

10 (DIO) mice

Three to four months old male diet-induced obese (DIO) mice are used. Animals are individually housed in a temperature-controlled (24 °C) facility with a 12 hour light/dark cycle (lights on 22:00), and have free access to food and water. After 2 weeks acclimation to the facility, mice are randomized to treatment groups (n=8-10/group) so that each group has similar mean body weight and fat mass. Before the experiment, mice are subcutaneously (sc) injected with vehicle solution and weighed for 7 days to acclimate them to the procedures.

Vehicle or peptide analog (dose range 10-100 nmol/Kg) dissolved in vehicle is administered by sc injection to ad libitum fed DIO mice 30-90 minutes prior to the onset of the dark cycle every 3 days for 2 to 4 weeks. Body weight and the weight of food plus the hopper are measured at the same time. Food consumed in the last 24 hours is calculated by subtracting current weight of food plus the hopper from that of the previous day. Absolute changes in body weight are calculated by subtracting the body weight of the animal prior to the first injection. On days -1 and 14, total fat mass is measured by nuclear magnetic resonance (NMR) using an Echo Medical System (Houston, TX) instrument. Fat free mass is calculated by subtracting fat mass from total body weight.

Table 6a Weight change in DIO mice over a 14-day treatment period (Examples 3 and 4)

Example (Dose)	Overall weight loss (g weight change for 14 days)	Total food intake (g total for 14 days)	Fat mass loss (g fat weight change for 14 days)
Vehicle	+0.7±0.4	36.9±1.0	0.2±0.3
4 (10 nmol/Kg)	-4.5±0.3**	28.4±1.8**	-3.6±1.1**
4 (30 nmol/Kg)	-6.0±0.4**	25.5±2.6**	-4.7±0.4**
3 (30 nmol/Kg)	-5.5±0.4**	26.5±1.5**	-4.3±0.3**
3 (100 nmol/Kg)	-7.0±0.3**	23.4±0.7**	-5.6±0.2**

Table 6b Weight change in DIO mice over a 14-day treatment period (Examples 4 and 5)

Example (Dose)	Overall weight loss (g weight change for 14 days)	Total food intake (g total for 14 days)	Fat mass loss (g fat weight change for 14 days)
Vehicle	+0.8±0.4	38.4±0.5	0.1±0.2
4 (10 nmol/Kg)	-4.9±0.4*	26.9±1.5*	-3.6±0.3**
5 (10 nmol/Kg)	-3.2±0.3*	31.0±1.0*	-2.4±0.3**
5 (30 nmol/Kg)	-5.0±0.4*	26.7±0.7*	-3.6±0.4**

- 5 The data of Tables 6a and 6b show Examples 3, 4, and 5 decreased cumulative food intake and body weight in 14-day DIO mouse studies when compared to vehicle-treated mice. Reduced body weight was primarily due to reduction in fat mass. *p<0.01, **p<0.001 versus vehicle (Dunnett's test)
- 10 **Effects on blood glucose excursion during an oral glucose tolerance test after 2-week treatment in DIO mice**
- Fifty-six hours after the last injection of compound in the DIO study above the animals were subjected to an oral glucose tolerance test. In short, mice were fasted for 16 hours prior to the start of the glucose tolerance test. At time 0, animals are given 2g/kg
- 15 dextrose by oral gavage. Blood is collected by tail bleeding taken 0, 15, 30, 60 and 120 minutes after glucose challenge. Glucose concentration is measured by glucometer.

Table 7a. Effects of Examples 3 and 4 on the glucose excursion following an oral glucose load. Data given as area under the glucose curve (mean $\pm$ SEM)

Example (Dose)	Glucose AUC (mg*min/dL)		
	MEAN	SEM	Dunnett's
Vehicle	18232	624	
4 (10 nmol/Kg)	11725	448	<0.01
4 (30 nmol/Kg)	10907	252	<0.01
3 (30 nmol/Kg)	10293	179	<0.01
3 (100 nmol/Kg)	10892	396	<0.01

Table 7b. Effects of Examples 4 and 5 on the glucose excursion following an oral glucose load. Data given as area under the glucose curve (mean $\pm$ SEM)

Example (Dose)	Glucose AUC (mg*min/dL)		
	MEAN	SEM	Dunnett's
Vehicle	24412	1511	
4 (10 nmol/Kg)	13719	385	<0.01
5 (10 nmol/Kg)	14332	413	<0.01
5 (30 nmol/Kg)	12474	369	<0.01

These data in Tables 7a and 7b show that Examples 3, 4, and 5 significantly reduced the glucose excursion following an oral glucose load. Statistical significance evaluated by Dunnett's test.

Effects on food intake, body weight and body composition in diet-induced obese

10 (DIO) Long Evans rats

Four to five months old male diet-induced obese Long Evans rats are used. Animals are individually housed in a temperature-controlled (24 °C) facility with a 12 hour light/dark cycle (lights on 22:00), and have free access to food (diet TD95217) and water. Animals are acclimated to the facility for at least 2 weeks. On day 0, body composition is determined by QNMR and rats are randomized to respective groups
 15 (n=6/group) based on body weight, % fat, and % lean mass. Compound is administered

by subcutaneous injection on days 1, 4, 8, 11, and 15. On Day 14 body composition is again determined by QNMR and at Day 16 the animals are weighed and tail bled for samples to determine plasma glucose, lipids, insulin, glucagon, and PYY. After CO₂ euthanasia, blood samples are taken by cardiac stick for analysis of exposure

5 determination.

Administration of Examples 3 and 4 over 16 days produced changes in the body weight and body composition of DIO rats compared to vehicle-treated DIO rats by increasing the percentage of lean mass and decreasing the percentage of fat mass. For example, after administration of a 10 nmol/Kg dose of Example 3 over 16 days, lean mass
10 is increased 0.6% and fat mass is reduced 1.3%. Similarly, after administration of a 30 nmol/Kg dose of Example 3 over 16 days, lean mass is increased 1.3% and fat mass is reduced 2.3%. Furthermore, after administration of a 30 nmol/Kg dose of Example 4 over 16 days, lean mass is increased 0.4% and fat mass is reduced 1.8%. Similarly, after administration of a 100 nmol/Kg dose of Example 4 over 16 days, lean mass is increased
15 1.8% and fat mass is reduced 3.2%.

Administration of Examples 3 and 4 lowered the amounts of plasma lipids, including triglycerides and total cholesterol, and increased the amount of free fatty acids in DIO rats compared to vehicle-treated mice. For example, after administration of a 10 nmol/Kg dose of Example 3, triglycerides and total cholesterol were reduced from 507.3
20 mg/dL and 104 mg/dL (vehicle) to 262.1 mg/dL and 91 mg/dL, respectively and free fatty acids were increased from 0.69 mEq/L to 0.94 mEq/L. Similarly, after administration of a 30 nmol/Kg dose of Example 3, triglycerides and total cholesterol were reduced from 507.3 mg/dL and 104 mg/dL (vehicle) to 233.5 mg/dL and 94 mg/dL, respectively and free fatty acids were increased from 0.69 mEq/L to 1.01 mEq/L. Furthermore, after
25 administration of a 10 nmol/Kg dose of Example 4, triglycerides and total cholesterol were reduced from 808.1 mg/dL and 127 mg/dL (vehicle) to 488.7 mg/dL and 110 mg/dL, respectively. Similarly, after administration of a 30 nmol/Kg dose of Example 4, triglycerides and total cholesterol were reduced from 808.1 mg/dL and 127 mg/dL (vehicle) to 212.2 mg/dL and 104 mg/dL, respectively and free fatty acids were increased
30 from 0.67 mEq/L to 0.82 mEq/L.

Effects on blood glucose excursion during an intravenous glucose tolerance test in normal rats

Normal male Wistar rats (225-250 g) are used in the study. Animals are randomized into groups based on fed body weight and blood glucose. Animals are
5 injected with vehicle or peptide analog (dose 3-400 μg peptide content/kg) 16 hours prior to the start of the test. Food is removed at the time of injection. Prior to the assay the animals are put under anesthesia, Phenobarbital 65 mg/kg i.p., and two catheters are inserted, one in the jugular vein and the other in the carotid artery. At time 0, animals are given 0.5g glucose/kg through the venous catheter. Blood is collected from the carotid
10 artery at time 0 (pre glucose), 2, 4, 6, 10, 20 and 30 minutes after glucose challenge. Glucose concentration is measured by glucometer. Insulin is measured by Mesoscale®. Efficacy is measured as the increase in total area under the insulin curve (=integrated plasma insulin values from t+0 to 30 min) as well as the area under the glucose curve which is a measure of the glucose excursion following the intravenous glucose challenge.

15 Administration of Examples 3 and 4 increased insulin AUC and decreased glucose AUC compared to vehicle-treated rats. For example, after administration of a 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ dose of Example 3, insulin AUC was increased from 55 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ (vehicle) to 137 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ and glucose AUC was decreased from 7830 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$ (vehicle) to 6780 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$. Similarly, after administration of a 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ dose of Example 3, insulin
20 AUC was increased from 55 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ (vehicle) to 183 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ and glucose AUC was decreased from 7830 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$ (vehicle) to 7020 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$. Furthermore, after administration of a 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ dose of Example 4, insulin AUC was increased from 44 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ (vehicle) to 150 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ and glucose AUC was decreased from 8010 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$ (vehicle) to 7730 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$. Similarly, after administration of a 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$
25 dose of Example 4, insulin AUC was increased from 44 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ (vehicle) to 161 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ and glucose AUC was decreased from 8010 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$ (vehicle) to 7420 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$.

After administration of a 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ dose of Example 5, insulin AUC is increased from 41 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ (vehicle) to 133 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ and glucose AUC is decreased from
30 7739 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$ (vehicle) to 7202 $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{dL}$. Similarly, after administration of a 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ dose of Example 5, insulin AUC is increased from 41 $\text{ng}\cdot\text{min}/\text{mL}$ (vehicle) to 124

ng*min/mL and glucose AUC is decreased from 7739 mg*min/dL (vehicle) to 7351 mg*min/dL.

Skeletal effects

5 Example 4 was evaluated in 6 months old, ovariectomized (OvX; see *Endocrinology* **144**: 2008-2015), Sprague Dawley rats. Doses of 0, 2.9, 9.7, or 29 nmol/kg were given to the rats as daily subcutaneous injections starting 9 days post surgery. The treatment lasted for 35 days and Example 4 dose responsively reduced the food consumption and body weight up to 8% compared to sham operated OvX rats. The body

10 weight reduction was due to decreased fat mass and no change on lean mass in OvX rats was observed. Example 4 decreased non-fasted serum glucose and triglycerides in OvX rats. The compound dose-dependently prevented OvX induced loss in bone mineral content and bone mineral density in lumbar vertebrae but had no effect in mid femur cortical bone. Example 4 did not adversely affect bone mineral density or bone mineral

15 content in the femur and lumbar vertebra in OvX rats. It should be noted that loss in body weight (8% in this study) can directly affect bone mass. Bone strength is load dependent and losing weight results in a lower load on bones that carry weight and as a consequence less impact is observed on skeletal parameters of bones that carry weight, i.e. the femur cortical bone. Statistical significances were evaluated by a one-way ANOVA followed

20 by a Dunnett's test.

Table 8: Changes in bone mineral density (BMD) of lumbar vertebrae

Example (Dose)	Bone mineral density (mg/cm ³)		
	MEAN	SEM	Significance vs OvX+Veh
Sham operated + Vehicle	589	9.6	<0.05
OvX + vehicle	540	10.2	n/a
OvX + 2.9 nmol/kg Ex 4	557	10.7	n.s.
OvX + 9.7 nmol/kg Ex 4	558	10.9	n.s.
OvX + 29 nmol/kg Ex 4	588	21.6	<0.05

Table 9: Changes in bone mineral content (BMC) of lumbar vertebrae

Example (Dose)	Bone mineral density (mg)		
	MEAN	SEM	Significance vs OvX+Veh
Sham operated + Vehicle	9.61	0.17	n.s.
OvX + vehicle	9.13	0.24	n/a
OvX + 2.9 nmol/kg Ex 4	9.75	0.25	n.s.
OvX + 9.7 nmol/kg Ex 4	9.98	0.18	<0.05
OvX + 29 nmol/kg Ex 4	10.49	0.55	<0.05

The data in Tables 8 and 9 show that Example 4 improves BMC and BMD in OvX rats.

The compounds of the present invention are preferably formulated as pharmaceutical compositions administered by a variety of routes. Most preferably, such compounds are for parenteral administration. Such pharmaceutical compositions and processes for preparing the same are well known in the art. See *e.g.*, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (A. Gennaro, *et. al.*, eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995).

The compounds of the present invention are generally effective over a wide dosage range. For example, dosages per week fall within the range of 1 to 24 mg of peptide conjugate or 0.014 to 0.343 mg/Kg of body weight. In some instances, dosage levels below the lower limit of the aforesaid range may be more than adequate, while in other cases still larger doses may be employed without causing any harmful side effect and therefore the above dosage range is not intended to limit the scope of the invention in any way. It will be understood that the amount of the compound actually administered will be determined by a physician, in light of the relevant circumstances, including the condition to be treated, the chosen route of administration, the actual compound or compounds administered, the age, weight, and response of the individual patient, and the severity of the patient's symptoms.

Other modifications of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope of the invention.

WE CLAIM:

1. A peptide comprising the sequence:

5 Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-
Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Xaa¹-Val-Gln-Trp-Leu-
Ile-Ala-Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-
Ile-Thr-Gln-Xaa²-Xaa³ (SEQ ID NO:1)

10 wherein Xaa¹ at position 22 is Nal or Phe; Xaa² at position 43 is Cys or absent;
Xaa³ at position 44 is Cys or absent; the C-terminal amino acid is optionally
amidated; and provided that where Xaa² at position 43 or Xaa³ at position 44 is
Cys, then either or both are optionally PEGylated.

- 15 2. The peptide of Claim 1 wherein Xaa¹ is Nal.
3. The peptide of Claim 1 wherein Xaa¹ is Phe.
4. The peptide of any of Claims 1 to 3 wherein Xaa² and Xaa³ are both absent.
- 20 5. The peptide of any of Claims 1 to 3 wherein Xaa² and Xaa³ are each Cys.
6. The peptide of any of Claims 1 to 3 or 5 wherein either Cys at position 43 or Cys
at position 44 or both are PEGylated with an 18 to 22 kDa PEG molecule.
- 25 7. The peptide of Claim 6 where in the PEG molecule is 20 to 21 kDa.
8. The peptide of Claim 6 wherein the PEG molecule is 20 kDa.
9. The peptide of any of Claims 1 to 3 or 5 to 8 wherein each PEG is linear.
- 30 10. The peptide of any of Claims 1 to 9 wherein the C-terminal amino acid is
amidated.
11. The peptide of any of Claims 1 to 3 or 5 to 10 comprising the sequence:

-27-

5 Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-
Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-
Ile-Ala-Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-
Ile-Thr-Gln-Cys (PEG20K) -Cys (PEG20K) (SEQ ID NO: 2)

wherein the carboxyl group of the PEGylated Cys at position 44 is amidated.

10 12. The peptide of any of Claims 1 to 3 or 5 to 10 comprising the sequence:

15 Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-
Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-
Ile-Ala-Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-
Ile-Thr-Gln-Cys (PEG20K) -Cys (PEG20K) (SEQ ID NO: 3)

wherein the carboxyl group of the PEGylated Cys at position 44 is amidated.

20 13. A pharmaceutical formulation comprising a peptide of any of Claims 1 to 12 with
a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient.

14. A pharmaceutical formulation of Claim 13 comprising one or more other
therapeutic agents.

25 15. A method for treating diabetes mellitus in a patient by administering to the patient
an effective amount of a peptide of any of Claims 1 to 12.

16. A method for inducing weight loss in a patient by administering to the patient an
effective amount of a peptide of any of Claims 1 to 12.

30 17. The peptide of any of Claims 1 to 12 for use in therapy.

18. The peptide of any of Claims 1 to 12 for use in treating diabetes mellitus.

19. The peptide of any of Claims 1 to 12 for use in treating weight loss.

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/029501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/16 C07K14/47 C07K14/62 A61K38/30 A61K38/26
C07K14/605

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/016940 A2 (IPSEN PHARMA SAS [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) cited in the application the whole document -----	1-19
X	WO 2010/016944 A2 (IPSEN PHARMA SAS [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) cited in the application the whole document -----	1-19
X	WO 2010/011439 A2 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; TAO MA [US] 28 January 2010 (2010-01-28) cited in the application the whole document -----	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 June 2011

Date of mailing of the international search report

17/06/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheffzyk, Irmgard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/029501

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 11(completely); 1-10, 13-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having SEQ.ID.NO. 2.

2. claims: 12(completely); 1-11, 13-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having SEQ.ID.NO. 3

3. claims: 1-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having SEQ.ID.NO. 4

4. claims: 1-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having SEQ.ID.NO. 5

5. claims: 1-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having at position 22 Phe and at position 43 Cys, the position 44 being deleted

6. claims: 1-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having at position 22 Nal at position 43 Cys and position 44 being deleted.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/029501

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 2010016940 A2	11-02-2010	AU 2009280017 A1	11-02-2010
		CA 2732949 A1	11-02-2010
		KR 20110043686 A	27-04-2011

W0 2010016944 A2	11-02-2010	AU 2009280021 A1	11-02-2010
		CA 2733006 A1	11-02-2010
		EP 2318433 A2	11-05-2011
		KR 20110043689 A	27-04-2011

W0 2010011439 A2	28-01-2010	AR 072159 A1	11-08-2010
		AU 2009274425 A1	28-01-2010
		CA 2729296 A1	28-01-2010
		EP 2300035 A2	30-03-2011
		KR 20110040760 A	20-04-2011
		PE 00562010 A1	26-01-2010

X18982SeqListingGlobalFilingPCT04Feb2010ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company
<120> Novel Peptides and Methods for Their Preparation and Use
<130> X18982
<150> US 61/317850
<151> 2010-03-26
<160> 7
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 44
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa at position 22 is 1-naphthylalanine or Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa at position 29 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> Gln at position 42 may be amidated when Xaa at positions 43 and 44 are absent

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Xaa at position 43 is Cys or absent

<220>
<221> MOD_RES
<222> (43)..(43)
<223> Xaa at position 43 may be amidated when Xaa at position 44 is absent

<220>
<221> MOD_RES

<222> (43)..(43)

<223> Xaa at position 43 may be PEGylated when it is Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> Xaa at position 44 is Cys or absent

<220>

<221> MOD_RES

<222> (44)..(44)

<223> Xaa at position 44 may be amidated

<220>

<221> MOD_RES

<222> (44)..(44)

<223> Xaa at position 44 may be PEGylated when it is Cys

<400> 1

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

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

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Xaa Xaa
35 40

<210> 2

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is alpha-amino isobutyric acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is alpha-amino isobutyric acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa at position 29 is alpha-amino isobutyric acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43)..(43)

<223> Cys at position 43 is PEGylated with a PEG having an average molecular weight of about 20 kDa

<220>

X18982SeqListingGlobalFilingPCT04Feb2010ST25

<221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Cys at position 44 is PEGylated with a PEG having an average molecular weight of about 20 kDa

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Cys at position 44 is amidated

<400> 2

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

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

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Cys Cys
 35 40

<210> 3
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa at position 13 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa at position 22 is 1-naphthylalanine

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa at position 29 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Cys at position 43 is PEGylated with a PEG having an average molecular weight of about 20 kDa

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Cys at position 44 is PEGylated with a PEG having an average

X18982SeqListingGlobalFilingPCT04Feb2010ST25
molecular weight of about 20 kDa

<220>
<221> MOD_RES
<222> (44)..(44)
<223> Cys at position 44 is amidated

<400> 3

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

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

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Cys Cys
35 40

<210> 4
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa at position 22 is 1-naphthylalanine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa at position 29 is alpha-amino isobutyric acid

<400> 4

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

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

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln
35 40

X18982SeqListingGlobalFilingPCT04Feb2010ST25

<210> 5
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa at position 13 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa at position 29 is alpha-amino isobutyric acid

<400> 5

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

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

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln
 35 40

<210> 6
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa at position 13 is alpha-amino isobutyric acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa at position 22 is 1-naphthylalanine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa at position 29 is alpha-amino isobutyric acid

<400> 6

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

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

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Cys Cys
35 40

<210> 7

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is alpha-amino isobutyric acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is alpha-amino isobutyric acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa at position 29 is alpha-amino isobutyric acid

<400> 7

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

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

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Cys Cys
35 40

NUEVOS PÉPTIDOS Y MÉTODOS PARA SU PREPARACIÓN Y USO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está en el campo de
5 tratamiento de diabetes y se refiere a péptidos que presentan
actividad para tanto el receptor del péptido insulínotropico
dependiente de la glucosa (GIP-R) como el receptor del
péptido-1 similar al glucagón (GLP-1-R) y son selectivos
sobre el receptor del glucagón (Gluc-R). Se proporcionan
10 específicamente análogos de GIP con sustituciones de
aminoácido introducidas para modular la actividad para tanto
GIP-R como GLP-1-R y mantener la selectividad sobre Gluc-R.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El GIP, conocido tanto como péptido inhibidor
gástrico o péptido insulínotropico dependiente de la glucosa,
es un péptido regulador gastrointestinal de 42 aminoácidos
que ha sido mostrado por estimular la secreción de insulina
de células beta pancreáticas en la presencia de glucosa, de
20 este modo jugando un papel fisiológico en la homeostasis de
la glucosa. El GLP-1 es un péptido de 37 aminoácidos que
protege las células beta pancreáticas e inhibe la secreción
del glucagón, vacío gástrico y absorción de alimento lo cual
conduce a pérdida de peso. El GIP y GLP-1 son conocidos como
25 incretinas. La señalización del receptor de incretina ejerce

acción fisiológicamente relevante crítica para homeostasis de glucosa. El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que se produce por el páncreas. Esta hormona señala el hígado para liberar la glucosa la cual resulta en un incremento en la glucosa en sangre. De este modo, la estimulación de Gluc-R es indeseable en un entorno diabético.

A diferencia de lo que se observa en sujetos sanos, el GIP solo tiene un efecto de reducción de glucosa muy modesto en humanos diabéticos tipo 2. Sin embargo, después que se logra alguna reducción de glucosa, la eficacia del GIP se incrementa y llega a acercarse de aquella observada en un sujeto normoglicémico. Por otro lado, el GLP-1 es efectivo en la reducción de glucosa en tanto sujetos sanos como diabéticos, pero causa náuseas y de este modo, nunca puede realizarse la completa eficacia del GLP-1. Además, tanto GIP como GLP-1 son inactivados rápidamente por la proteasa ubicua, dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), la cual produce péptidos que son incapaces de estimular la secreción de insulina y por lo tanto, pueden solamente ser usados para control metabólico a corto plazo.

Ciertos análogos de GIP han sido descritos en el documento WO 2010/016940 y WO 2010/016944. Ciertos análogos de glucagón han sido descritos por inhibir tanto la actividad de GIP como GLP-1 en el documento WO 2010/011439.

El tratamiento actual para diabetes incluye

secretagogos de insulina, tales como sulfonilureas y
glitinidas, los cuales a menudo presentan una reducción
progresiva en eficacia y pueden causar hipoglicemia en
pacientes con diabetes Tipo 2. Como tal, existe una necesidad
5 para identificar nuevos agentes los cuales potencian la
secreción de insulina en una manera sostenida dependiente de
la glucosa. También es deseable identificar nuevos agentes
que poseen los efectos de reducción de glucosa de GLP-1 sin
las náuseas y además identificar nuevos agentes que están
10 teniendo estabilidad metabólica incrementada.

15

20

25

La presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia:

10

25

40

20 en donde Xaa¹ en la posición 22 es Nal o Phe; Xaa²
en la posición 43 es Cys o está ausente;

Xaa³ en la posición 44 es Cys o está ausente; el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado; y siempre que donde Xaa² en la posición 43 o Xaa³ en la posición 44 es Cys, entonces cualquiera o ambos son opcionalmente PEGilados.

Una modalidad de la presente invención se refiere a péptidos donde Xaa¹ es Phe. Una modalidad preferida de la presente invención se refiere a péptidos donde Xaa¹ es Nal.

Una modalidad de la presente invención se refiere a
5 péptidos donde Xaa² y Xaa³ están ausentes. Una modalidad preferida de la presente invención se refiere a péptidos donde Xaa² y Xaa³ son cada uno Cys. En la modalidad, se prefiere que el grupo carboxilo del Cys en la posición 44 sea amidado.

10 Una modalidad preferida adicional de la presente invención se refiere a péptidos donde el péptido es PEGilado en ya sea Cys en las posiciones 43 y 44 con una molécula PEG de 20 kDa. En la modalidad, se prefiere que el grupo carboxilo del C-terminal Cys sea amidado. Otra modalidad
15 preferida de la presente invención se refiere a péptidos donde el péptido es PEGilado en ambos Cys en las posiciones 43 y 44 con una molécula PEG de 20 kDa. En la modalidad, se prefiere que el grupo carboxilo del C-terminal Cys sea amidado.

20 Una modalidad de la presente invención se refiere a péptidos en donde Xaa¹ es Phe; y Xaa² y Xaa³ están ausentes. En la modalidad, se prefiere que el grupo carboxilo del C-terminal Gln en la posición 42 sea amidado. Una modalidad preferida de la presente invención se refiere a péptidos en
25 donde Xaa¹ es Nal; y Xaa² y Xaa³ están ausentes. En la

modalidad, se prefiere que el grupo carboxilo del C-terminal Gln en la posición 42 sea amidado.

Una modalidad más preferida de la presente invención se refiere a péptidos en donde Xaa¹ es Phe; Xaa² y
 5 Xaa³ son ambos Cys y ambos son opcionalmente PEGilados y el grupo carboxilo de Cys en la posición 44 es opcionalmente amidado. Una modalidad especialmente preferida de la presente invención se refiere a péptidos en donde Xaa¹ es Nal; Xaa² y Xaa³ son Cys y cualquiera o ambos Cys son opcionalmente
 10 PEGilados y el grupo carboxilo del Cys en la posición 44 es opcionalmente amidado.

Una modalidad especialmente preferida de la presente invención es

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-
 15 Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys(PEG20K)-Cys(PEG20K) (SEC ID NO: 2)

y el Cys en la posición 44 es amidado. Este péptido es referido como Aib², Aib¹³, Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴
 20 (PEG20K)-GIP.

Una modalidad muy preferida de la presente invención es

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

Cys(PEG20K)-Cys(PEG20K) (SEC ID NO: 3)

y el Cys en la posición 44 es amidado. Este péptido es referido como Aib², Aib¹³, Nal²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP.

5 La presente invención también proporciona un método para tratar diabetes mellitus en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un péptido de la invención. La presente invención además proporciona un método para tratar diabetes
10 mellitus no dependiente de la insulina en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un péptido de la invención. La presente invención además proporciona un método para tratar diabetes mellitus dependiente de la insulina en
15 un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un péptido de la invención.

Sin embargo, la presente invención también proporciona un método para tratar una condición seleccionada
20 del grupo que consiste de obesidad, síndrome metabólico, enfermedad de la arteria coronaria, y aterosclerosis administrando a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad efectiva de un péptido de la invención. Además, la presente invención proporciona un método para inducir
25 pérdida de peso administrando a un paciente en necesidad de

tal tratamiento una cantidad efectiva de un péptido de la invención. La presente invención también proporciona un método para tratar fragilidad o incremento de la resistencia ósea administrando a un paciente en necesidad de tal
5 tratamiento una cantidad efectiva de un péptido de la invención.

Además, esta invención proporciona un péptido de la invención para uso en terapia. En una modalidad particular, la invención proporciona un péptido de la invención para uso
10 para el tratamiento de diabetes mellitus. Esta invención proporciona un péptido de la invención para uso para el tratamiento de diabetes mellitus no dependiente de la insulina. Esta invención proporciona un péptido de la invención para uso para el tratamiento de diabetes mellitus
15 dependiente de la insulina. También, esta invención proporciona un péptido de la invención para uso para el tratamiento de obesidad. Adicionalmente, esta invención proporciona un péptido de la invención para uso para el tratamiento de una condición seleccionada del grupo que
20 consiste de obesidad, síndrome metabólico, enfermedad de la arteria coronaria, y aterosclerosis. Esta invención además proporciona un péptido de la invención para uso para inducir pérdida de peso. También esta invención proporciona un péptido de la invención para uso para el tratamiento de
25 fragilidad o incremento de la resistencia ósea.

Esta invención también proporciona el uso de un péptido de la invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus. Esta invención también proporciona el uso de un péptido de la invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de

5 la manufactura de un medicamento para el tratamiento de obesidad. Esta invención además proporciona el uso de un péptido descrito anteriormente para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una condición seleccionada del grupo que consiste de síndrome metabólico, enfermedad de

10 la arteria coronaria, y aterosclerosis. Esta invención además proporciona el uso de un péptido de la invención para la manufactura de un medicamento para la inducción de pérdida de peso. Esta invención también proporciona el uso de un péptido de la invención para la manufactura de un medicamento para el

15 tratamiento de fragilidad o el incremento de resistencia ósea.

Adicionalmente, esta invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un péptido de la invención con un portador, diluyente o excipiente

20 farmacéuticamente aceptable. Además, esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de diabetes mellitus. Esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de diabetes mellitus no dependiente de la insulina. Esta

25 invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada

para el tratamiento de diabetes mellitus dependiente de la insulina. Además, esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de obesidad. Esta invención también proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de una condición seleccionada del grupo que consiste de síndrome metabólico, enfermedad de la arteria coronaria, y aterosclerosis. Esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para la inducción de pérdida de peso. Esta invención además proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de fragilidad o el incremento de resistencia ósea. En una modalidad particular, la formulación además comprende uno o más de otros agentes terapéuticos.

Esta invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido de la invención con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una modalidad particular, la composición además comprende uno o más de otros agentes terapéuticos.

La presente invención adicionalmente proporciona moléculas estables que son menos susceptibles a rápida desactivación metabólica por DPPIV.

La secuencias de la presente invención contienen los códigos de aminoácido de una letra o tres letras estándares para los veinte aminoácidos que se originan

naturalmente. Los otros códigos de aminoácido usados son definidos como sigue: Aib = ácido alfa-amino isobutírico; Nal = 1-naftilalanina.

El término "aminoácido C-terminal" se refiere al
5 último aminoácido en la secuencia de un péptido que contiene un grupo carboxilo libre. El aminoácido C-terminal de la presente invención puede ser Gln en la posición 42, Cys en la posición 43, o Cys en la posición 44.

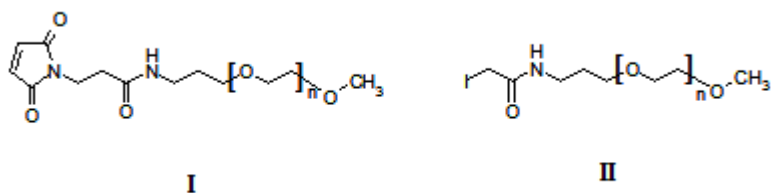
El término "polietilen glicol" o "PEG" se refiere a
10 un compuesto de polialquilen glicol o derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento o derivatización con porciones de acoplamiento o activación. En su forma típica, PEG es un polímero lineal con grupos hidroxilo terminal y tiene la fórmula $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, donde n es desde
15 aproximadamente 8 hasta 4000. mPEG es monometoxi-polietilen glicol. Debido a que los PEG son típicamente generados y usados como mezclas de compuestos PEG que varían en algún grado en su peso molecular, uno de habilidad ordinaria en la técnica en general describe el peso molecular de un PEG unido
20 a un compuesto describiendo el peso molecular medio del reactivo PEG usado en la reacción de PEGilación que genera el compuesto PEGilado particular. Numerosos derivados de PEG existen en la técnica. Las moléculas PEG unidas covalentemente a los péptidos de la presente invención pueden
25 ser 10,000 Daltons, 20,000 Daltons, 30,000 Daltons ó 40,000

Daltons. La media de las moléculas PEG son preferiblemente 18,000 hasta 22,000 Daltons. Más preferiblemente, la media es 19,000 hasta 21,000 Daltons. Muy preferiblemente la media es 20,000 hasta 21,000 Daltons. Las moléculas PEG pueden ser

5 lineales o ramificadas y pueden estar presentes de manera singular o en serie. Los péptidos PEGilados de la presente invención preferiblemente tienen moléculas PEG lineales en serie unidas al C-término del péptido. En particular, las moléculas PEG están preferiblemente unidas a los dos residuos

10 de cisteína en el extremo C-terminal del péptido por una maleimida mPEG-20kDa (mPEG MAL) (I) o una yodoacetamida mPEG-20kDa (II) donde n es 10 a 2500. Preferiblemente, n es 350 a 600. Más preferiblemente, n es 425 a 475.

15



El término “PEGilación” como se usa en la presente

20 significa la unión covalente de una o más moléculas PEG como se describe anteriormente a los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, un péptido de la presente invención es PEGilado en Cys en las posiciones 43 y 44 con una molécula PEG de 20kDa covalentemente ligada al grupo tiol de cada Cys.

25

Las siguientes abreviaturas se usan en la presente:

"t-Bu" se refiere a *terc*-butilo; "fmoc" se refiere a
 fluorenilmetiloxycarbonilo; "Pbf" se refiere a 2,2,4,6,7-
 pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo; "Trt" se refiere a
 tritilo o trifenilmetilo; "OtBu" se refiere a *terc*-butoxilo;
 5 "Boc" se refiere a *terc*-butoxicarbonilo; "PyBOP" se refiere
 a (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-
 iloxi)tripirrolidinofosfonio; "DIEA" se refiere a
 diisopropiletilamina; "HEK" se refiere a riñón embriónico
 humano; "Tris" se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-propan-
 10 1,3-diol; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino;
 "HEPES" se refiere a ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-
 il]etansulfónico; "PBS" se refiere a salina amortiguada de
 fosfato; "NSB" se refiere a enlace no específico; "HBSS" se
 refiere a solución de sal amortiguada Hank; "IBMX" se refiere
 15 a 1-metil-3-(2-metilpropil)-7H-purina-2,6-diona; y "DMSO" se
 refiere a dimetil sulfóxido.

Síntesis Peptídica

Todos los péptidos de la presente invención son
 20 generados por síntesis peptídica de fase sólida en un
 sintetizador peptídico automatizado Symphony® de Protein
 Technologies Inc. La síntesis se realiza en resina de
 poliestireno de amida Fmoc-Rinc (Rapp Polymere Tubingen,
 Germany) con sustitución de aproximadamente 0.7 mmol/g. La
 25 síntesis se realiza usando síntesis peptídica de fase sólida

Fmoc/t-Bu. Los derivados de cadena lateral de aminoácido
usados son: Arg(Pbf), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt),
Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc) y
Tyr(tBu). El acoplamiento se lleva a cabo con aproximadamente
5 6 equivalentes de aminoácido activado con
diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt)
(relación molar 1:1:1) en dimetilformamida (DMF) por 90
minutos a temperatura ambiente. Se usaron las siguientes
condiciones para el acoplamiento del Fmoc-(1-Nal)-OH en la
10 posición 22: Fmoc-(1-Nal)-OH (3 equiv), PyBOP (3 equiv), y
DIEA (6 equiv) en DMF por 3 h a temperatura ambiente. Se
usaron las siguientes condiciones para el acoplamiento del
Fmoc-Ile-OH en la posición 12: Fmoc-Ile-OH (6 equiv), PyBOP
(6 equiv), y DIEA (12 equiv) en DMF por 10 h a temperatura
15 ambiente.

El desdoblamiento concomitante de la remoción del
grupo protector de cadena lateral y resina se llevó a cabo en
una solución que contiene ácido trifluoroacético (TFA):
triisopropilsilano: 1,2-etanditio: metanol: tioanisol
20 90:4:2:2:2 (v/v) por 2 h a temperatura ambiente. La solución
se filtró y los péptidos se precipitaron con éter dietílico
frío, redisolviéron en 30-40 mL de 10% de acetonitrilo en
agua, y purificaron en una columna de HPLC de fase inversa C₁₈
(típicamente una Waters SymmetryPrep™ 7 µm, 19 x 300 mm) a
25 una velocidad de flujo de 18 mL/min. Las muestras se eluyeron

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-

EJEMPLO 2

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-

25 5 10

Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-

15

20

25

Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln

30

35

40

5 (SEC ID NO: 5)

INTERMEDIARIO 1

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-

5

10

Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-

10

15

20

25

Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys-

30

35

40

Cys

(SEC ID NO: 6)

15

INTERMEDIARIO 2

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-

5

10

Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-

15

20

25

20

Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys-

30

35

40

Cys

(SEC ID NO: 7)

25

PEGilación del péptido con mPEG-MAL-20 kDa

El péptido liofilizado es pesado (típicamente 30-50 mg). Un equivalente molar de 2.1 veces de maleimida mPEG-20kDa ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{-maleimida}$) (NOF SUNBRIGHT ME-200MA) (mPEG MAL) es pesado y combinado con el péptido. Los reactivos se disuelven en una mezcla de agua/acetonitrilo 50/50 (v/v) a una concentración peptídica de aproximadamente 20 mg/mL. La solución peptídica es diluida dos veces con 100 mM de acetato de amonio, 10 mM de EDTA, pH 7. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se monitorea por HPLC de fase inversa analítica (la separación de HPLC analítica se hace en una columna Waters SymmetryShield™ C18, 3.5 μm , 4.6 mm i.d. x 10 cm a 60 °C con un gradiente AB lineal de dos etapas de 0 a 30 % B durante 5 minutos y 30 a 90 % B durante los subsecuentes 30 min en los cuales A = 0.05 % de TFA/H₂O y B = 0.05% de TFA/acetonitrilo y la velocidad de flujo es 1 mL/min.), y típicamente después de 1-2 h de tiempo de reacción, muestra casi completa desaparición del pico del péptido. Aparecen dos picos debido al péptido mono y di-PEGilado con el péptido di-PEGilado típicamente constituyendo 90-95 % del área de pico total.

La muestra es entonces típicamente diluida a aproximadamente 40 mL con agua acidificada (0.05% de TFA/agua) y purificada por columna HPLC de fase inversa C₁₈ (típicamente a Aguas SymmetryPrep™ 7 μm , 19 x 300 mm) a una

velocidad de flujo de 10 mL/min. con un gradiente AB lineal de dos etapas de 0 a 25 % B durante 15 min seguido por 25 a 55 % B durante 100 min. donde A = 0.05% de TFA/agua y B = 0.05% de TFA/acetonitrilo. El producto en general eluye a 35 - 40 % de acetonitrilo. El péptido purificado es cuantificado por absorbancia UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar calculado con base en la secuencia peptídica. El rendimiento después de la purificación está típicamente en el intervalo de 70 % con base en la cantidad del péptido de partida.

EJEMPLO 3

Aib², Aib¹³, Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴ (PEG20K)-GIP

EJEMPLO 4

Aib², Aib¹³, Nal²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴ (PEG20K)-GIP

Los péptidos del Ejemplo 3 y Ejemplo 4 han sido PEGilados usando mPEG-MAL.

PEGilación del péptido con mPEG-Yodoacetamida-20 kDa

El péptido liofilizado es pesado (típicamente 30-50 mg). Un equivalente molar de 2.1 veces de yodoacetamida de mPEG-20kDa ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_2\text{-I}$) (NOF SUNBRIGHT ME-200IA) es pesado y combinado con el péptido. Los reactivos se disuelven en una solución amortiguadora acuosa a pH 8.5 (amortiguador de ácido bórico, cloruro de potasio, hidróxido

de sodio 0.1 M + 10 mM de EDTA) + 20% de acetonitrilo (v/v) a una concentración peptídica de aproximadamente 10 mg/mL. La mezcla resultante es entonces agitada a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se monitorea por HPLC de fase inversa analítica (la separación de HPLC analítica se hace en una columna Aguas SymmetryShield™ C18, 3.5 micras, 4.6 mm i.d. x 10 cm a 60 °C con un gradiente AB lineal de dos etapas de 0 a 30 % B durante 5 minutos y 30 a 90 % B durante los subsecuentes 30 min en los cuales A = 0.05 % de TFA/H₂O y B = 0.05% de TFA/acetonitrilo y la velocidad de flujo es 1 mL/min.), y típicamente después de 18 h de tiempo de reacción, muestra casi completa desaparición del pico del péptido. Aparecen dos picos debido al péptido mono y di-PEGilado con el péptido di-PEGilado típicamente constituyendo 90-95 % del área de pico total.

La muestra es entonces típicamente diluida a aproximadamente 50 mL con agua acidificada (0.05% de TFA/agua) y purificada por columna HPLC de fase inversa C₁₈ (típicamente a Aguas SymmetryPrep™ 7 µm, 19 x 300 mm) a una velocidad de flujo de 10 mL/min. con un gradiente AB lineal de dos etapas de 0 a 25 % B durante 15 min seguido por 25 a 55 % B durante 100 min. donde A = 0.05% de TFA/agua y B = 0.05% de TFA/acetonitrilo. El producto en general eluye a 35 - 40 % acetonitrilo. El péptido purificado es cuantificado por absorbancia UV a 280 nm usando un coeficiente de

extinción molar calculado con base en la secuencia peptídica. El rendimiento después de la purificación está típicamente en el intervalo de 70 % con base en la cantidad del péptido de partida.

5 Alternativamente, el péptido liofilizado es pesado (típicamente 30-50 mg). Un equivalente molar de 2.1 veces de yodoacetamida de mPEG-20kDa ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_2\text{-I}$) (NOF SUNBRIGHT ME-200IA) es pesado y combinado con el péptido. Los reactivos se disuelven en una solución
10 amortiguadora acuosa a pH 8.0 (amortiguador de bicarbonato 0.1 M + 10 mM de EDTA) + 20% de acetonitrilo (v/v) a una concentración peptídica de aproximadamente 8 mg/mL. La mezcla resultante es entonces agitada a temperatura ambiente en la oscuridad. La mezcla de reacción se monitorea por HPLC de
15 fase inversa analítica (la separación de HPLC analítica se hace en una columna Aguas SymmetryShield™ C₁₈, 3.5 micras, 4.6 mm i.d. x 10 cm a 60 °C con un gradiente AB lineal de dos etapas de 0 a 30 % B durante 5 minutos y 30 a 90 % B durante los subsecuentes 30 min en los cuales A = 0.05 % de TFA/H₂O y
20 B = 0.05% de TFA/acetonitrilo y la velocidad de flujo es 1 mL/min.), y típicamente después de 3 h de tiempo de reacción, muestra casi completa desaparición del pico del péptido. Aparecen dos picos debido al péptido mono y di-PEGilado con el péptido di-PEGilado típicamente constituyendo 90-95 % del
25 área de pico total.

La muestra es entonces típicamente diluida a aproximadamente 50 mL con agua acidificada (0.05% de TFA/agua) y purificada como se describe anteriormente. El rendimiento después de la purificación está típicamente en el
 5 intervalo de 70 % con base en la cantidad del péptido de partida.

EJEMPLO 5: SEC ID: 3

Aib², Aib¹³, Nal²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP

El péptido del Ejemplo 5 es PEGilado usando mPEG-
 10 Yodoacetamida.

ENSAYOS

In vitro

Los compuestos ejemplificados en la presente fueron
 15 probados tan esencialmente como se describe abajo y presentan una afinidad de enlace (K_i) a GIP-R y GLP-1-R de menos de 100 nM y una relación de selectividad contra Gluc-R de al menos 100 veces. Además, los compuestos de la presente exhiben una relación de actividad en los ensayos de enlace para GIP-R y
 20 GLP-1-R entre 4:1 a 1:2 (GIP-R:GLP-1-R) (4:1 indica superior potencia a GIP-R; 1:2 indica superior potencia a GLP-1-R).

Ensayo de Enlace al Receptor Peptídico Insulinotrópico Dependiente de la Glucosa (GIP-R)

25 El ensayo de enlace al receptor humano de

polipéptido insulínico dependiente de la glucosa usa hGIP-R (Usdin, T.B., Gruber, C., Modi, W. y Bonner, T.I., GenBank: AAA84418.1) clonado en plásmido pcADN3.1 (Promega)-NeoR. El plásmido hGIP-R-pcADN3.1/Neo es transfectado en
5 células de Ovario de Hámster Chino, CHO-S, para suspensión de cultivos y seleccionado en la presencia de 500 µg/mL de Geneticina (Invitrogen).

Se prepararon membranas plasmáticas crudas usando células del cultivo de suspensión. Las células se sometieron
10 a lisis en hielo en amortiguador hipotónico que contiene 25 mM de Tris HCl, pH 7.5, 1 mM de MgCl₂, DNase1, 20 µ/mL, e Inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. La suspensión celular es homogenizada con un homogenizador Dounce de vidrio usando una mano de mortero Teflon® por 25 golpes. El homogenado es
15 centrifugado a 4 °C a 1800 x g por 15 minutos. El sobrenadante es recolectado y la pelletilla es resuspendida en amortiguador hipotónico y rehomogenizada. La mezcla es centrifugada a 1800 x g por 15 minutos. El segundo sobrenadante es combinado con el primer sobrenadante. Los
20 sobrenadantes combinados son centrifugados a 1800 x g por 15 minutos para clarificar. El sobrenadante clarificado es transferido a tubos de alta velocidad y centrifugado a 25000 x g por 30 minutos a 4°C. La pelletilla de membrana es resuspendida en amortiguador de homogenización y almacenada
25 como alícuotas congeladas a -80 °C en congelador hasta el

uso.

El GIP es radioyodado por el procedimiento de I-125-lactoperoxidasa (Markalonis, J.J., *Biochem. J.* 113:299 (1969)) y purificado por HPLC de fase inversa a Perkin-Elmer/NEN (NEX-402). La actividad específica es 2200 Ci/mmol.

Se realiza determinación K_D por competición homóloga usando hGIP frío en lugar de enlace de saturación. El ensayo de enlace al receptor se lleva a cabo usando un Ensayo de Proximidad de Escintilación (SPA) (Sun, S., Almaden, J., Carlson, T.J., Barker, J. and Gehring, M.R. Assay development y los análisis de datos de enlace de ligando al receptor con base en el ensayo de proximidad de escintilación. *Metab Eng.* 7:38-44 (2005)) con perllillas de aglutinina de germen de trigo (WGA) (GE Health Care) previamente bloqueadas con 1% de BSA libre de ácido graso (Gibco, 7.5% BSA). El amortiguador de enlace contiene 25 mM de HEPES, pH 7.4, 2.5 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 0.1% de BSA libre de ácido graso, 0.003% de Tween20, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. hGIP y los análogos peptídicos son disueltos en PBS y almacenados a -80 °C. Los análogos peptídicos son diluidos serialmente en amortiguador de enlace. Después, 10 μL de péptido diluido son transferidos en placas de ensayo de fondo transparente Corning® 3632 que contienen 40 μL de amortiguador de ensayo de enlace o GIP frío (NSB a 0.1 μM final). Después, 90 μL de membranas (4 μg /cavidad), 50 μL [^{125}I] de GIP (Perkin Elmer

Life and Analytical Sciences a 0.15 nM final en reacción), y 50 μ L de perlas WGA (150 μ g/cavidad) son agregadas, selladas y mezcladas de punta a punta. Las placas son leídas en un contador de escintilación MicroBeta® después de 12 horas de tiempo de sedimentación a temperatura ambiente.

Los resultados son calculados como un porcentaje de enlace específico I-125-GIP en la presencia del compuesto. La concentración IC_{50} absoluta del compuesto se deriva por regresión no lineal del porcentaje de enlace específico de I-125-GIP contra la concentración del compuesto agregado. La concentración IC_{50} es convertida a K_i usando la ecuación Cheng-Prusoff donde el K_D es estimado por ser 0.174 nM (Cheng, Y., Prusoff, W. H., *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108, (1973)).

15

Tabla 1

Ejemplo	K_i
1	0.044 nM
2	0.023 nM
3	9.79 nM
4	8.23 nM
5	9.22 nM

20

Estos datos demuestran que los péptidos de la Tabla 1 se unen a GIP-R y pueden activar tal receptor a su vez

25

activando las respuestas fisiológicas dependientes de GIP.

**Ensayo de Enlace al Receptor del Péptido 1 Similar
al Glucagón (GLP-1-R)**

5 El ensayo de enlace al receptor GLP-1 usa el
receptor del péptido 1 similar al glucagón humano clonado
(hGLP-1-R) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG,
Strader CD, *Biochem Biophys Res Commun.* 196(1): 141-6, 1993)
aislado de membranas 293HEK. El ADNc hGLP-1-R es subclonado
10 en el plásmido de expresión pHd (expresión trans-activada de
la proteína C humana recombinante completamente gama-
carboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B.W., Berg,
D.T., Walls, J. y Yan, S.B. *Bio/Technology* 5: 1189-1192,
1987). Este ADN plásmido es transfectado en células 293HEK y
15 seleccionado con 200 µg/mL de Higromicina.

Las membranas plasmáticas crudas son preparadas
usando células del cultivo de suspensión. Las células son
sometidas a lisis en hielo en amortiguador hipotónico que
contiene 25 mM de Tris HCl, pH 7.5, 1 mM de MgCl₂, DNase1, 20
20 µ/mL, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. La suspensión
celular es homogenizada con un homogenizador Dounce de vidrio
usando un mango de mortero Teflon® por 25 golpes. El
homogenado es centrifugado a 4 °C a 1800 x g por 15 minutos.
El sobrenadante es recolectado y la pelletilla es resuspendida
25 en amortiguador hipotónico y rehomogenizada. La mezcla es

centrifugada a 1800 x g por 15 minutos. El segundo sobrenadante es combinado con el primer sobrenadante. Los sobrenadantes combinados son centrifugados a 1800 x g por 15 minutos para clarificar. El sobrenadante clarificado es transferido a tubos de alta velocidad y centrifugado a 25000 x g por 30 minutos a 4 °C. La pelletilla de membrana es resuspendida en amortiguador de homogenización y almacenada como alícuotas congeladas a -80 °C en congelador hasta el uso.

El péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) es radioyodado por el procedimiento I-125-lactoperoxidasa y purificado por HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer/NEN (NEX308). La actividad específica es 2200 Ci/mmol. Se realiza determinación K_D por competición homóloga en lugar de enlace de saturación debido al alto contenido de propanol en el material I-125 GLP-1. El K_D es estimado por ser 0.96 nM y es usado para calcular valores K_i para todos los compuestos probados.

El ensayo de enlace al receptor se lleva a cabo usando un Ensayo de Proximidad de Escintilación (SPA) con perllillas de aglutinina de germen de trigo (WGA) previamente bloqueadas con 1% de BSA libre de ácido graso (Gibco). El amortiguador de enlace contiene 25 mM de HEPES, pH 7.4, 2.5 mM de $CaCl_2$, 1 mM de $MgCl_2$, 0.1% de BSA libre de ácido graso, 0.003% de Tween20, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. El

péptido 1 similar al glucagón es disuelto en PBS a 1 mg/mL y congelado inmediatamente a -80°C en alícuotas de 30 μL . La alícuota del péptido 1 similar al glucagón es diluida y usada en ensayos de enlace dentro de una hora. El análogo peptídico es disuelto en PBS y serialmente diluido en amortiguador de enlace. Después, 10 μL de compuestos diluidos o PBS es transferido en placas de ensayo de fondo transparente Corning® 3632 que contienen 40 μL de amortiguador de ensayo de enlace o glucagón frío (NSB a 1 μM final). Después, 90 μL de membranas (1 μg /cavidad), 50 μL de péptido 1 I-125 similar al glucagón (0.15 nM final en reacción), y 50 μL de perlillas WGA (150 μg /cavidad) son agregados, sembrados y mezclados de punta a punta. Las placas son leídas con un contador de escintilación PerkinElmer Life y Analytical Sciences Trilux MicroBeta® después de 12 horas de tiempo de sedimentación a temperatura ambiente.

Los resultados son calculados como un porcentaje de enlace del péptido 1 I-125 similar al glucagón específico en la presencia del compuesto. La concentración IC_{50} absoluta del compuesto se deriva por regresión no lineal de porcentaje de enlace específico del péptido 1 I-125 similar al glucagón contra la concentración del compuesto agregado. La concentración IC_{50} es convertida a K_i usando la ecuación Cheng-Prusoff.

Tabla 2

Ejemplo	Ki
1	0.096 nM
2	0.059 nM
3	9.00 nM
4	5.27 nM
5	6.20 nM

Estos datos demuestran que los péptidos en la Tabla 2 se unen a GLP-1-R y pueden de este modo activar tal receptor a su vez activando las respuestas fisiológicas dependientes de GLP-1.

Ensayo de Enlace al Receptor de Glucagón (hGlucR)

El ensayo de enlace al receptor de Glucagón utiliza el receptor de glucagón humano clonado (Lok, S, *et. al.*, *Gene* 140 (2), 203-209 (1994)) aislado de membranas 293HEK. El ADNc hGlucR es subclonado en el plásmido de expresión pHd (expresión trans-activada de proteína C humana recombinante completamente gamma-carboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B.W., *et. al.*, *Bio/Technology* 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN plásmido es transfectado en células 293HEK y seleccionado con 200 µg/mL de Higromicina.

Las membranas plasmáticas crudas son preparadas usando células del cultivo de suspensión. Las células son

sometidas a lisis en hielo en amortiguador hipotónico que contiene 25 mM de Tris HCl, pH 7.5, 1 mM de $MgCl_2$, DNase1, 20 μ /mL, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. La suspensión celular es homogenizada con un homogenizador Dounce de vidrio usando un mango de mortero Teflon® por 25 golpes. El homogenado es centrifugado a 4 °C a 1800 x g por 15 minutos. El sobrenadante es recolectado y la pelletilla es resuspendida en amortiguador hipotónico y rehomogenizada. La mezcla es centrifugada a 1800 x g por 15 minutos. El segundo sobrenadante es combinado con el primer sobrenadante. Los sobrenadantes combinados son centrifugados a 1800 x g por 15 minutos para clarificar. El sobrenadante clarificado es transferido a tubos de alta velocidad y centrifugado a 25000 x g por 30 minutos a 4 °C. La pelletilla de membrana es resuspendida en amortiguador de homogenización y almacenada como alícuotas congeladas a -80 °C en congelador hasta el uso.

El glucagón es radioyodado por procedimiento de I-125-lactoperoxidasa y purificado por HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer/NEN (NEX207). La actividad específica es 2200 Ci/mmol. Se realiza determinación K_D por competición homóloga en lugar de enlace de saturación debido al alto contenido de propanol en el material de glucagón I-125. El K_D es estimado por ser 2.62 nM y es usado para calcular valores K_i para todos los compuestos probados.

El ensayo de enlace al receptor se lleva a cabo usando un Ensayo de Proximidad de Escintilación (SPA) con perllillas de aglutinina de germen de trigo (WGA) previamente bloqueadas con 1% de albúmina de suero bovino libre de ácido graso (BSA) (Gibco, 7.5% BSA). El amortiguador de enlace contiene 25 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), pH 7.4, 2.5 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 0.1% de BSA libre de ácido graso, 0.003% de Tween20, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. El glucagón es disuelto en 0.01 N HCl a 1 mg/mL y congelado inmediatamente a -80°C en alícuotas de 30 μL . La alícuota de glucagón es diluida y usada en el ensayo de enlace dentro de una hora. El análogo peptídico es disuelto en salina amortiguada de fosfato (PBS) y serialmente diluido en amortiguador de enlace. Después, 10 μL de compuestos diluidos o PBS es transferido en placas de ensayo de fondo transparente Corning® 3632 que contienen 40 μL de amortiguador de ensayo de enlace o glucagón frío (enlace no específico (NSB) a 1 μM final). Después, 90 μL de membranas (3 μg /cavidad), 50 μL de Glucagón I-125 (0.15 nM final en reacción), y 50 μL de perllillas WGA (150 μg /cavidad) son agregados, sembrados y mezclados de punta a punta. Las placas son leídas con un contador de escintilación PerkinElmer Life y Analytical Sciences Trilux MicroBeta® después de 12 horas de tiempo de sedimentación a temperatura ambiente.

Los resultados son calculados como un porcentaje de enlace específico de I-125-glucagón en la presencia del compuesto. La concentración IC_{50} absoluta del compuesto se deriva por regresión no lineal de porcentaje de enlace específico de I-125-glucagón contra la concentración del compuesto agregado. La dosis IC_{50} es convertida a K_i usando la ecuación Cheng-Prusoff.

Tabla 3

Ejemplo	K_i
1	> 23,600 nM
2	> 23,600 nM
3	>7,890 nM
4	>7,490 nM
5	>7,490 nM

Estos datos demuestran que los péptidos de la Tabla 3 son menos selectivos para Gluc-R y de este modo no inician las respuestas fisiológicas mediadas por Gluc-R.

Activación Funcional de células hGIP-R para generar cAMP intracelular

Los ensayos funcionales cAMP usan la misma línea de células GIP-R clonadas aisladas para el ensayo de enlace hGIP-R descrito anteriormente. Las células son estimuladas con los péptidos y el cAMP generado dentro de la célula es

cuantificado usando el kit de Ensayo CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF®, (62AM4PEB). Brevemente, el cAMP inducido dentro de la célula es detectado por enlace al anticuerpo de captura cAMP-d2 en la presencia de amortiguador de lisis celular. Un
5 segundo anticuerpo de detección, Criptato anti-cAMP, es agregado para crear un intercalado que es entonces detectado usando un instrumento Perkin-Elmer Life Sciences Envision®.

Las células hGIP-R-CHO-S son recolectadas de cajas de cultivo de tejido sub-confluentes con Solución de
10 Disociación Celular Libre de Enzima, (Specialty Media 5-004-B). Las células son formadas en pelotilla a baja velocidad y lavadas 3 veces con Amortiguador de Ensayo cAMP [25 mM de HEPES en HBSS-con Mg y Ca (GIBCO, 14025-092) con 0.1% de BSA libre de ácido graso (Gibco, 7.5% BSA), 500 µM IBMX] después
15 diluidas a una concentración final de 312,000 células por mL. hGIP y péptidos son preparados como soluciones base 5X y serialmente diluidos en el Amortiguador de Ensayo cAMP así como también una curva estándar cAMP que es preparada de soluciones base congeladas de 2,848 nM de cAMP en PBS
20 almacenado a -20 °C. Para iniciar el ensayo, 40 µL de suspensión celular son transferidos a placas de media cavidad, tratadas con cultivo sin tejido, Negras (CoStar 3694) seguido por la adición de 10 µL de diluciones peptídicas 5X. Las células se dejan a temperatura ambiente
25 por 1 h. La reacción se detiene por adición de 25 µL del

anticuerpo de captura cAMP-d2 (CisBio) diluido en el amortiguador de lisis CisBio después mezclado suavemente en el sacudidor titulador-tek. Después de 15 minutos de lisis, 25 μ L del anticuerpo de detección, Criptato anti-cAMP (CisBio), se agregan, mezclando suavemente. Las mezclas de anticuerpo y célula lisada son leídas después de 1 h a temperatura ambiente usando el Perkin-Elmer Envision®. Unidades de Envision® son convertidas a nM de cAMP/cavidad usando la curva estándar de cAMP. Las nmoles de cAMP generadas en cada cavidad son convertidas a un porcentaje de respuesta máxima observada con el control de hGIP. Un valor EC_{50} relativo se deriva por análisis de regresión no lineal usando el porcentaje de respuesta máxima contra la concentración de péptido agregado.

15

Tabla 4

20

Ejemplo	EC_{50}
1	0.005 nM
2	0.023 nM
3	0.244 nM
4	0.277 nM
5	0.207 nM

Estos datos demuestran que los péptidos de la Tabla 4 se unen y activan GIP-R y pueden de este modo iniciar las

25

respuestas fisiológicas mediadas por GIP-R.

Activación Funcional de células hGLP-1-R para generar cAMP intracelular

5 Los ensayos funcionales de cAMP usan una línea clonal de hGLP-1-R que expresa células aisladas de la transfección del hGLR-1-R clonado en pcADN3.1/Neo (Promega) ((Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 1993 Oct 15; 196(1):141-6)) y
10 transfectadas en células 293HEK. Las células hGLP-1-R son estimuladas con los péptidos y el cAMP generado dentro de la célula es cuantificado usando el kit de Ensayo CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF®, (62AM4PEB). Brevemente, el cAMP inducido dentro de la célula es detectado por enlace al anticuerpo de
15 captura cAMP-d2 (CisBio) en la presencia de amortiguador de lisis celular. Un segundo anticuerpo de detección, Criptato anti-cAMP (CisBio), es agregado para crear un intercalado que es entonces detectado usando un instrumento Perkin-Elmer Envision®.

20 Las células hGLP-1-R-293HEK son recolectadas de cajas de cultivo de tejido sub-confluentes con Solución de Disociación Celular Libre de Enzima, (Specialty Media 5-004-B). Las células son formadas en pelotilla a baja velocidad y lavadas 3 veces con Amortiguador de Ensayo DMEM de cAMP [10
25 mM de HEPES en DMEM (Gibco-31053) con 0.5% FBS y 2 mM de

glutamina, y 500 μ M de IBMX] después diluidas a una concentración final de 50,000 células por mL. hGLP-1 y péptidos son preparados como soluciones base 5X y serialmente diluidos en el Amortiguador de Ensayo DMEM de cAMP así como

5 también una curva estándar cAMP que es preparada de soluciones base congeladas de 2,848 nM de cAMP en PBS almacenado a -20 °C. Para iniciar el ensayo, 40 μ L de suspensión celular son transferidos a placas de media cavidad, tratadas con cultivo sin tejido, Negras (CoStar

10 3694) seguido por la adición de 10 μ L de diluciones peptídicas 5X. Las células se dejan a temperatura ambiente por 1 h. La reacción se detiene por adición de 25 μ L del anticuerpo de captura cAMP-d2 (CisBio) diluido en el amortiguador de lisis CisBio después mezclado suavemente en

15 el sacudidor titulador-tek. Después de 15 minutos de lisis, 25 μ L del anticuerpo de detección, Criptato anti-cAMP (CisBio), se agregan, mezclando suavemente. Las mezclas de anticuerpo y célula lisada son leídas después de 1 hora a temperatura ambiente usando el Perkin-Elmer Envision®.

20 Unidades de Envision® son convertidas a nM de cAMP/cavidad usando la curva estándar de cAMP. Las nmoles de cAMP generadas en cada cavidad son convertidas a un porcentaje de respuesta máxima observada con el control de hGLP-1. Un valor EC50 relativo se deriva por análisis de regresión no lineal

25 usando el porcentaje de respuesta máxima contra la

concentración de péptido agregado.

Tabla 5

Ejemplo	EC₅₀
1	0.036 nM
2	0.045 nM
3	1.11 nM
4	0.844 nM
5	0.959 nM

Estos datos demuestran que los péptidos de la Tabla 5 se unen y activan GLP-1-R y pueden de este modo iniciar las respuestas fisiológicas mediadas por GLP-1-R.

In vivo

Efectos en absorción de alimento, peso corporal y composición corporal en ratones obesos de dieta inducida (DIO)

Se usaron ratones obesos de dieta inducida macho de tres a cuatro meses de edad (DIO). Los animales fueron individualmente alojados en una instalación de temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas 22:00), y tienen libre acceso a alimento y agua. Después de 2 semanas de aclimatación a la instalación,

los ratones son aleatorizados a grupos de tratamiento (n=8/10 grupo) de manera que cada grupo tiene masa grasa y peso corporal medio similar. Antes del experimento, los ratones son subcutáneamente inyectados (sc) con solución de vehículo y pesados por 7 días para aclimatarlos a los procedimientos.

El vehículo o análogo peptídico (intervalo de dosis 10-100 nmol/Kg) disuelto en el vehículo es administrado por inyección sc para alimentación a albedrío a ratones DIO 30-90 minutos previo al comienzo del ciclo de oscuridad cada 3 días por 2 a 4 semanas. El peso corporal y el peso del alimento más la tolva son medidos al mismo tiempo. El alimento consumido en las últimas 24 horas es calculado sustrayendo el peso actual del alimento más la tolva de aquel del día previo. Cambios absolutos en el peso corporal son calculados sustrayendo el peso corporal del animal previo a la primera inyección. En los días -1 y 14, la masa grasa total es medida por resonancia magnética nuclear (NMR) usando un instrumento Echo Medical System (Houston, TX). La masa libre de grasa es calculada sustrayendo la masa grasa del peso corporal total.

20

Tabla 6a Cambio de peso en ratones DIO durante un periodo de tratamiento de 14 días (Ejemplos 3 y 4)

25

5

Ejemplo (Dosis)	Pérdida de peso total (cambio de peso en g por 14 días)	Absorción de alimento total (total g por 14 días)	Pérdida de masa grasa (cambio de peso graso en g por 14 días)
Vehículo	+0.7±0.4	36.9±1.0	0.2±0.3
4 (10 nmol/Kg)	-4.5±0.3**	28.4±1.8**	-3.6±1.1**
4 (30 nmol/Kg)	-6.0±0.4**	25.5±2.6**	-4.7±0.4**
3 (30 nmol/Kg)	-5.5±0.4**	26.5±1.5**	-4.3±0.3**
10 3 (100 nmol/Kg)	-7.0±0.3**	23.4±0.7**	-5.6±0.2**

Tabla 6b Cambio de peso en ratones DIO durante un periodo de tratamiento de 14 días (Ejemplos 4 y 5)

15

20

Ejemplo (Dosis)	Pérdida de peso total (cambio de peso en g por 14 días)	Absorción de alimento total (total g por 14 días)	Pérdida de masa grasa (cambio de peso graso en g por 14 días)
Vehículo	+0.8±0.4	38.4±0.5	0.1±0.2
4 (10 nmol/Kg)	-4.9±0.4*	26.9±1.5*	-3.6±0.3**
5 (10 nmol/Kg)	-3.2±0.3*	31.0±1.0*	-2.4±0.3**
5 (30 nmol/Kg)	-5.0±0.4*	26.7±0.7*	-3.6±0.4**

Los datos de las Tablas 6a y 6b muestran los
Ejemplos 3, 4, y 5 absorción de alimento cumulativo y peso

corporal reducido en estudios de ratón DIO de 14 días cuando se comparan con ratones tratados con vehículo. El peso corporal reducido fue principalmente debido a reducción en la masa grasa. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ contra vehículo (prueba
 5 Dunnett).

Efectos en excursión de glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral después de 2 semanas de tratamiento en ratones DIO

10 Cincuenta y seis horas después de la última inyección del compuesto en el estudio DIO anterior, los animales se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa oral. En breve, los ratones fueron ayunados por 16 horas previo al inicio de la prueba de tolerancia a la
 15 glucosa. Al tiempo 0, a los animales se les dio 2g/kg de dextrosa por alimentación forzada oral. La sangre es recolectada por sangrado de la cola tomada 0, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la estimulación de glucosa. La concentración de glucosa se mide por el glucómetro.

20

Tabla 7a. Efectos de los Ejemplos 3 y 4 en la excursión de glucosa después de una carga de glucosa oral. Datos proporcionados como área bajo la curva de glucosa (media $\pm$ SEM)

25

Ejemplo (Dosis)	AUC de Glucosa (mg*min/dL)		
	MEDIA	SEM	Dunnett
Vehículo	18232	624	
4 (10 nmol/Kg)	11725	448	<0.01
4 (30 nmol/Kg)	10907	252	<0.01
3 (30 nmol/Kg)	10293	179	<0.01
3 (100 nmol/Kg)	10892	396	<0.01

Tabla 7b. Efectos de los Ejemplos 4 y 5 en la excursión de glucosa después de una carga de glucosa oral. Datos proporcionados como área bajo la curva de glucosa (media $\pm$ SEM)

Ejemplo (Dosis)	AUC de Glucosa (mg*min/dL)		
	MEDIA	SEM	Dunnett
Vehículo	24412	1511	
4 (10 nmol/Kg)	13719	385	<0.01
5 (10 nmol/Kg)	14332	413	<0.01
5 (30 nmol/Kg)	12474	369	<0.01

Estos datos en las Tablas 7a y 7b muestran que los

Ejemplos 3, 4, y 5 reducen significativamente la excursión de glucosa después de una carga de glucosa oral. La significancia estadística es evaluada por la prueba Dunnett.

5 **Efectos en la absorción de alimento, pero corporal
y composición corporal en ratas Long Evans obesas de dieta
inducida (DIO)**

Se usaron ratas Long Evans obesas de dieta inducida macho de cuatro a cinco meses de edad. Los animales son
10 individualmente alojados en una instalación de temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (luces encendidas 22:00), y tienen libre acceso a alimento (dieta TD95217) y agua. Los animales son aclimatados en la instalación por al menos 2 semanas. Al día 9, la composición
15 corporal es determinada por QNMR y las ratas son aleatorizadas a grupos respectivos (n=6/grupo) con base en el peso corporal, % de grasa y % de masa magra. El compuesto es administrado por inyección subcutánea en los días 1, 4, 8, 11, y 15. Al día 14 la composición corporal es nuevamente
20 determinada por QNMR y al Día 16 los animales son pesados y sangrados en la cola para muestras para determinar la glucosa en plasma, lípidos, insulina, glucagón y PYY. Después de la eutanasia con CO₂, las muestras de sangre son tomadas por punción cardíaca para análisis de determinación de
25 exposición.

La administración de los Ejemplos 3 y 4 durante 16 días produce cambios en el peso corporal y composición corporal de ratas DIO comparado con ratas DIO tratadas con vehículo incrementando el porcentaje de masa magra y reduciendo el porcentaje de masa grasa. Por ejemplo, después de la administración de una dosis de 10 nmol/Kg del Ejemplo 3 durante 16 días, la masa magra es incrementada 0.6% y la masa grasa es reducida 1.3%. De manera similar, después de la administración de una dosis de 30 nmol/Kg del Ejemplo 3 durante 16 días, la masa magra es incrementada 1.3% y la masa grasa es reducida 2.3%. Además, después de la administración de una dosis de 30 nmol/Kg del Ejemplo 4 durante 16 días, la masa magra es incrementada 0.4% y la masa grasa es reducida 1.8%. De manera similar, después de la administración de una dosis de 100 nmol/Kg del Ejemplo 4 durante 16 días, la masa magra es incrementada 1.8% y la masa grasa es reducida 3.2%.

La administración de los Ejemplos 3 y 4 reduce las cantidades de lípidos de plasma, incluyendo triglicéridos y colesterol total, e incrementa la cantidad de ácidos grasos libres en ratas DIO comparado con ratones tratados con vehículo. Por ejemplo, después de la administración de una dosis de 10 nmol/Kg del Ejemplo 3, triglicéridos y colesterol total se redujeron de 507.3 mg/dL y 104 mg/dL (vehículo) a 262.1 mg/dL y 91 mg/dL, respectivamente y los ácidos grasos libres se incrementaron de 0.69 mEq/L a 0.94 mEq/L. De manera

similar, después de la administración de una dosis de 30 nmol/Kg del Ejemplo 3, triglicéridos y colesterol total se redujeron de 507.3 mg/dL y 104 mg/dL (vehículo) a 233.5 mg/dL y 94 mg/dL, respectivamente y los ácidos grasos libres se incrementaron de 0.69 mEq/L a 1.01 mEq/L. Además, después de la administración de una dosis de 10 nmol/Kg del Ejemplo 4, triglicéridos y colesterol total se redujeron de 808.1 mg/dL y 127 mg/dL (vehículo) a 488.7 mg/dL y 110 mg/dL, respectivamente. De manera similar, después de la administración de una dosis de 30 nmol/Kg del Ejemplo 4, triglicéridos y colesterol total se redujeron de 808.1 mg/dL y 127 mg/dL (vehículo) a 212.2 mg/dL y 104 mg/dL, respectivamente y los ácidos grasos libres se incrementaron de 0.67 mEq/L a 0.82 mEq/L.

15

Efectos en la excursión de glucosa en sangre durante una prueba intravenosa de tolerancia a la glucosa en ratas normales

Ratas Wistar macho normales (225-250 g) se usaron en el estudio. Los animales son aleatorizados en grupos con base en el peso corporal alimentado y glucosa en sangre. Los animales son inyectados con vehículo o análogo peptídico (dosis 3-400 µg de contenido peptídico/kg) 16 horas previas al inicio de la prueba. El alimento es removido al tiempo de la inyección. Previo el ensayo los animales son puestos bajo

25

anestesia, Fenobarbital 65 mg/kg i.p., y se insertan dos catéteres en la arteria carótida. Al tiempo 0, los animales son proporcionados con 0.5g de glucosa/kg a través del catéter venoso. La sangre es recolectada de la arteria carótida al tiempo 0 (pre glucosa), 2, 4, 6, 10, 20 y 30 minutos después de la estimulación de glucosa. La concentración de glucosa es medida por glucómetro. La insulina es medida por Mesoscale®. La eficacia es medida como el incremento en área total bajo la curva de insulina (= valores de insulina en plasma integrados de t+0 a 30 min) así como también el área bajo la curva de glucosa la cual es una medida de la excursión de glucosa después de la estimulación intravenosa de glucosa.

La administración de los Ejemplos 3 y 4 incrementa el AUC de insulina y reduce el AUC de glucosa comparado con ratas tratadas con vehículo. Por ejemplo, después de la administración de una dosis de 50 µg/Kg del Ejemplo 3, el AUC de insulina se incrementó de 55 ng*min/mL (vehículo) a 137 ng*min/mL y el AUC de glucosa se redujo de 7830 mg*min/dL (vehículo) a 6780 mg*min/dL. De manera similar, después de la administración de una dosis de 200 µg/Kg del Ejemplo 3, el AUC de insulina se incrementó de 55 ng*min/mL (vehículo) a 183 ng*min/mL y el AUC de glucosa se redujo de 7830 mg*min/dL (vehículo) a 7020 mg*min/dL. Además, después de la administración de una dosis de 50 µg/Kg del Ejemplo 4, el AUC

de insulina se incrementó de 44 ng*min/mL (vehículo) a 150 ng*min/mL y el AUC de glucosa se redujo de 8010 mg*min/dL (vehículo) a 7730 mg*min/dL. De manera similar, después de la administración de una dosis de 200 µg/Kg del Ejemplo 4, el
5 AUC de insulina se incrementó de 44 ng*min/mL (vehículo) a 161 ng*min/mL y el AUC de glucosa se redujo de 8010 mg*min/dL (vehículo) a 7420 mg*min/dL.

Después de la administración de una dosis de 50 µg/Kg del Ejemplo 5, el AUC de insulina es incrementada de 41
10 ng*min/mL (vehículo) a 133 ng*min/mL y el AUC de glucosa es reducida de 7739 mg*min/dL (vehículo) a 7202 mg*min/dL. De manera similar, después de la administración de una dosis de 200 µg/Kg dosis del Ejemplo 5, el AUC de insulina es reducida de 41 ng*min/mL (vehículo) a 124 ng*min/mL y el AUC de
15 glucosa es deducida de 7739 mg*min/dL (vehículo) a 7351 mg*min/dL.

Efectos esqueléticos

El Ejemplo 4 se evaluó en ratas Sprague Dawley
20 ovariectomizadas, de seis meses de edad (OvX; véase *Endocrinology* **144**: 2008–2015). Las dosis de 0, 2.9, 9.7, ó 29 nmol/kg se dieron a las ratas como inyecciones subcutáneas diariamente partiendo de 9 días posteriores a la cirugía. El tratamiento duró por 35 días y las dosis del Ejemplo 4
25 reducen de manera sensible el consumo de alimento y peso

corporal hasta 8% comparado con ratas OvX falsamente operadas. La reducción de peso corporal fue debido a masa grasa reducida y no se observó cambio en masa magra en ratas OvX. Ejemplo 4 glucosa en suero son ayuna reducida y triglicéridos en ratas OvX. El compuesto de manera dependiente de la dosis previene la pérdida inducida por OvX en contenido mineral óseo y densidad mineral ósea en vértebra lumbar pero no tiene efecto en el hueso cortical del fémur medio. El Ejemplo 4 no afecta adversamente la densidad mineral ósea o contenido mineral óseo en el fémur y vértebra lumbar en ratas OvX. Se debe notar que la pérdida en peso corporal (8% en este estudio) puede afectar directamente la masa ósea. La resistencia ósea es la carga dependiente y pérdida de peso que resulta en una carga inferior en huesos que llevan peso y como una consecuencia se observa menos impacto en parámetros esqueléticos de huesos que llevan peso, es decir, el hueso cortical del fémur. Se evaluaron significancias estadísticas por ANOVA de una forma seguido por una prueba Dunnett.

20

25

Tabla 8: Cambios en la densidad mineral ósea (BMD)
de vértebras lumbares

Ejemplo (Dosis)	Densidad mineral ósea (mg/cm ³)		
	MEDIA	SEM	Significancia contra OvX+Veh
Operado falsamente + Vehículo	589	9.6	<0.05
OvX + vehículo	540	10.2	n/a
OvX + 2.9 nmol/kg Ej. 4	557	10.7	n.s.
OvX + 9.7 nmol/kg Ej. 4	558	10.9	n.s.
OvX + 29 nmol/kg Ej. 4	588	21.6	<0.05

Tabla 9: Cambios en contenido mineral óseo (BMC) de vértebras lumbares

Ejemplo (Dosis)	Densidad mineral ósea (mg)		
	MEDIA	SEM	Significancia contra OvX+Veh
Operado falsamente + Vehículo	9.61	0.17	n.s.
OvX + vehículo	9.13	0.24	n/a
OvX + 2.9 nmol/kg Ex 4	9.75	0.25	n.s.
OvX + 9.7 nmol/kg Ex 4	9.98	0.18	<0.05
OvX + 29 nmol/kg Ex 4	10.49	0.55	<0.05

Los datos en las Tablas 8 y 9 muestran que el Ejemplo 4 mejora el BMC y BMD en ratas OvX.

Los compuestos de la presente invención son preferiblemente formulados como composiciones farmacéuticas administrados por una variedad de rutas. Muy preferiblemente, tales compuestos son para administración parenteral. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para preparar las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (A. Gennaro,

et. al., eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995).

Los compuestos de la presente invención son en general efectivos sobre un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, dosificaciones por semana caen dentro del
5 intervalo de 1 a 24 mg de conjugado peptídico ó 0.014 a 0.343 mg/Kg de peso corporal. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del rango mencionado antes pueden ser más que adecuados, mientras en otros casos todavía dosis más grandes pueden ser empleadas
10 sin causar algún efecto secundario nocivo y por lo tanto el rango de dosificación anterior no está propuesto para limitar el alcance de la invención en cualquier forma. Se entenderá que la cantidad de compuesto actualmente administrado será determinada por un especialista, en vista de las
15 circunstancias relevantes, que incluyen la condición a ser tratada, la ruta elegida de administración, el compuesto actual o compuestos administrados, la edad, peso y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente.

20 Otras modificaciones de la presente invención serán aparentes para aquellos expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

- 5 1. Un péptido caracterizado porque comprende la secuencia:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Xaa¹-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Xaa²-Xaa³ (SEC ID NO:1)

en donde Xaa¹ en la posición 22 es Nal o Phe; Xaa² en la posición 43 es Cys o está ausente;

Xaa³ en la posición 44 es Cys o está ausente; el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado; y siempre que
15 donde Xaa² en la posición 43 o Xaa³ en la posición 44 es Cys, entonces cualquiera o ambos son opcionalmente PEGilados.

2. El péptido de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque Xaa¹ es Nal.

3. El péptido de conformidad con la
20 Reivindicación 1, caracterizado porque Xaa¹ es Phe.

4. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque Xaa² y Xaa³ están ambos ausentes.

5. El péptido de conformidad con cualquiera de
25 las Reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque Xaa² y Xaa³

son cada uno Cys.

6. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 ó 5, caracterizado porque cualquier Cys en la posición 43 o Cys en la posición 44 o
5 amos son PEGilados con una molécula PEG de 18 a 22 kDa.

7. El péptido de conformidad con la Reivindicación 6, caracterizado porque la molécula PEG es de 20 a 21 kDa.

8. El péptido de conformidad con la
10 Reivindicación 6, caracterizado porque la molécula PEG es de 20 kDa.

9. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 ó 5 a 8, caracterizado porque cada PEG es lineal.

15 10. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el aminoácido C-terminal es amidado.

11. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 ó 5 a 10, caracterizado porque
20 comprende la secuencia:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys(PEG20K)-Cys(PEG20K) (SEC ID NO: 2)

25 en donde el grupo carboxilo del PEGilado Cys en la

posición 44 es amidado.

12. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 ó 5 a 10, caracterizado porque comprende la secuencia:

5 Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys(PEG20K)-Cys(PEG20K) (SEC ID NO: 3)

10 en donde el grupo carboxilo del PEGilado Cys en la posición 44 es amidado.

13. Una formulación farmacéutica caracterizada porque comprende un péptido de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12 con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 14. Una formulación farmacéutica de conformidad con la Reivindicación 13, caracterizada porque comprende uno o más de otros agentes terapéuticos.

20 15. Un método para tratar diabetes mellitus en un paciente caracterizado porque se administra al paciente una cantidad efectiva de un péptido de de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12.

25 16. Un método para inducir pérdida de peso en un paciente, caracterizado porque se administra al paciente una cantidad efectiva de un péptido de de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12.

17. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12, para uso en terapia.

18. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12, para uso en el tratamiento de
5 diabetes mellitus.

19. El péptido de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12, para uso en el tratamiento de pérdida de peso.

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al campo de tratamiento de diabetes y se refiere a péptidos que presentan
5 actividad para tanto el receptor del péptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP-R) como el receptor del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1-R) y son selectivos sobre el receptor del glucagón (Gluc-R). Se proporcionan específicamente análogos de GIP con sustituciones de
10 aminoácido introducidas para modular la actividad para tanto GIP-R como GLP-1-R y mantener la selectividad sobre Gluc-R.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference X18982	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US2011/029501	International filing date (day/month/year) 23.03.2011	Priority date (day/month/year) 26.03.2010	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K38/16			
Applicant Eli Lilly and Company			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of _____ sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____, containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ 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			
Date of submission of the demand		Date of completion of this report	
25.01.2012		09.07.2012	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Scheffzyk, Irmgard Telephone No. +49 89 2399-8602	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2011/029501

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ 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 (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-25 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-44 as originally filed

Claims, Numbers

1-19 as originally filed

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2011/029501

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

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

Section V-----

Peptides having the formula shown in SEQ.ID.No. 1 are not described in the available prior art. Thus, novelty can be acknowledged.

Working on the assumption that the scope of present claims is limited to peptides exhibiting the inventive step establishing feature; i.e. exhibiting activity for both glucose-dependent insulintropic peptide receptor (GIP-R) and glucagon-like peptide -1 receptor (GLP-R) and being selective over glucagon receptor (Gluc-R) the presence of an inventive step for presently claimed subject-matter basically can be acknowledged.

Section VIII-----

- 1). In case present application is pursued as Euro-PCT application claims 15 and 16 would not be patentable covering methods of treatments of a human/animal body.
- 2). Due to the term "comprising" which allows the presence of any number of additional amino acid residues the scope conferred by present claims seems to be unduly broad.

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

ELI LILLY AND COMPANY
Patent Division
P.O. Box 6288
Indianápolis IN 46206-6288
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

PCT

NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL INFORME DE
EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD
(Regla 71.1 del PCT)

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario X18982		Fecha de expedición (día/mes/año) 09.07.2010	
NOTIFICACIÓN IMPORTANTE			
No. de solicitud internacional: PCT/US2011/029501	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 23.03.2011	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 26.03.2011	
Solicitante Eli Lilly and Company			
1. Se notifica al solicitante que la Administración encargada del examen preliminar internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos. 2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas. 3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas. 4. RECORDATORIO Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas Oficinas) (Artículo 39.1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301). Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional a una Oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo del informe de examen preliminar internacional. Corresponde al solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada. Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las Oficinas elegidas, véase el Volumen II de la Guía del Solicitante PCT. Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33.5 que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33.2 a 4 sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27.5). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones o sobre la cuestión de si las reivindicaciones se fundan en la descripción.			
Nombre y dirección postal de la Administración encargada del examen preliminar internacional Oficina Europea de Patentes D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 – 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Funcionario autorizado Stafl, Laurène Nº de teléfono: +49 89 2399-2698	

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)

(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario X18982	PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN Véase formulario PCT/IPEA/416	
Solicitud internacional N° PCT/US2010//029501	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 23.03.2011	Fecha de prioridad (día/mes/año) 26.03.2010
Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o a la vez clasificación nacional y IPC INV. A61K38/16		
Solicitante Eli Lilly and Company		
1. El presente informe preliminar internacional sobre patentabilidad, se establece por esta Administración encargada del examen preliminar internacional según el Artículo 35 y se transmite al solicitante conforme al Artículo 36. 2. Este INFORME comprende 4 hojas, incluida la presente primera hoja. 3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden: a. ☐ (remitido al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de ___ hojas descritas a continuación: ☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido enmendadas y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad, a menos que estas hojas sean sustituidas o canceladas, y cualquier carta acompañante (véase Reglas 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, y la Instrucción Administrativa 607 del PCT). ☐ hojas que contienen rectificaciones, donde se hizo la decisión por esta Autoridad de no tomarlas en cuenta debido a que no fueron autorizadas o notificadas por esta Autoridad en el tiempo cuando esta Autoridad comenzó a presentar este reporte, y cualquier carta acompañante (Reglas 66.4 bis, 70.2(e), 70.16 y 91.2). ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Autoridad considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Recuadro I y en el Recuadro Suplementario (véase Regla 70.16(b)). b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de soporte(s) electrónico(s)) _____, que contiene una lista de secuencias y/o tabla(s) relativas(s), solo en formato electrónico, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a listas de secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).		
4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los puntos siguientes: ☒ Recuadro I Base de este informe ☐ Recuadro II Prioridad ☐ Recuadro III No formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial ☐ Recuadro IV Falta de unidad de invención ☒ Recuadro V Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración ☐ Recuadro VI Ciertos documentos citados ☐ Recuadro VII Defectos en la solicitud internacional ☒ Recuadro VIII Observaciones relativas a la solicitud internacional		
Fecha de presentación de la solicitud de examen preliminar internacional 25.01.2012	Fecha de finalización del presente informe 09.07.2010	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada del examen preliminar internacional Oficina Europea de Patentes D-80298 München Tel: +49 89 2399-0 Fax: +49 89 2399-4465	Funcionario autorizado Scheffzyk, Irmgard N° de teléfono: +49 89 2399-8602	

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base:

- ☒ de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó
☐ de una traducción del idioma original al siguiente idioma _____, que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3.a) y 23.1.b))
☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4.a))
☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3.a))

2. Por lo que respecta a los **elementos** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina Receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe):*

Descripción, páginas:

1-25 como se presentaron originalmente

Listados de secuencias, SEC ID NO.

1-44 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, Números

1-19 como se presentaron originalmente

☐ un listado de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) - ver Recuadro Suplementario relativo a listado de secuencias

3. ☐ Las modificaciones han ocasionado la anulación de:

- ☐ la descripción, hojas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/fig.
☐ la lista de secuencias (precisar):
☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (*precisar*):

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2.c)).

- ☐ la descripción, hojas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/fig.
☐ la lista de secuencias (precisar):
☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (*precisar*):

5. ☐ Esta opinión se ha establecido

- ☐ tomando en cuenta la rectificación de un error autorizado por o notificado por esta Autoridad bajo la Regla 91 (Regla 66.1(d-bis) y 70.2(e)).
☐ sin tomar en cuenta la rectificación de un error obvio autorizado por o notificado a esta Autoridad bajo la Regla 91 (Reglas 66.4bis y 70.2(e)).

6. ☐ Los reportes de búsqueda internacional complementarios de las Autoridades se ha recibido y tomado en cuenta en el establecimiento de este reporte (Regla 54bis.8(b) y (c)).

Cuadro No. V Declaración motivada según el Artículo 35.2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. Declaración

Novedad (N)	SI	Reivindicaciones	<u>1-19</u>
	NO	Reivindicaciones	
Actividad inventiva (AI)	SI	Reivindicaciones	<u>1-19</u>
	NO	Reivindicaciones	
Aplicación industrial (AI)	SI	Reivindicaciones	<u>1-19</u>
	NO	Reivindicaciones	

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7):

Véase hoja separada

Cuadro No. VIII Ciertas observaciones en la solicitud internacional

Se hacen las siguientes observaciones en la claridad de las reivindicaciones, descripción y dibujos o en la cuestión de si las reivindicaciones están completamente soportadas por la descripción.

véase hoja separada

Sección V---

Péptidos que tienen la fórmula mostrada en la SEC ID NO. 1 no se describen en la técnica anterior disponible. De este modo, se puede reconocer la novedad.

Trabajando en el supuesto de que el alcance de las presentes reivindicaciones está limitado a péptidos que presentan la característica que establece la etapa inventiva; es decir, que presentan actividad para tanto el receptor del péptido insulíntrópico dependiente de la glucosa (GIP-R) como al receptor del péptido-1 similar al glucagón (GLP-R) y son selectivos sobre el receptor de glucagón (Gluc-R), la presencia de la etapa inventiva para la materia objeto actualmente reivindicada básicamente puede ser reconocida.

Sección VIII---

- 1). En el presente caso la solicitud se persigue como solicitud Euro-PCT las reivindicaciones 15 y 16 no podrían ser patentable cubriendo métodos de tratamientos del cuerpo humano/animal.
- 2). Debido a que el término “que comprende” el cual permite la presencia de cualquier número de residuos de aminoácido adicionales el alcance conferido por las presentes reivindicaciones parece ser ampliamente indebido.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

26 Jan 2012

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/US2011/029501

International filing date (day/month/year)
23.03.2011

Priority date (day/month/year)
26.03.2010

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K38/16 C07K14/47 C07K14/62 A61K38/30 A61K38/26 C07K14/605

Applicant
ELI LILLY AND COMPANY

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 and 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
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 - 0
Fax +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Scheffzyk, Irmgard

Telephone No +49 89 2399-8602



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2011/029501

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, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ 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 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/US2011/029501

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos. 1-19

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	<u>1-19</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-19</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

SECTION IV-----

A great number of analogues of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) are already well-known in the prior art (cf. e.g. (WO2010/016940 (D1), WO2010/016944 (D2) or WO2010/011439 (D3), all cited in present application, see page 1). Thus, the common inventive concept underlying presently claimed subject-matter which basically could be seen in the provision of GIP analogues no longer exists. Consequently, present subject-matter covers at least six separate inventions; i.e. six different GIP analogues which are not linked together by a unifying concept. Thus, there is a lack of unity a posteriori.

SECTION V-----

Novelty:

The claimed peptides are deemed novel as the sequences covered by the scope of present claims are not described in the prior art.

Inventive step:

The Applicant is asked to comment the inventive merit of presently claimed peptides when compared to the GIP analogues already available in the prior art (cf. e.g. the documents cited on page 1 of present application). Relating to this it is pointed out that the presence of Phe or Nal at residue 22 is already suggested in the prior art (see e.g. D1, claim 1 or D2, claim 1). The same is true as regards the amino acids at positions Xaa² and Xaa³ (cf. D1, claim 1).

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

Véase forma PCT/ISA/220

PCT

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL
(Regla 43bis.1 del PCT)

Fecha de envío véase forma PCT/ISA/210 (segunda
(día/mes/año) hoja)

Referencia de archivo del solicitante o mandatario
Véase forma PCT/ISA/220

PARA ACCIÓN ADICIONAL
(véase párrafo 2 abajo)

No. de solicitud internacional:

PCT/US2010/029501

Fecha de presentación internacional
(día/mes/año)

23.03.2011

Fecha de Prioridad
(día/mes/año)

26.03.2010

Clasificación de Patente Internacional (IPC) o Clasificación nacional e IPC

INV. A61K38/16 C07K14/47 C07K14/62 A61K38/30 A61K38/26 C07K14/605

Solicitante

ELI LILLY AND COMPANY

1. Esta opinión contiene las indicaciones que están relacionadas con los siguientes ítems:

- ☒ Cuadro No. I Base de la opinión
- ☐ Cuadro No. II Prioridad
- ☐ Cuadro No. III Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, paso de la invención, o aplicabilidad industrial
- ☒ Cuadro No. IV Carencia de unidad de la invención
- ☒ Cuadro No. V Establecimiento razonado bajo la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, paso de la invención o aplicabilidad industrial; las citas y explicaciones que soportan tal establecimiento o fundamento.
- ☐ Cuadro No. VI Ciertos documentos citados
- ☐ Cuadro No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☐ Cuadro No. VIII Ciertas observaciones en la solicitud internacional.

2. CONTINUACIÓN DE LA TRAMITACIÓN

Si se hace una petición de examen preliminar internacional, esta opinión se considerará como una opinión escrita de la administración encargada del examen preliminar internacional ("IPEA") salvo en aquellos casos en los que el solicitante elija una Administración distinta a ésta y, la IPEA elegida haya notificado a la Oficina Internacional según lo previsto en la Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Administración encargada de la búsqueda internacional no serán consideradas como tales.

Si esta opinión es, como se indica más arriba, considerada como una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a que presente ante la IPEA una respuesta por escrito junto con modificaciones, en su caso, antes de la expiración del plazo de 3 meses a contar desde la fecha de envío del formulario PCT/ISA/220 o antes de la expiración del plazo de 22 meses a contar desde la fecha de prioridad, aplicándose el plazo que expire más tarde.

Para otras opciones, consultar el formulario PCT/ISA/220.

3. Para más detalles, ver las notas del formulario PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de envío de la IPEA/US

Oficina Europea de Patentes
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399-0
Fax +49 89 2399 - 4465

Fecha de terminación de esta opinión

Véase forma
Forma PCT/ISA/210

Oficial autorizado/Examinador

Scheffzyk, Irmgard

Teléfono No. +49 89 2399-8602

Cuadro No. I Bases de esta opinión

1. Por lo que respecta al **idioma** esta opinión se ha establecido sobre la base de
 - ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.
 - ☐ Esta opinión se ha establecido sobre la base de una traducción del idioma original al siguiente idioma _____, que es el idioma de una traducción proporcionada a los fines de la búsqueda internacional (según las Reglas 12.3 y 23.1 b)).
2. ☐ Esta opinión se ha establecido tomando en cuenta la rectificación de un error obvio autorizado por o notificado a esta Autoridad bajo la Regla 91 (Regla 43bis.1(a))
3. En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de:
 - a. (medios)
 - ☐ por escrito
 - ☒ en forma electrónica
 - b. (tiempo)
 - ☒ en la solicitud internacional como se presentó
 - ☐ junto con la solicitud internacional en forma electrónica
 - ☐ subsecuentemente a esta Autoridad para los propósitos de búsqueda
4. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
5. Comentarios adicionales:

**OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD
DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/US2011/029501

Cuadro IV. Carencia de Unidad de Invención

1. ☐ En respuesta al requerimiento (formulario PCT/ISA/206) para pagar tasas adicionales, el solicitante:
- ☐ ha pagado tasas adicionales
 - ☐ ha pagado tasas adicionales bajo protesta y, en su caso, la tasa de protesta
 - ☐ ha pagado tasas adicionales bajo protesta pero la tasa de protesta aplicable, no se ha pagado
 - ☐ no ha pagado tasas adicionales
2. ☒ Esta Administración estima que no se cumple la exigencia de unidad de invención y decide no requerir al solicitante el pago de tasas adicionales.
3. Esta Administración estima que el requisito de unidad de invención, de acuerdo a las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3:
- ☐ se cumple
 - ☒ no se cumple por los siguientes motivos:
véase hoja separada
4. Consecuentemente, este reporte se ha establecido en respecto de las siguientes parte de la solicitud internacional:
- ☒ todas las partes.
 - ☐ las partes que se relacionan a las reivindicaciones Nos. 1-19

Cuadro V. Declaración razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan la declaración

1. Declaración

Novedad	Reivindicaciones	<u>1-19</u>	Sí
	Reivindicaciones		No
Actividad inventiva	Reivindicaciones		Sí
	Reivindicaciones	<u>1-19</u>	No
Aplicación industrial	Reivindicaciones	<u>1-19</u>	Sí
	Reivindicaciones		No

2. Citaciones y explicaciones

vea hoja separada

SECCIÓN IV---

Un gran número de análogos de polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP) son ya bien conocidos en la técnica anterior (cotéjese, por ejemplo, (Documentos WO2010/016940 (Documento D1), WO2010/016944 (Documento D2) o WO2010/011439 (Documento D3), todos citados en la presente solicitud, véase página 1). De este modo, el concepto inventivo que fundamenta la materia objeto actualmente reivindicada el cual básicamente podría ser visto en la provisión de análogos de GIP no existe más. Consecuentemente, la presente materia objeto cubre al menos seis invenciones separadas; es decir, seis diferentes análogos de GIP los cuales no están ligados en conjunto por un concepto unificante. De este modo, existe una carencia de unidad a posteriori.

SECCIÓN V---

Novedad:

Los péptidos reivindicados son considerados nuevos ya que las secuencias cubiertas por el alcance de las presentes reivindicaciones no se describen en la técnica anterior.

Etapas Inventivas:

Se le pide al solicitante comentar el mérito inventivo de los péptidos actualmente reivindicados cuando se comparan con los análogos de GIP ya disponibles en la técnica anterior (cotéjese, por ejemplo, los documentos citados en la página 1 de la presente solicitud). Con relación a esto, se indica que la presencia de Phe o Nal en el residuo 22 ya es sugerida en la técnica anterior (véase por ejemplo, documento D1, reivindicación 1 ó documento D2, reivindicación 1). Lo mismo es cierto con respecto a los aminoácidos en las posiciones Xaa² y Xaa³ (cotéjese, documento D1, reivindicación 1).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X18982	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2011/029501	International filing date (<i>day/month/year</i>) 23/03/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 26/03/2010
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out 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))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/029501

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐

 on paper
 - ☒

 in electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed
 - ☐

 together with the international application in electronic form
 - ☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2.

☐

 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.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/029501

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/029501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/16 C07K14/47 C07K14/62 A61K38/30 A61K38/26 C07K14/605 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td>WO 2010/016940 A2 (IPSEN PHARMA SAS [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) cited in the application the whole document -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td>WO 2010/016944 A2 (IPSEN PHARMA SAS [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) cited in the application the whole document -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td>WO 2010/011439 A2 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; TAO MA [US]) 28 January 2010 (2010-01-28) cited in the application the whole document -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-19</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2010/016940 A2 (IPSEN PHARMA SAS [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) cited in the application the whole document -----	1-19	X	WO 2010/016944 A2 (IPSEN PHARMA SAS [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) cited in the application the whole document -----	1-19	X	WO 2010/011439 A2 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; TAO MA [US]) 28 January 2010 (2010-01-28) cited in the application the whole document -----	1-19
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WO 2010/016940 A2 (IPSEN PHARMA SAS [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) cited in the application the whole document -----	1-19												
X	WO 2010/016944 A2 (IPSEN PHARMA SAS [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 11 February 2010 (2010-02-11) cited in the application the whole document -----	1-19												
X	WO 2010/011439 A2 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; TAO MA [US]) 28 January 2010 (2010-01-28) cited in the application the whole document -----	1-19												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.														
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 1 June 2011		Date of mailing of the international search report 17/06/2011												
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Scheffzyk, Irmgard												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/029501

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010016940 A2	11-02-2010	AU 2009280017 A1 CA 2732949 A1 KR 20110043686 A	11-02-2010 11-02-2010 27-04-2011
WO 2010016944 A2	11-02-2010	AU 2009280021 A1 CA 2733006 A1 EP 2318433 A2 KR 20110043689 A	11-02-2010 11-02-2010 11-05-2011 27-04-2011
WO 2010011439 A2	28-01-2010	AR 072159 A1 AU 2009274425 A1 CA 2729296 A1 EP 2300035 A2 KR 20110040760 A PE 00562010 A1	11-08-2010 28-01-2010 28-01-2010 30-03-2011 20-04-2011 26-01-2010

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 11(completely); 1-10, 13-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having SEQ.ID.NO. 2.

2. claims: 12(completely); 1-11, 13-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having SEQ.ID.NO. 3

3. claims: 1-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having SEQ.ID.NO. 4

4. claims: 1-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having SEQ.ID.NO. 5

5. claims: 1-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having at position 22
Phe and at position 43 Cys, the position 44 being deleted

6. claims: 1-19(partially)

Subject-matter relating to peptides having at position 22
Nal at position 43 Cys and position 44 being deleted.
