



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-78328

54. TÍTULO

AGONISTAS DEL RECEPTOR (VPAC2) DEL PEPTIDO ACTIVADOR DE

LA ADEMINATO CICLASA HIPOFISARIA (PACAP) Y SUS METODOS

DE USO FARMACOLOGICO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION

DOMICILIO

CONNECTICUT, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-078328- -00000-0000

don

Fec: 2008-08-09 17:36:24 Dep. 2020 NUECREACIONES

Tra. 11 PATENTE/II

Lvs: 379 FASE NACIONAL/II

Act 411 PRESENTACION

Folios: 284

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL**

27-08-06

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **BAYER PHARMACEUTICALS
CORPORATION**sociedad constituida y existente bajo las leyes
del estado de Delaware de Estados Unidos de
AméricaDirección: 400 Morgan Lane,
West Haven,
Connecticut 06516
Estados Unidos de AméricaDomicilio: West Haven,
Connecticut,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@camyp.com.

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓNC.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Kevin CLAIRMONT**
80 Merwin Circle, Cheshire,
Connecticut 06410,
Estados Unidos de América3. **Thomas BUCKHOLZ**
10 Morehouse Avenue, Milford,
Connecticut 06460
Estados Unidos de América2. **Kevin J. LUMB**
520 Granite Road, Guilford,
Connecticut 06437.
Estados Unidos de América4. **Arthur I. SALHANICK**
430 Bellevue Road, New Haven,
Connecticut 06511,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2005/002609Fecha: 27 de enero de 2005Publicación Internacional No. WO 2005/072385 A3Fecha: 11 de agosto de 2005

6

TÍTULO (54)**AGONISTAS DEL RECEPTOR (VPAC2) DEL PÉPTIDO ACTIVADOR DE
LA ADENILATO CICLASA HIPOFISARIA (PACAP) Y SUS MÉTODOS DE
USO FARMACOLOGICO**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 38/00

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

USUS

(32) Fecha

27 de enero 200429 de abril de 2004

(31) Número de Solicitud

60/539,55060/566,499

9

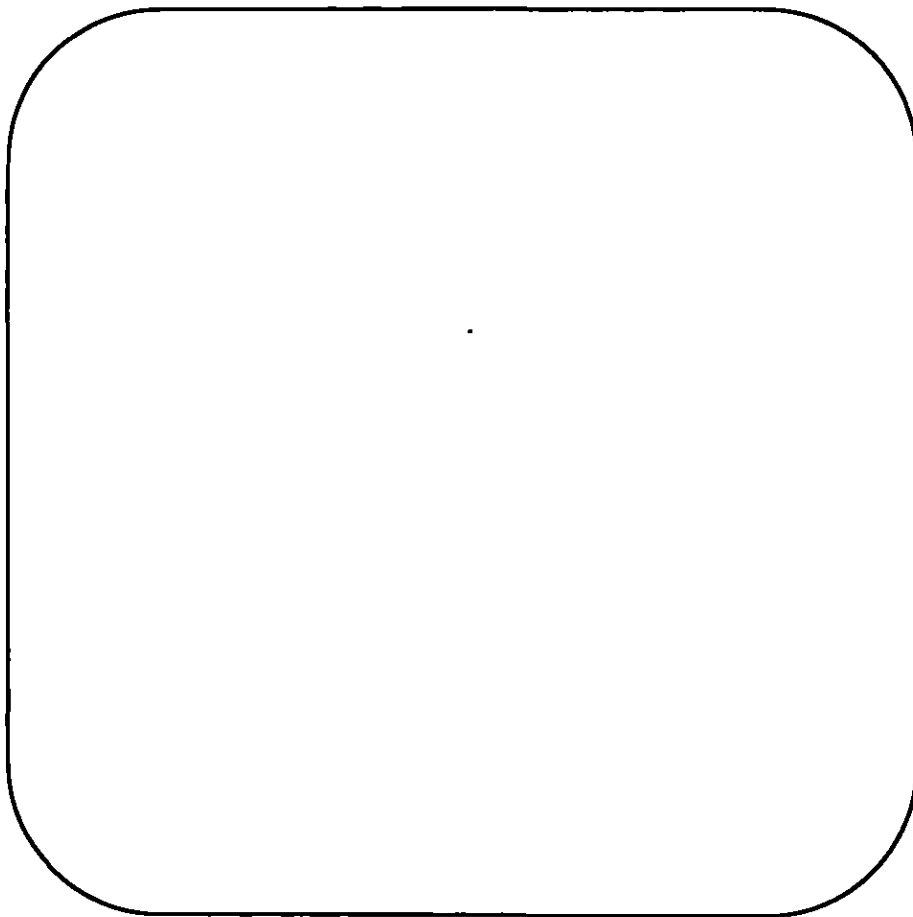
Comprobante de pago No.: 06-53.916Fecha: 17 de julio de 2006

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar 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 12x12
- ☐ 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.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA : 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

NNJ

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2005/072385 A3**

Descripción:

Páginas 38 en el idioma original

Páginas 44 en español

Reivindicaciones: Número (s) 53

Figuras: Número (s) 6

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**

3. ☒ **Extracto de publicación.**

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE**

REPRESENTACION Y PODER

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

BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION

400 Morgan Lane
domiciliado (s) en/of West Haven, CT 06516
United States of America

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 3355 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela,

CAVELIER ABOGADOS

WPPODE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Arrowney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72□35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the first or second alternate can be taken again in their sequence by the principal, the first or second alternate depending on case, and the same rule will suffice. The exercise of the representation by the first, second and third alternates in their turn shall end at such time as, in addition, we grant a Power of Arrowney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ

14425
5829

5

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: The United States of America

THIS PUBLIC DOCUMENT

2. has been signed by **ELAINE PORTER**

3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC**

4. in the State of Connecticut for the term of July 1, 2001 to June 30, 2006

CERTIFIED

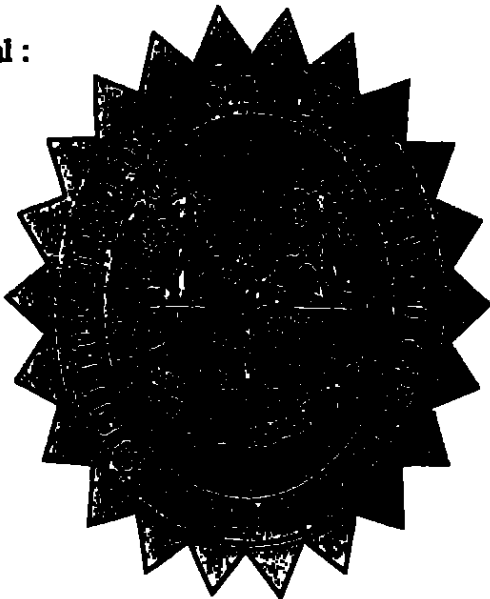
5. at Hartford, Connecticut

6. on **February 5, 2004**

7. by **SUSAN BYSIEWICZ** Secretary of the State of Connecticut

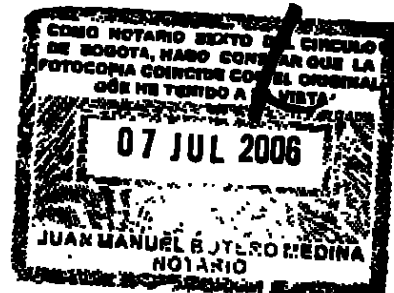
8. Number : **2004-1177**

9. Seal :



10. Signature

Secretary of the State



la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

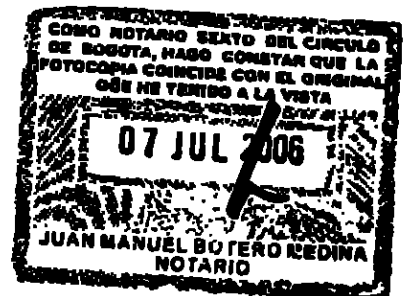
Dado y firmado hoy/Given and signed this 30 January 2004

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

por/by Jeffrey M. Greenman

Assistant Secretary of Bayer Pharmaceuticals Corporation

Firma/Signature

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 30 días del mes de Enero
de 2004 compareció(eron) ante mí,
Jeffrey M. Greenman

Secretario Asistente de Bayer Pharmaceuticals Corporation

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada
Bayer Pharmaceuticals Corporation

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*
1. Certificado de Constitución de Bayer Pharmaceuticals Corporation fechado 14 Nov. 2002;
 2. Resolución de la Junta Directiva fechado 1 Enero, 2003
 3. Consentimiento escrito de fundador único de Bayer Pharmaceuticals Corporation fechado 14 Noviembre 2002, eligiendo la Junta Directiva
2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Bayer Pharmaceuticals Corporation
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de
acuerdo con las leyes del Estado de Delaware
Estados Unidos de America

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
400 Morgan Lane, West Haven, Connecticut
06516, Estados Unidos de America

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Jeffrey M. Greenman
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad West Haven
Estado Connecticut; Estados Unidos de America
Hoy 30 Enero de 2004

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 30th day of January
200 4 appeared before me
Jeffrey M. Greenman

Assistant Secretary of Bayer Pharmaceuticals Corporation

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named
Bayer Pharmaceuticals Corporation

I certify:

1. That I have seen the following documents:*
- 1) Certificate of Incorporation of Bayer Pharmaceuticals Corporation dated 14 November 2002;
 - 2) Resolution of the Board of Directors dated 1 January 2003;
 - 3) Written Consent of the Sole Incorporator of Bayer Pharmaceuticals Corporation dated 14 November 2002 electing the Board of Directors;

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Bayer Pharmaceuticals Corporation
is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Delaware,
United States of America

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
400 Morgan Lane, West Haven, Connecticut 06516
United States of America

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

2.4. That Mr.(Messrs.) Jeffrey M. Greenman
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City West Haven
State Connecticut, United States of America
This 30th day of January 200 4

By: _____

Paul R. Berry
Paul R. Berry
Vice President, General Counsel and Secretary
of Bayer Pharmaceuticals Corporation

NOTARIAL CERTIFICATE

United States of America
State of Connecticut
County of New Haven
City of West Haven

On this the 30th day of the month of January 2004, before me, Notary Public, appeared Paul R. Berry, known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing instrument, who acknowledged himself to be Vice President, General Counsel and Secretary of Bayer Pharmaceuticals Corporation, and that acting in such capacity and with authorization, he executed the foregoing instrument on behalf of Bayer Pharmaceuticals Corporation for the purposes therein contained.

In witness thereof I set my hand.

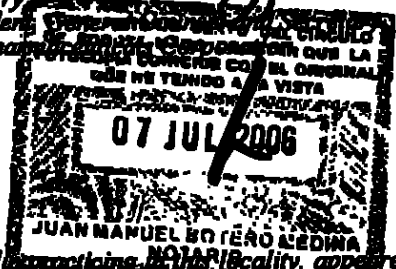
Elaine Porter
NOTARY PUBLIC
My Commission Expires _____

Elaine Porter
Notary Public

My Commission Expires June 30, 2008

CAVELIER ABOGADOS
WPP0001-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

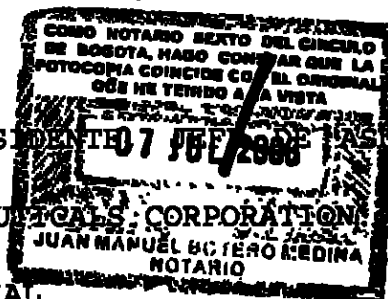
[NOTARIAL SEAL]



TRADUCCIÓN OFICIAL 031/2004 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION EMPRESA DOMICILIADA EN 400 MORGAN LANE, WEST HAVEN, CT 06516, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO EL 30 DE ENERO DE 2004 EN WEST HAVEN, CONNECTICUT, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA POR JEFFREY M. GREENMAN, SUBSECRETARIO DE BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION. FIRMA: (ILEGIBLE)

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE FECHA 30 DE ENERO DE 2004 POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE JEFFREY M GREENMAN A NOMBRE DE BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE M. GREENMAN PARA COMPROMETER A DICHA FIRMA. WEST HAVEN, CONNECTICUT, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, 30 DE ENERO DE 2004.

POR: FIRMADO: PAUL R. BERRY, VICE PRESIDENTE DE ASUNTOS JURÍDICOS Y SECRETARIO DE BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION



CERTIFICADO NOTARIAL

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

ESTADO DE CONNECTICUT, CONDADO DE NEW HAVEN

CIUDAD DE WEST HAVEN

Hoy 30 de enero de 2004, ante mí, notario público practicante en esta localidad, compareció Paul R. Berry, conocido mío como la persona cuyo nombre aparece escrito en el documento precedente, y quien reconoció ser el vicepresidente, jefe de asuntos jurídicos y secretario de Bayer Pharmaceuticals Corporation y que actuando en calidad de tal y con autorización, firmó el documento precedente a nombre de Bayer Pharmaceuticals Corporation para los objetivos allí contenidos. En testimonio de lo anterior, firmo:

ELAINE PORTER, notario público. Sello: ELAINE PORTER, notario público. Mi cargo vence el 30 de junio de 2006.

APOSTILLA:

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

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por ELAINE PORTER

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO

4. del estado de Connecticut para el período entre el primero de julio de 2001 y el 30 de junio de 2006.

CERTIFICADO

5. en Hartford, Connecticut

6. el 5 de febrero de 2004

7. por Susan Bysiewicz Secretario del Estado de Connecticut

8. Número 2004-1177 ✓

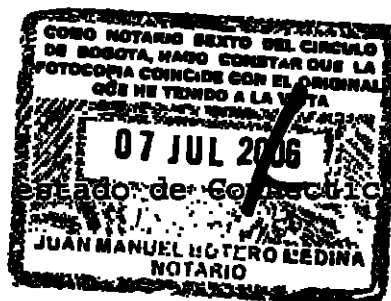
9. Sello:

El sello del estado de Connecticut

10. Firma: Susan Bysiewicz, secretario de estado.

COLO-14125-841-001-0; WPCL002G. ID 5326

Bogotá, 16 de febrero de 2004.



Eduardo Calado
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
BOGOTÁ - COLOMBIA
Ene. 31 de Febrero de 2004

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

12914

16 FEB 16 PM 5:11

Francisco Colado
Jefe de Legación
S. J. P. DE BOGOTÁ D.C.

1554

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE
BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE LAS FIRMAS
Edoardo Calvo
COPILA FIRMA REGISTRADA POR
ELESTE77 NOTARIA
16 FEB 2004

Pablo Mendez
PABLO MENDEZ
HARAJAS
Notario Santo Domingo

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL
DESDE HE TENIDO A LA VISTA
07 JUL 2006
JUAN MANUEL BUTERO MEDINA
NOTARIO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by P. Swain

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

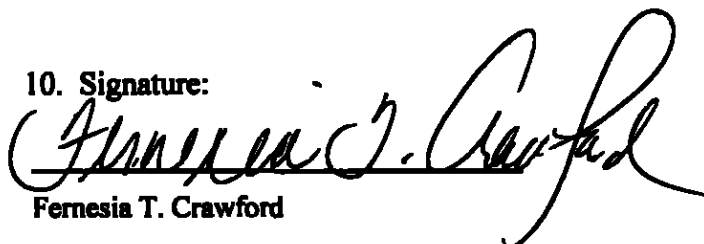
6. the seventeenth of July, 2006

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 06027432-2

9. Seal/Stamp:

10. Signature:


Fernesia T. Crawford

A 7020651

THE UNITED STATES OF AMERICA

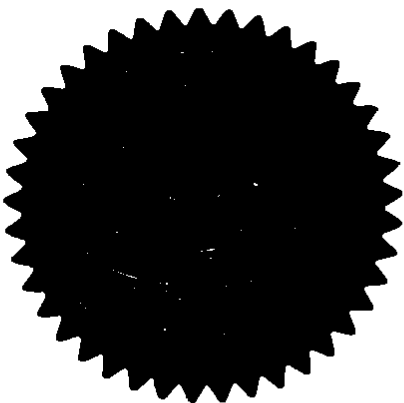
TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office**

July 13, 2006

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
July 28, 2005.**

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**




**P. SWAIN
Certifying Officer**

12

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT										
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT										
CONVEYING PARTY DATA											
<table><tr><th>Name</th><th>Execution Date</th></tr><tr><td>Kevin Clairmont</td><td>01/21/2005</td></tr><tr><td>Kevin J. Lumb</td><td>01/21/2005</td></tr><tr><td>Thomas Buckholz</td><td>01/21/2005</td></tr><tr><td>Arthur I. Salhanick</td><td>01/25/2005</td></tr></table>		Name	Execution Date	Kevin Clairmont	01/21/2005	Kevin J. Lumb	01/21/2005	Thomas Buckholz	01/21/2005	Arthur I. Salhanick	01/25/2005
Name	Execution Date										
Kevin Clairmont	01/21/2005										
Kevin J. Lumb	01/21/2005										
Thomas Buckholz	01/21/2005										
Arthur I. Salhanick	01/25/2005										
RECEIVING PARTY DATA											
<table><tr><td>Name:</td><td>Bayer Pharmaceuticals Corporation</td></tr><tr><td>Street Address:</td><td>400 Morgan Lane</td></tr><tr><td>City:</td><td>West Haven</td></tr><tr><td>State/Country:</td><td>CONNECTICUT</td></tr><tr><td>Postal Code:</td><td>06516</td></tr></table>		Name:	Bayer Pharmaceuticals Corporation	Street Address:	400 Morgan Lane	City:	West Haven	State/Country:	CONNECTICUT	Postal Code:	06516
Name:	Bayer Pharmaceuticals Corporation										
Street Address:	400 Morgan Lane										
City:	West Haven										
State/Country:	CONNECTICUT										
Postal Code:	06516										
PROPERTY NUMBERS Total: 1											
<table><tr><th>Property Type</th><th>Number</th></tr><tr><td>PCT Number:</td><td>US0502609</td></tr></table>		Property Type	Number	PCT Number:	US0502609						
Property Type	Number										
PCT Number:	US0502609										
CORRESPONDENCE DATA											
Fax Number: (203)812-8459 <i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>											
Phone: (203) 812-6450											
Email: jll.durante.b@bayer.com											
Correspondent Name: Susan M. Pellegrino											
Address Line 1: 400 Morgan Lane											
Address Line 2: Law & Patents											
Address Line 4: West Haven, CONNECTICUT 06516											
NAME OF SUBMITTER:	Susan M. Pellegrino										
Total Attachments: 2 source=5189-PCT Scanned Assignment#page1.tif source=5189-PCT Scanned Assignment#page2.tif											

CH \$40.00 US0502609

PATENT

500042192

REEL: 016321 FRAME: 0703

ASSIGNMENT OF INVENTION

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of the sum of one dollar (\$1.00) and for other good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,

ASSIGNOR(S):

ASSIGNOR(S): <i>(given name followed by family name)</i>	citizen(s) of:	residing at:
1) Kevin CLAIMONT	U.S.A.	80 Merwin Circle Cheshire, CT 06410 United States of America
2) Kevin J. LUMB	U.S.A.	520 Granite Road Guilford, CT 06437 United States of America
3) Thomas BUCKHOLZ	U.S.A.	10 Morehouse Avenue Milford, CT 06460 United States of America
4) Arthur I. SALHANICK	U.S.A.	430 Bellevue Road New Haven, CT 06511 United States of America

hereby sell(s), assign(s) and transfer(s) to

ASSIGNEE: Bayer Pharmaceuticals Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, Connecticut 06516, United States of America, a corporation organized under the laws of the State of Delaware, United States of America, and its successors, assigns and legal representatives,

the entire right, title and interest in and to, including the right to claim priority from, the invention(s) disclosed in

International Application Number PCT/US2005/002609 filed on 27 January 2005, which is entitled: "Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide (PACAP) Receptor (VPAC2) Agonists and Their Pharmacological Methods of Use"

and any legal equivalent thereof in a foreign country,

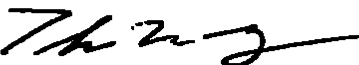
and in and to all Letters Patent and equivalents thereof to be obtained for said invention in all countries by the above application or any continuation, division, renewal, substitute or equivalent thereof, as well as to any reissue, reexamination, patent term restoration, or equivalent thereto.

PATENT
REEL: 016321 FRAME: 0704

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment, and that ASSIGNEE will, upon ASSIGNEE's request, be provided promptly with all pertinent facts and documents relating to said invention(s) and said Letters Patent and legal equivalents as may be known and accessible to ASSIGNOR, and ASSIGNOR will testify as to the same in any interference, litigation or other proceeding related thereto, and will promptly execute and deliver to ASSIGNEE or its legal representative(s) any and all papers, instruments or affidavits required to apply for, obtain, maintain, issue and enforce said application, said invention(s) and said Letters Patent and said equivalents thereof which may be necessary or desirable to carry out the purposes thereof.

This assignment is being executed before the filing of the International Application. The undersigned hereby grant(s) to Assignee the power to insert on this assignment the International Application Number, filing date, and any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document.

IN WITNESS WHEREOF, I/we have hereunto respectively set hand and seal on the date(s) shown below.

NAME OF INVENTOR	SIGNATURE	DATE (MM/DD/YY)
1) Kevin CLAIRMONT		01/21/05
2) Kevin J. LUMB		21 Jan 2005
3) Thomas BUCKHOLZ		21 Jan 2005
4) Arthur I. SALHANICK		25 Jan 2005

RECORDED: 07/28/2005

PATENT
REEL: 016321 FRAME: 0705 .

TRADUCCIÓN OFICIAL 203/2006 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN IDIOMA INGLÉS REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL AUTORIZADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 Y DEBIDAMENTE INSCRITO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA.

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A QUIENES LLEGUE LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

13 de julio de 2006

Por la presente se certifica que la adjunta es una copia verídica tomada de los registros de esta oficina, de un documento registrado el 28 de julio 2005.

Por autorización del subsecretario de comercio para propiedad intelectual y director de la Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos.

Firmado: P. SWAIN, funcionario certificador.

SELLO: OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

DEPARTAMENTO DE COMERCIO

CESIÓN DE PATENTE

NUEVA CESIÓN

DATOS DE LOS CEDENTES:

NOMBRES	FECHA DE FIRMA
1) KEVIN CLAIRMONT	21 ENERO 2005
2) KEVIN J. LUMB	21 ENERO 2005
3) THOMAS BUCKHOLZ	21 ENERO 2005
4) ARTHUR I. SALHANICK	25 ENERO 2005

DATOS DEL CESIONARIO:

NOMBRE: **BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION**

DIRECCIÓN : 400 MORGAN LANE

CIUDAD : WEST HAVEN

ESTADO : CONNECTICUT

CÓDIGO POSTAL: 06516

TOTAL NÚMEROS DE PROPIEDAD: 1

TIPO DE PROPIEDAD

NÚMERO PCT US0502609

DATOS PARA CORRESPONDENCIA

NÚMERO DE FAX: (203) 812-6459

La correspondencia se enviará por correo estadounidense cuando falle el el envío por fax.

TELÉFONO: (203) 812-6450

DIRECCIÓN CORREO ELECTRÓNICO: jill.durante.b@bayer.com

Nombre del corresponsal: Susan M. Pellegrino

Dirección línea 1: 400 Morgan Lane

Dirección línea 2: Law & Patents

Dirección línea 4: West Haven, CONNECTICUT 06516

Nombre de la persona que presenta la solicitud de cesión: Susan M. Pellegrino

Total anexos: 2

Fuente= 5189-PCT Cesión escaneada#página1.tif

Fuente= 5189-PCT Cesión escaneada#página2.tif

Expediente judicial No. 5189-PCT

CESIÓN DE INVENTO

Como contraprestación al pago por el CESIONARIO al CEDENTE de la suma de un dólar y otras contraprestaciones adecuadas y valiosas, de las cuales acusamos recibo por el presente

CEDENTES:

CEDENTE(S): (nombre de pila seguido del apellido)	Ciudadano(s) de	Residente en
1) Kevin CLAIRMONT	Estados Unidos de América	80 Merwin Circle Cheshire, CT 06410

3
 12

		Estados Unidos de América
2) Kevin J. LUMB	Estados Unidos de América	520 Granite Road Guilford, CT 06437 Estados Unidos de América
3) Thomas BUCKHOLZ	Estados Unidos de América	10 Morehouse Avenue Milford, CT 06460 Estados Unidos de América
4) Arthur I. SALHANICK	Estados Unidos de América	430 Bellevue Road New Haven, CT 06511 Estados Unidos de América

Por la presente vende, cede y transfiere a

CESIONARIO: Bayer Pharmaceuticals Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, Connecticut 06516, Estados Unidos de América, una sociedad constituida bajo las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América y sus sucesores, cesionarios y representantes legales.

Todo el derecho, título e interés en e incluyendo el derecho a reclamar prioridad de los inventos revelados en la Solicitud internacional PCT/US2005/002609, presentada el 27 de enero de 2005, la cual lleva como título: AGONISTAS DEL RECEPTOR (VPAC2) DEL PÉPTIDO ACTIVADOR DE LA ADENILATO CICLASA HIPOFISARIA (PACAP) Y SUS MÉTODOS DE USO FARMACOLÓGICO

Y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero

Y en todas las patentes y equivalentes que se obtengan para dicho invento en todos los países por la solicitud arriba mencionada o cualquier continuación, división, renovación, sustitución o equivalente del mismo, así como cualquier nueva publicación,

reexamen, restauración de período de patente o equivalente de la misma.

EL CEDENTE por el presente acuerda que ninguna cesión, venta, convenio o afectación se realizará que pueda entrar en conflicto con su cesión, y Que el cesionario cuando éste lo solicite, será informado prontamente de todos los hechos y documentos pertinentes relacionados con dicho invento y dichos títulos de patente y equivalentes legales que pueda ser conocida y accesible al CEDENTE y el CEDENTE atestiguará con respecto a las mismas en cualquier interferencia, litigio u otra actuación relativa a ellos, y en forma rápida firmará y entregará al CESIONARIO o su representante legal cualquier documento, instrumento o declaración jurada requerida para solicitar, obtener, mantener, expedir y hacer valer dicha solicitud, dicho invento y dicho título de patente o equivalente que pueda ser necesario o deseable para cumplir con los propósitos de la misma.

Esta cesión se firma antes de la presentación de la solicitud internacional. Los abajo firmantes otorgan al cesionario el poder de insertar en esta cesión el número de la solicitud internacional, la fecha de radicación y cualquier identificación adicional que pueda ser necesaria o conveniente para cumplir con las reglas de la Oficina de marcas y patentes de Estados Unidos en cuanto a radicación de este documento.

En testimonio de lo cual, hemos firmado respectivamente y fijado nuestro sello en las fechas que se informan a continuación.

NOMBRE DEL INVENTOR

- 1 KEVIN CLAIRMONT. Firma ilegible. 21 de enero de 2005
2. KEVIN J. LUMB. Firma ilegible. 21 de enero de 2005
3. THOMAS BUCKHOLZ. Firma ilegible. 21 de enero de 2005
4. ARTHUR I. SALHANICK. Firma ilegible. 25 de enero de 2005.

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 P. SWAIN

3. quien actúa en su calidad de FUNCIONARIO CERTIFICADOR

4. lleva el sello/estampilla de la OFICINA DE PATENTES Y MARCAS

CERTIFICADO

5. en Washington, D.C.

6. el 17 de julio de 2006

7. por el funcionario asistente de autenticaciones, Departamento
de Estado, Estados Unidos

8. No. 06027432-2

9. Sello/estampilla

10. Firma: FERNESIA T. CRAWFORD

COLO-14125-841-011-9

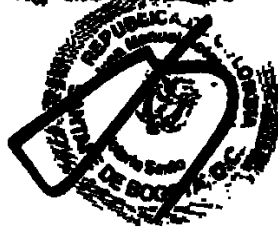
WPCL002G ID 8009

Bogotá, 4 de agosto de 2006.

Edmundo Calade
Edmundo Calade Requena
"TRADUCTOR OFICIAL"
BOGOTÁ - COLOMBIA
BOGOTÁ, COLOMBIA DE 1990
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO.
2006 AUG -8 P
Jefe de LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
276600
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FIRMAS QUE APAREZCAN

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
Eduardo Calado Noguera
 COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARÍA
 SANTAFÉ DE BOGOTÁ. 08 AGO 2006



20060808 11:59 AM
 BOGOTÁ - COLOMBIA
 1159-8-0511

20060808 11:59 AM
 BOGOTÁ - COLOMBIA
 1159-8-0511

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 August 2005 (11.08.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/072385 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 38/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/002609

(22) International Filing Date: 27 January 2005 (27.01.2005)

(23) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/539,550 27 January 2004 (27.01.2004) US
60/566,499 29 April 2004 (29.04.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER
PHARMACEUTICALS CORPORATION [US/US];
400 Morgan Lane, West Haven, Connecticut 06516 (US).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): CLAIRMONT,
Kevin [US/US]; 80 Merwin Circle, Cheshire, Connecticut
06410 (US). LUMB, Kevin, J. [US/US]; 520 Granite
Road, Guilford, Connecticut 06437 (US). BUCKHOLZ,
Thomas [US/US]; 10 Morehouse Avenue, Milford, Con-
necticut 06460 (US). SALHANICK, Arthur, I. [US/US];
430 Bellevue Road, New Haven, Connecticut 06511 (US).

(74) Agents: GREENMAN, Jeffrey, M. et al.; Bayer Phar-
maceuticals Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven,
Connecticut 06516 (US).

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

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, 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))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
8 June 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING PEPTIDE (PACAP) RECEPTOR (VPAC2) AGONISTS AND
THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF USE

(57) Abstract: This invention provides novel peptides that function in vivo as agonists of the VPAC2 receptor. These insulin
secretagogue polypeptides are shown to lower blood glucose in vivo upon glucose challenge. The polypeptides of this invention
are also stable in formulation and have long half-lives. The peptides of the present invention provide a therapy for patients with
decreased endogenous insulin secretion, for example, type 2 diabetics. The invention is also directed to a method of treating a
metabolic disease in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of the peptides to said mammal.

WO 2005/072385 A3

22
21

**PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING PEPTIDE (PACAP) RECEPTOR
(VPAC2) AGONISTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF USE**

[001] This application claims benefit of U.S. Provisional Application Serial No. 60/539,550, filed on January 27, 2004 and U.S. Provisional Application Serial No. 60/566,499, filed April 29, 2004, the contents of which are incorporated herein by reference in their entirety.

FIELD OF THE INVENTION

[002] This invention relates to newly identified polypeptides and the use of such polypeptides for therapeutic purposes. More particularly, the polypeptides of the present invention are useful in stimulating the release of insulin from pancreatic β -cells in a glucose-dependent manner, thereby providing a treatment option for those individuals afflicted with metabolic disorders such as diabetes or impaired glucose tolerance, a prediabetic state.

BACKGROUND OF THE INVENTION

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

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

[005] Alpha-glucosidase inhibitors (e.g., Precose® (Bayer Pharmaceuticals Corporation), Voglibose™ (Takeda Pharmaceuticals Company Limited), and Miglitol® (Bayer Pharmaceuticals Corporation)) reduce the excursion of postprandial glucose by delaying the absorption of glucose from the gut. These drugs are safe and provide treatment for mild to moderately affected diabetic subjects. However, gastrointestinal side effects have been reported in the literature.

[006] Insulin sensitizers are drugs that enhance the body's response to insulin. Thiazolidinediones such as Avandia® (GlaxoSmithKline, rosiglitazone) and Actos™ (Takeda Pharmaceuticals Company Limited, pioglitazone) activate the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma subtype and modulate the activity of a set of genes that have not been well described. Razulin™ (Warner-Lambert Company, troglitazone), the first drug in this class,

23
29

was withdrawn because elevated liver enzyme levels and drug induced hepatotoxicity. These hepatic effects do not appear to be a significant problem in patients using Avandia® and Actos™. Even so, liver enzyme testing is recommended every 2 months in the first year of therapy and periodically thereafter. Avandia® and Actos™ seem to be associated with fluid retention and edema. Another potential side effect is weight gain. Avandia® is not indicated for use with insulin because of concern about congestive heart failure.

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

[008] Glucophage® (Lipha Corporation, metformin HCl) is a biguanide that lowers blood glucose by decreasing hepatic glucose output and increasing peripheral glucose uptake and utilization. The drug is effective at lowering blood glucose in mildly and moderately affected subjects and does not have the side effects of weight gain or the potential to induce hypoglycemia. However, Glucophage® has a number of side effects including gastrointestinal disturbances and lactic acidosis. Glucophage® is contraindicated in diabetics over the age of 70 and in subjects with impairment in renal or liver function. Finally, Glucophage® has primary and secondary failure rates similar to the SFUs.

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

[010] Because of the problems with current treatments, new therapies to treat type 2 diabetes are needed. In particular, new treatments to retain normal (glucose-dependent) insulin secretion are needed. Such new drugs should have the following characteristics: dependent on glucose for promoting insulin secretion (i.e., produce insulin secretion only in the presence of elevated blood glucose); low primary and secondary failure rates; and preserving islet cell function. The strategy to develop the new therapy disclosed herein is based on the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling mechanism and its effects on insulin secretion.

[011] Cyclic AMP is a major regulator of the insulin secretion process. Elevation of this signaling molecule promotes the closure of the K⁺ channels following the activation of protein kinase A pathway. Closure of the K⁺ channels causes cell depolarization and subsequent opening of Ca⁺⁺ channels, which in turn leads to exocytosis of insulin granules. Little if any effects on insulin secretion occurs in the absence of low glucose concentrations (Weinhaus, et al., Diabetes 47:1428-1435, 1998). Secretagogues like PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide),

24
23

VIP (vasoactive intestinal peptide), and GLP-1 (glucagon-like peptide 1) use the cAMP system to regulate insulin secretion in a glucose-dependent fashion (Komatsu, et al., *Diabetes* 46:1928-1938, 1997; Filippson, et al., *Diabetes* 50:1959-1969, 2001; Drucker, *Endocrinology* 142:521-527, 2001). Insulin secretagogues working through the elevation of cAMP such as GLP-1, VIP, and PACAP are also able to enhance insulin synthesis in addition to insulin release (Skoglund, et al., *Diabetes* 49:1156-1164, 2000; Borboni, et al., *Endocrinology* 140:5530-5537, 1999).

[012] GLP-1 is released from the intestinal L-cell after a meal and functions as an incretin hormone (i.e., it potentiates glucose-induced insulin release from the pancreatic β -cell). It is a 37-amino acid peptide that is differentially expressed by the glucagon gene, depending upon tissue type. The clinical data that support the beneficial effect of raising cAMP levels in β -cells have been collected with GLP-1. Infusions of GLP-1 in poorly controlled type 2 diabetics normalized their fasting blood glucose levels (Gutniak, et al., *New Eng. J. Med.* 326:1316-1322, 1992) and with longer infusions improved the β -cell function to those of normal subjects (Rachman, et al., *Diabetes* 45:1524-1530, 1996). A recent report has shown that GLP-1 improves the ability of β -cells to respond to glucose in subjects with impaired glucose tolerance (Byrne, et al., *Diabetes* 47:1259-1265, 1998). All of these effects, however, are short-lived because of the short half-life of the peptide.

[013] Amylin Pharmaceuticals has conducted clinical trials with Exendin-4 (AC2993), a 39 amino acid peptide originally identified in Gila Monster. Amylin has reported that clinical studies demonstrated improved glycemic control in type 2 diabetic patients treated with Exendin-4. However, the incidence of nausea and vomiting was significant.

[014] PACAP is a potent stimulator of glucose-dependent insulin secretion from pancreatic β -cells. Three different PACAP receptor types (PAC1, VPAC1, and VPAC2) have been described (Harner, et al., *Pharmacol. Reviews* 50:265-270, 1998; Vaudry, et al., *Pharmacol. Reviews* 52:269-324, 2000). PACAP displays no receptor selectivities, having comparable activities and potencies at all three receptors. PAC1 is located predominately in the CNS, whereas VPAC1 and VPAC2 are more widely distributed. VPAC1 is located in the CNS as well as in liver, lungs, and intestine. VPAC2 is located in the CNS, pancreas, skeletal muscle, heart, kidney, adipose tissue, testis, and stomach. Recent work argues that VPAC2 is responsible for the insulin secretion from β -cells (Inagaki, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2679-2683, 1994; Tautzumi, et al., *Diabetes* 51:1453-1460, 2002). This insulinotropic action of PACAP is mediated by the GTP binding protein G_s . Accumulation of intracellular cAMP in turn activates the nonselective cation channels in β -cells increasing $[Ca^{++}]$, and promotes exocytosis of insulin-containing secretory granules.

[015] PACAP is the newest member of the superfamily of metabolic, neuroendocrine, and neurotransmitter peptide hormones that exert their action through the cAMP-mediated signal transduction pathway (Arimura, *Regul. Peptides* 37:287-303, 1992). The biologically active peptides are released from the biosynthetic precursor in two molecular forms, either as a 38-amino

25
24

acid peptide (PACAP-38) and/or as a 27-amino acid peptide (PACAP-27) with an amidated carboxyl termini (Arimura, *supra*).

[016] The highest concentrations of the two forms of the peptide are found in the brain and testis (Arimura, *supra*). The shorter form of the peptide, PACAP-27, shows 88% structural homology to vasoactive intestinal polypeptide (VIP). However, the distribution of PACAP and VIP in the central nervous system suggests that these structurally related peptides have distinct neurotransmitter functions (Kovacs, et al., *Neuroendocrinology* 54:159-169, 1991).

[017] Recent studies have demonstrated diverse biological effects of PACAP-38, from a role in reproduction (McArdle, *Endocrinology* 135:815-817, 1994) to an ability to stimulate insulin secretion (Yada, et al., *J. Biol. Chem.* 269:1290-1293, 1994). In addition, PACAP appears to play a role in hormonal regulation of lipid and carbohydrate metabolism (Gray, et al., *Mol. Endocrinol.* 15:1739-47, 2001); circadian function (Harmar, et al., *Cell* 109: 497-508, 2002); and the immune system, growth, energy homeostasis, and male reproductive function (Asnicar, et al., *Endocrinol.* 143:3994-4008, 2002); regulation of appetite (Tachibana, et al., *Neurosci. Lett.* 339:203-208, 2003); as well as acute and chronic inflammatory diseases, septic shock, and autoimmune diseases (e.g., systemic lupus erythematosus) (Pozo, *Trends Mol. Med.* 9:211-217, 2003).

[018] Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a 28 amino acid peptide that was first isolated from hog upper small intestine (Said and Mutt, *Science* 169:1217-1218, 1970; U.S. Patent No. 3,879,371). This peptide belongs to a family of structurally-related, small polypeptides that includes helodermin, secretin, the somatostatins, and glucagon. The biological effects of VIP are mediated by the activation of membrane-bound receptor proteins that are coupled to the intracellular cAMP signaling system. These receptors were originally known as VIP-R1 and VIP-R2, however, they were later found to be the same receptors as VPAC1 and VPAC2. VIP displays comparable activities and potencies at VPAC1 and VPAC2.

[019] To improve the stability of VIP in human lung fluid, Bolin, et al., (*Biopolymers* 37:57-66, 1995) made a series of VIP variants designed to enhance the helical propensity of this peptide and reduce proteolytic degradation. Substitutions were focused on positions 8, 12, 17, and 25-28, which were implicated to be unimportant for receptor binding. Moreover, the "GGT" sequence was tagged onto the C-terminus of VIP mutants with the hope of more effectively capping the helix. Finally, to further stabilize the helix, several cyclic variants were synthesized (U.S. Patent No. 5,677,419). Although these efforts were not directed toward receptor selectivity, they yielded two analogs that have greater VPAC2 selectivity (Gourlet, et al., *Peptides* 18:403-408, 1997; Xia, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281:629-633, 1997).

[020] There exists a need for improved peptides that have the glucose-dependent insulin secretagogue activity of PACAP, GLP-1, or Exendin-4, but with fewer side-effects, and preferably which are stable in formulation and have long plasma half-lives in vivo. Such improved in vivo half-life results from peptides with both decreased clearance and decreased susceptibility to

26
25

proteolysis. Furthermore, tighter control of plasma glucose levels may prevent long-term diabetic complications. Thus, new diabetic drugs should provide an improved quality of life for patients.

SUMMARY OF THE INVENTION

[021] This invention provides novel polypeptides that function *in vivo* as agonists of the VPAC2 receptor (hereafter, VPAC2) and are effective in the treatment of diseases and conditions that can be ameliorated by agents having VPAC2 agonist activity. Preferably, the polypeptides of this invention are selective VPAC2 agonists, having greater potency at VPAC2 than at VPAC1 and PAC1. For example, but not by way of limitation, these polypeptides stimulate insulin synthesis and release from pancreatic β -cells in a glucose-dependent fashion and subsequent plasma glucose reduction. These secretagogue polypeptides are shown to lower blood glucose *in vivo* more than vehicle control upon glucose challenge. Furthermore, the polypeptides of this invention are stable in formulation and have long plasma half-lives and long duration of action *in vivo* when derivatized.

[022] The polypeptides of the present invention have improved stability to proteolysis by dipeptidylpeptidase IV (DPP4) and in plasma as compared to PACAP or VIP. While both VIP and PACAP27 have been reported to be resistant to cleavage by DPP4 (Zhu, et al., J. Biol. Chem 278: 22418-22423, 2003), Figure 2a demonstrates that these peptides are cleaved at longer time points, while the peptides of the present invention are resistant to cleavage at the time points tested. The derivatives of the present invention demonstrate an extended duration of action *in vivo*, supporting a dosing interval of less than once per day and, once per week or greater when derivatized.

[023] The polypeptides of the present invention provide a therapy for patients with, for example, metabolic disorders such as those resulting from decreased endogenous insulin secretion, for example, type 2 diabetes, or for patients with impaired glucose tolerance, a prediabetic state that has a mild alteration in insulin secretion. In addition, the polypeptides of the present invention may be useful in the prevention and/or treatment of gestational diabetes, maturity-onset diabetes of the young (MODY), latent autoimmune diabetes adult (LADA), and associated diabetic dyslipidemia and other diabetic complications, as well as hyperglycemia, hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance, impaired fasting glucose, dyslipidemia, hypertriglyceridemia, Syndrome X, and insulin resistance.

[024] The polypeptides of the present invention may also be utilized in the prevention and/or treatment of obesity (e.g., regulation of appetite and food intake), atherosclerotic disease, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, low HDL levels, hypertension, cardiovascular disease (including atherosclerosis, coronary heart disease, coronary artery disease, and hypertension), cerebrovascular disease and peripheral vessel disease; and for the prevention and/or treatment of lupus, polycystic ovary syndrome, carcinogenesis, and hyperplasia, asthma, male reproduction problems, ulcers, sleep disorders, disorders of lipid and carbohydrate metabolism, circadian

2A
2b

dysfunction, growth disorders, disorders of energy homeostasis, immune diseases including autoimmune diseases (e.g., systemic lupus erythematosus), as well as acute and chronic inflammatory diseases, septic shock, and other conditions identified herein, or function otherwise as described later herein.

[025] One aspect of the invention is a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 through 148, and fragments, derivatives, and variants thereof that demonstrate at least one biological function that is substantially the same as the polypeptides of the listed SEQ ID NOs. (collectively, "polypeptides of this invention"), including functional equivalents thereof. A further embodiment of this invention is a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 through 37 and SEQ ID NOs: 112 through 148, and fragments, derivatives, and variants thereof that demonstrate at least one biological function that is substantially the same as the polypeptides of the listed SEQ ID NOs. Another embodiment of this invention is a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 through 5 and SEQ ID NOs: 112 through 115, and fragments, derivatives and variants thereof that demonstrate at least one biological function that is substantially the same as the polypeptides of the listed SEQ ID NOs. A further embodiment of this invention is a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 and 112, and fragments, derivatives and variants thereof that demonstrate at least one biological function that is substantially the same as the polypeptides of the listed SEQ ID NOs.

[026] Antibodies and antibody fragments that selectively bind the polypeptides of this invention are also provided. Such antibodies are useful in detecting the polypeptides of this invention, and can be identified and made by procedures well known in the art. A polyclonal N-terminal IgG antibody and a monoclonal C-terminal Fab antibody have been generated which recognize polypeptides of this invention.

[027] The invention is also directed to a method of treating diabetes, diabetes-related disorders, and/or other diseases or conditions affected by the polypeptides of this invention, for example, effected by the VPAC2 agonist function of the polypeptides of this invention, in a mammal, comprising administering a therapeutically effective amount of any of the polypeptides of the present invention or any polypeptide active at VPAC2 such as SEQ ID NOs: 1 through 148 to said mammal. Also disclosed are methods of making the polypeptides of this invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

[028] Figures 1a-1d depict amino acid sequences of polypeptides of SEQ ID NOs: 1 through 148. SEQ ID NOs: 112-148 refer to peptides that are PEGylated at the C-terminal cysteine via a maleimide linkage. The PEG may be of any length, for example, a 22 kD linear PEG or a 43 kD branched PEG or larger. Figure 1e refers to related peptide standards.

[029] Figure 2a and 2b depict stability of VPAC2 analogues to proteolytic cleavage by DPP4.

[030] Figure 3 depicts cAMP response of cells treated with VPAC peptides.

28
27

[031] Figure 4a 4b depict a sandwich ELISA assay for detection of peptides.

[032] Figure 5a, 5b, and 5c demonstrate pharmacokinetic properties of VPAC peptides.

[033] Figure 6a, 6b, 6c, and 6d illustrate *in vivo* efficacy.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[034] This invention provides novel polypeptides, and fragments, derivatives, and variants thereof that demonstrate at least one biological function that is substantially the same as the polypeptides of Figure 1a-1d (collectively, polypeptides of this invention). The polypeptides of this invention function *in vivo* as VPAC2 agonists may be used for the prevention and/or treatment of such diseases or conditions as diabetes including type 2 diabetes, gestational diabetes, maturity-onset diabetes of the young (MODY) (Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994); latent autoimmune diabetes adult (LADA) (Zimmet, et al., Diabetes Med. 11:299, 1994); and associated diabetic dyslipidemia and other diabetic complications, as well as hyperglycemia, hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance, impaired fasting glucose, dyslipidemia, hypertriglyceridemia, Syndrome X, and insulin resistance.

[035] In addition, the polypeptides of the present invention may also be utilized in the prevention and/or treatment of obesity (e.g., regulation of appetite and food intake), atherosclerotic disease, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, low HDL levels, hypertension, cardiovascular disease (including atherosclerosis, coronary heart disease, coronary artery disease, and hypertension), cerebrovascular disease and peripheral vessel disease; and for the prevention and/or treatment of lupus, polycystic ovary syndrome, carcinogenesis, and hyperplasia, asthma, male reproduction problems including human sperm motility, ulcers, sleep disorders, and other conditions identified herein, or function otherwise as described later herein.

[036] Furthermore, the polypeptides of this invention will stimulate insulin release from pancreatic β -cells in a glucose-dependent fashion. The polypeptides of this invention are also stable in both aqueous and non-aqueous formulations and exhibit a plasma half-life of greater than one hour, for example, demonstrating a plasma half-life greater than 6 hours.

[037] The polypeptides of this invention are VPAC2 agonists. They are selective VPAC2 agonists with at least, for example, 10-fold selectivity for VPAC2 over VPAC1 and/or PAC1. The polypeptides of this invention stimulate insulin release into plasma in a glucose-dependent fashion without inducing a stasis or increase in the level of plasma glucose that is counterproductive to the treatment of, for example, type 2 diabetes. Additionally, the polypeptides of this invention are selective agonists of the VPAC2 receptor, thereby causing, for example, an increase in insulin release into plasma, while being selective against other receptors that are responsible for such disagreeable or dangerous side effects as gastrointestinal water retention, and/or unwanted cardiovascular effects such as increased heart rate or blood pressure.

2A
28

[038] The polypeptides of this invention are also stable in aqueous and non-aqueous formulations. For example, the polypeptides of this invention will exhibit less than 10% degradation at 37-40°C over a period of one week, when dissolved in water (at pH between 7-8) or non-aqueous organic solvent. Furthermore, compositions and formulations of the present invention may comprise polypeptides of the present invention, and one or more pharmaceutically acceptable carriers, pharmaceutically acceptable diluents, and pharmaceutically acceptable solvents.

[039] The polypeptides of this invention provide a therapy for patients with decreased endogenous insulin secretion or impaired glucose tolerance, for example, type 2 diabetes. That is, the polypeptides of the present invention are long-acting VPAC2 agonists that may be used to maintain, improve, and restore glucose-stimulated insulin secretion. Furthermore, a selective peptide agonist of the VPAC2 receptor will enhance glucose-dependent insulin secretion in the pancreas without causing the side effects associated with non-selective activation of the other PACAP receptors.

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

[041] "Functionally equivalent" and "substantially the same biological function or activity" each means that degree of biological activity that is within about 30% to about 100% or more of that biological activity demonstrated by the polypeptide to which it is being compared when the biological activity of each polypeptide is determined by the same procedure. For example, a polypeptide that is functionally equivalent to a polypeptide of Figure 1 is one that, when tested in the cyclic AMP (cAMP) scintillation proximity assay of Example 9, demonstrates accumulation of cAMP in CHO cell line expressing the human VPAC2 receptor.

[042] The terms "fragment," "derivative," and "variant," when referring to the polypeptides of Figure 1, means fragments, derivatives, and variants of the polypeptides which retain substantially the same biological function or activity as such polypeptides, as described further below.

[043] An analog includes a pro-polypeptide which includes within it, the amino acid sequence of the polypeptide of this invention. The active polypeptide of this invention can be cleaved from the additional amino acids that complete the pro-polypeptide molecule by natural, in vivo processes, or by procedures well known in the art such as by enzymatic or chemical cleavage. For example, the 28-amino acid native peptide VIP is naturally expressed as a much larger polypeptide which is then processed in vivo to release the 28-amino acid active mature peptide.

36
29

[044] A fragment is a portion of the polypeptide which retains substantially similar functional activity, as described in the *in vivo* models disclosed herein.

[045] A derivative includes all modifications to the polypeptide which substantially preserve the functions disclosed herein and include additional structure and attendant function (e.g., PEGylated or acetylated polypeptides which have greater half-life), fusion polypeptides which confer greater half-life, targeting specificity or an additional activity such as decreased toxicity to an intended target, as described further below.

[046] The fragment, derivative, or variant of the polypeptides of the present invention may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code, or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group, or (iii) one in which the N-terminal acetyl group is replaced with another substituent on one or more of the first three amino acids or in which one or more of the first three amino acids is substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code in order to confer resistance to proteolysis, or (iv) one in which the mature polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (e.g., polyethyleneglycol or fatty acid), or (v) one in which the additional amino acids are fused to the mature polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature polypeptide or a propeptide sequence, or (vi) one in which the polypeptide sequence is fused with a larger polypeptide (e.g., human albumin, an antibody or Fc, for increased duration of effect). Such fragments, derivatives, and variants and analogs are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

[047] The derivatives of the present invention may contain conservative amino acid substitutions (defined further below) made at one or more predicted, preferably nonessential amino acid residues. A "nonessential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of a protein without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Non-conservative substitutions would not be made for conserved amino acid residues or for amino acid residues residing within a conserved protein domain, such as residues 19 and 27 where such residues are essential for protein activity such as VPAC2 activity

31
30

and/or VPAC2 selectivity. Fragments, or biologically active portions include polypeptide fragments suitable for use as a medicament, to generate antibodies, as a research reagent, and the like. Fragments include peptides comprising amino acid sequences sufficiently similar to or derived from the amino acid sequences of a polypeptide of this invention and exhibiting at least one activity of that polypeptide, but which include fewer amino acids than the full-length polypeptides disclosed herein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the polypeptide. A biologically active portion of a polypeptide can be a peptide which is, for example, five or more amino acids in length. Such biologically active portions can be prepared synthetically or by recombinant techniques and can be evaluated for one or more of the functional activities of a polypeptide of this invention by means disclosed herein and/or well known in the art.

[048] Variants of the polypeptides of this invention include polypeptides having an amino acid sequence sufficiently similar to the amino acid sequence of the SEQ ID NOs of Figure 1 (a-d) or a domain thereof. The term "sufficiently similar" means a first amino acid sequence that contains a sufficient or minimum number of identical or equivalent amino acid residues relative to a second amino acid sequence such that the first and second amino acid sequences have a common structural domain and/or common functional activity. For example, amino acid sequences that contain a common structural domain that is at least about 45%, about 75% through 98%, or identical are defined herein as sufficiently similar. For example, variants may be sufficiently similar to the amino acid sequence of the polypeptides of this invention.

[049] Variants include polypeptides that differ in amino acid sequence due to mutagenesis. Variants that function as VPAC2 agonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, for example, truncation mutants, of the polypeptides of this invention for VPAC2 agonist activity.

[050] Moreover, derivatives of the present invention include mature polypeptides that have been fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide and/or to reduce potential immunogenicity of the polypeptide (e.g., polyethylene glycol, "PEG" or fatty acid). In the case of PEGylation, the fusion of the polypeptide to PEG may be accomplished by any means known to one skilled in the art. For example, PEGylation may be accomplished by first introducing a cysteine mutation into the polypeptide to provide a linker upon which to attach the PEG, followed by site-specific derivatization with PEG-maleimide. As an example, the cysteine may be added to the C-terminus of the peptides (see, e.g., Tautsumi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(15):8548-53, 2000; Veronesi, Biomaterials 22:405-417, 2001; Goodson & Katre, Bio/Technology 8:343-346, 1990). In addition to maleimide, numerous Cys reactive groups are known to those skilled in the art of protein crosslinking, such as the use of alkyl halides and vinyl sulfones (see, e.g., T. E. Creighton, Proteins, 2nd Ed., 1993). In addition, the PEG may be introduced by direct attachment to the C-terminal carboxylate group, to the side chain of an C-terminal, to an internal amino acid such as Cys, Lys, Asp, or Glu, or to unnatural amino acids that contain similar reactive side chain moieties.

32
31

[051] The linker between the PEG and the peptide crosslinking group may be varied. For example, the commercially available Cys-reactive 40 kDa PEG (mPEG2-MAL; Nektar, San Carlos, CA) employs a maleimide group for conjugation to Cys, and the maleimide group is attached to the PEG via a linker that contains a Lys. As a second example, the commercially available Cys-reactive 43 kDa PEG (GL2-400MA; NOF, Tokyo, Japan) employs a maleimide group for conjugation to Cys, and the maleimide group is attached to the PEG via a bisubstituted alkane linker.

[052] The present invention exemplifies, but is not limited to, the use of Cys as a crosslinking site. It is well known that other moieties present in amino acids such as the N-terminal amino group, the C-terminal carboxylate, and the side chains of amino acids such as Lys, Arg, Asp, Glu, provide reactive groups that provide moieties suitable for covalent modification and attachment to PEG. Numerous examples of suitable crosslinking agents are known to those skilled in the art (see, e.g., T. E. Creighton, *Proteins*, 2nd Ed., 1993). Such crosslinking agents may be linked to PEG as exemplified, but not limited to, by commercially available PEG derivatives containing amines, aldehydes, acetals, maleimide, succinimides, and thiols that are marketed, for example, by Nektar and NOF (e.g., Harris, et al., *Clin. Pharmacokinet.* 40, 539-551, 2001).

[053] The invention also provides chimeric or fusion polypeptides. The polypeptides of this invention can be composed of amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds (i.e., peptide isosteres), and may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. The polypeptides may be modified by either natural processes, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in research literature. Modifications may occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched, for example, as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched, and branched cyclic polypeptides may result from posttranslation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination (see, e.g., *Proteins. Structure and Molecular Properties*, 2nd ed., T. E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent

33
32

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

[054] The polypeptides of the present invention include the polypeptides of Figure 1a-d (SEQ ID NOs: 1 through 148), as well as those sequences having insubstantial variations in sequence from them. An "insubstantial variation" would include any sequence addition, substitution, or deletion variant that maintains substantially at least one biological function of the polypeptides of this invention, for example, VPAC2 agonist activity, selective VPAC2 agonist activity, or insulin secreting activity demonstrated herein. These functional equivalents may include polypeptides which have at least about 90% identity, at least 95% identity, or at least 97% identity to the polypeptides of Figure 1a-d, and also include portions of such polypeptides having substantially the same biological activity. However, any polypeptide having insubstantial variation in amino acid sequence from the polypeptides of Figure 1a-d that demonstrates functional equivalency as described further herein is included in the description of the present invention.

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

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

[056] The polypeptides of this invention may be a product of chemical synthetic procedures and as such, an isolated or purified polypeptide of this invention, or biologically active portion thereof, may be substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. For example, an isolated polypeptide of this invention may have less than about 30% (by dry weight) of non-polypeptide, or contaminating, material. When a peptide of this invention is produced by chemical synthesis, the preparations may contain less than about 30% by dry weight of chemical precursors or non-invention chemicals.

[057] The polypeptides of this invention may be conveniently isolated as described in the specific examples below. A preparation of purified polypeptide is, for example, at least about 70% pure; or about 85% through about 99% pure. Purity of the preparations can be assessed by any

3A
33

means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectroscopy/liquid chromatography.

[058] Also provided are related peptides and compounds (e.g., small molecule) within the understanding of those with skill in the art, such as chemical mimetics, organomimetics, or peptidomimetics. As used herein, the terms "mimetic," "peptide mimetic," "peptidomimetic," "organomimetic," and "chemical mimetic" are intended to encompass peptide derivatives, peptide analogs, and chemical compounds having an arrangement of atoms in a three-dimensional orientation that is equivalent to that of a peptide of the present invention. It will be understood that the phrase "equivalent to" as used herein is intended to encompass peptides or compounds having substitution(s) of certain atoms, or chemical moieties in said peptide, having bond lengths, bond angles, and arrangements in the mimetic compound that produce the same or sufficiently similar arrangement or orientation of said atoms and moieties to have the biological function of the peptides of the invention. In the peptide mimetics of the invention, the three-dimensional arrangement of the chemical constituents is structurally and/or functionally equivalent to the three-dimensional arrangement of the peptide backbone and component amino acid sidechains in the peptide, resulting in such peptido-, organo-, and chemical mimetics of the peptides of the invention having substantial biological activity. These terms are used according to the understanding in the art, as illustrated, for example, by Fauchere, (Adv. Drug Res. 15:28, 1988); Veber & Freidinger, (TINS p.392, 1985); and Evans, et al., (J. Med. Chem. 30:1229, 1987), incorporated herein by reference.

[059] It is understood that a pharmacophore exists for the biological activity of each peptide of the invention. A pharmacophore is understood in the art as comprising an idealized, three-dimensional definition of the structural requirements for biological activity. Peptido-, organo-, and chemical mimetics may be designed to fit each pharmacophore with current computer modeling software (computer aided drug design). Said mimetics may be produced by structure-function analysis, based on the positional information from the substituent atoms in the peptides of the invention.

[060] Peptides as provided by the invention may be advantageously synthesized by any of the chemical synthesis techniques known in the art, particularly solid-phase synthesis techniques, for example, using commercially-available automated peptide synthesizers. The mimetics of the present invention may be synthesized by solid phase or solution phase methods conventionally used for the synthesis of peptides (see, e.g., Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54, 1963; Carpino, Acc. Chem. Res. 6:191-98, 1973; Bitt, Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis, Springer-Verlag: Heidelberg, 1978; The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vols. 1, 2, 3, and 5, (Gross & Meinhof, eds.), Academic Press: New York, 1979; Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, Ill., 1984; Kent, Ann. Rev. Biochem. 57:957-89, 1988; and Gregg, et al., Int. J. Peptide Protein Res. 55:161-214, 1990, which are incorporated herein by reference in their entirety).

75
34

[061] For example, solid phase methodology may be used. Briefly, an N-protected C-terminal amino acid residue is linked to an insoluble support such as divinylbenzene cross-linked polystyrene, polyacrylamide resin, Kieselguhr/polyamide (pepsyn K), controlled pore glass, cellulose, polypropylene membranes, acrylic acid-coated polyethylene rods, or the like. Cycles of deprotection, neutralization, and coupling of successive protected amino acid derivatives are used to link the amino acids from the C-terminus according to the amino acid sequence. For some synthetic peptides, an Fmoc strategy using an acid-sensitive resin may be used. Solid supports in this regard are divinylbenzene cross-linked polystyrene resins, which are commercially available in a variety of functionalized forms, including chloromethyl resin, hydroxymethyl resin, paraacetamidomethyl resin, benzhydrylamine (BHA) resin, 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin, octadecyl resin, 4-alkoxybenzyl alcohol resin (Wang resin), 4-(2',4'-dimethoxyphenyl aminomethyl)-phenoxy-methyl resin, 2,4-dimethoxybenzhydryl-amine resin, and 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-amino-methyl)-phenoxyacetamidonorleucyl-MBHA resin (Rink amide MBHA resin). In addition, acid-sensitive resins also provide C-terminal acids, if desired. A protecting group for alpha amino acids is base-labile 9-fluorenylmethoxy-carbonyl (Fmoc).

[062] Suitable protecting groups for the side chain functionalities of amino acids chemically compatible with BOC (t-butyloxycarbonyl) and Fmoc groups are well known in the art. When using Fmoc chemistry, the following protected amino acid derivatives are preferred: Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Ser(But), Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Thr(Trt), Fmoc-Val, Fmoc-Gly, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Glu(OBut), Fmoc-His(Trt), Fmoc-Tyr(But), Fmoc-Arg(PMC (2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)), Fmoc-Arg(BOC)₂, Fmoc-Pro, and Fmoc-Trp(BOC). The amino acid residues may be coupled by using a variety of coupling agents and chemistries known in the art, such as direct coupling with DIC (diisopropyl-carbodilimide), DCC (dicyclohexylcarbodiimide), BOP (benzotriazolyl-N-oxytrisdimethylaminophosphonium hexafluorophosphate), PyBOP (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate), PyBrOP (bromo-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate); via performed symmetrical anhydrides; via active esters such as pentafluorophenyl esters; or via performed HOBt (1-hydroxybenzotriazole) active esters or by using Fmoc-amino acid fluoride and chlorides or by using Fmoc-amino acid-N-carboxy anhydrides. Activation with HBTU (2-(1H-benzotriazole-1-yl), 1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) or HATU (2-(1H-7-aza-benzotriazole-1-yl), 1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluoro-phosphate) in the presence of HOBt or HOAt (7-azabenzotriazole) is preferred.

[063] The solid phase method may be carried out manually, although automated synthesis on a commercially available peptide synthesizer (e.g., Applied Biosystems 431A or the like; Applied Biosystems, Foster City, CA) may be used. In a typical synthesis, the first (C-terminal) amino acid is loaded on the chlorotriyl resin. Successive deprotection (with 20% piperidine/NMP (N-methylpyrrolidone)) and coupling cycles according to ABI FastMoc protocols (Applied Biosystems) may be used to generate the peptide sequence. Double and triple coupling, with capping by acetic anhydride, may also be used.

3/8
35

[084] The synthetic mimetic peptide may be cleaved from the resin and deprotected by treatment with TFA (trifluoroacetic acid) containing appropriate scavengers. Many such cleavage reagents, such as Reagent K (0.75 g crystalline phenol, 0.25 mL ethanedithiol, 0.5 mL thioanisole, 0.5 mL deionized water, 10 mL TFA) and others, may be used. The peptide may be separated from the resin by filtration and isolated by ether precipitation. Further purification may be achieved by conventional methods, such as gel filtration and reverse phase HPLC (high performance liquid chromatography). Synthetic mimetics according to the present invention may be in the form of pharmaceutically acceptable salts, especially base-addition salts including salts of organic bases and inorganic bases. The base-addition salts of the acidic amino acid residues may be prepared by treatment of the peptide with the appropriate base or inorganic base, according to procedures well known to those skilled in the art, or the desired salt may be obtained directly by lyophilization of the appropriate base.

[085] Generally, those skilled in the art will recognize that peptides as described herein may be modified by a variety of chemical techniques to produce peptides having essentially the same activity as the unmodified peptide, and optionally having other desirable properties. For example, carboxylic acid groups of the peptide may be provided in the form of a salt of a pharmaceutically-acceptable cation. Amino groups within the peptide may be in the form of a pharmaceutically-acceptable acid addition salt, such as the HCl, HBr, acetic, benzoic, toluene sulfonic, maleic, tartaric, and other organic salts, or may be converted to an amide. Thiols may be protected with any one of a number of well-recognized protecting groups, such as acetamide groups. Those skilled in the art will also recognize methods for introducing cyclic structures into the peptides of this invention so that the native binding configuration will be more nearly approximated. For example, a carboxyl terminal or amino terminal cysteine residue may be added to the peptide, so that when oxidized the peptide will contain a disulfide bond, thereby generating a cyclic peptide. Other peptide cyclizing methods include the formation of thioethers and carboxyl- and amino-terminal amides and esters.

[086] Specifically, a variety of techniques are available for constructing peptide derivatives and analogs with the same or similar desired biological activity as the corresponding peptide but with more favorable activity than the peptide with respect to solubility, stability, and susceptibility to hydrolysis and proteolysis. Such derivatives and analogs include peptides modified at the N-terminal amino group, the C-terminal carboxyl group, and/or changing one or more of the amide linkages in the peptide to a non-amide linkage. It will be understood that two or more such modifications may be coupled in one peptide mimetic structure (e.g., modification at the C-terminal carboxyl group and inclusion of a $-CH_2-$ carbamate linkage between two amino acids in the peptide).

[087] Amino terminus modifications include alkylating, acetylating, adding a carbobenzoyl group, and forming a succinimide group. Specifically, the N-terminal amino group may be reacted to form an amide group of the formula $RC(O)NH-$ where R is alkyl, for example, a lower alkyl, and is added by reaction with an acid halide, $RC(O)Cl$ or acid anhydride. Typically, the reaction can be

37
36

conducted by contacting about equimolar or excess amounts (e.g., about 5 equivalents) of an acid halide to the peptide in an inert diluent (e.g., dichloromethane) preferably containing an excess (e.g., about 10 equivalents) of a tertiary amine, such as diisopropylethylamine, to scavenge the acid generated during reaction. Reaction conditions are otherwise conventional (e.g., room temperature for 30 minutes). Alkylation of the terminal amino to provide for a lower alkyl N-substitution followed by reaction with an acid halide as described above will provide an N-alkyl amide group of the formula $RC(O)NR-$. Alternatively, the amino terminus may be covalently linked to succinimide group by reaction with succinic anhydride. An approximately equimolar amount or an excess of succinic anhydride (e.g., about 5 equivalents) is used and the terminal amino group is converted to the succinimide by methods well known in the art including the use of an excess (e.g., 10 equivalents) of a tertiary amine such as diisopropylethylamine in a suitable inert solvent (e.g., dichloromethane), as described in Wollenberg, et al., (U.S. Patent No. 4,612,132), and is incorporated herein by reference in its entirety. It will also be understood that the succinic group may be substituted with, for example, a C_2 through C_6 alkyl or $-SR$ substituents, which are prepared in a conventional manner to provide for substituted succinimide at the N-terminus of the peptide. Such alkyl substituents may be prepared by reaction of a lower olefin (C_2 through C_6 alkyl) with maleic anhydride in the manner described by Wollenberg, et al., *supra.*, and $-SR$ substituents may be prepared by reaction of RSH with maleic anhydride where R is as defined above. In another advantageous embodiment, the amino terminus may be derivatized to form a benzyloxycarbonyl- $NH-$ or a substituted benzyloxycarbonyl- $NH-$ group. This derivative may be produced by reaction with approximately an equivalent amount or an excess of benzyloxycarbonyl chloride (CBZ-Cl), or a substituted CBZ-Cl in a suitable inert diluent (e.g., dichloromethane), for example, containing a tertiary amine to scavenge the acid generated during the reaction. In yet another derivative, the N-terminus comprises a sulfonamide group by reaction with an equivalent amount or an excess (e.g., 5 equivalents) of $R-S(O)_2Cl$ in a suitable inert diluent (dichloromethane) to convert the terminal amine into a sulfonamide, where R is alkyl and preferably lower alkyl. For example, the inert diluent may contain excess tertiary amine (e.g., 10 equivalents) such as diisopropylethylamine, to scavenge the acid generated during reaction. Reaction conditions are otherwise conventional (e.g., room temperature for 30 minutes). Carbamate groups may be produced at the amino terminus by reaction with an equivalent amount or an excess (e.g., 5 equivalents) of $R-OC(O)Cl$ or $R-OC(O)OC_6H_4-p-NO_2$ in a suitable inert diluent (e.g., dichloromethane) to convert the terminal amine into a carbamate, where R is alkyl, preferably lower alkyl. For example, the inert diluent may contain an excess (e.g., about 10 equivalents) of a tertiary amine, such as diisopropylethylamine, to scavenge any acid generated during reaction. Reaction conditions are otherwise conventional (e.g., room temperature for 30 minutes). Urea groups may be formed at the amino terminus by reaction with an equivalent amount or an excess (e.g., 5 equivalents) of $R-N=C=O$ in a suitable inert diluent (e.g., dichloromethane) to convert the terminal amine into a urea (i.e., $RNHC(O)NH-$) group where R is as defined above. For example, the inert diluent may contain an excess (e.g., about 10

38
37

equivalents) of a tertiary amine, such as diisopropylethylamine. Reaction conditions are otherwise conventional (e.g., room temperature for about 30 minutes).

[068] In preparing peptide mimetics wherein the C-terminal carboxyl group may be replaced by an ester (e.g., $-C(O)OR$ where R is alkyl and preferably lower alkyl), resins used to prepare the peptide acids may be employed, and the side chain protected peptide may be cleaved with a base and the appropriate alcohol (e.g., methanol). Side chain protecting groups may be removed in the usual fashion by treatment with hydrogen fluoride to obtain the desired ester. In preparing peptide mimetics wherein the C-terminal carboxyl group is replaced by the amide $-C(O)NR_3R_4$, a benzhydrylamine resin is used as the solid support for peptide synthesis. Upon completion of the synthesis, hydrogen fluoride treatment to release the peptide from the support results directly in the free peptide amide (i.e., the C-terminus is $-C(O)NH_2$). Alternatively, use of the chloromethylated resin during peptide synthesis coupled with reaction with ammonia to cleave the side chain protected peptide from the support yields the free peptide amide, and reaction with an alkylamine or a dialkylamine yields a side chain protected alkylamide or dialkylamide (i.e., the C-terminus is $-C(O)NRR_1$, where R and R_1 are alkyl and preferably lower alkyl). Side chain protection is then removed in the usual fashion by treatment with hydrogen fluoride to give the free amides, alkylamides, or dialkylamides.

[069] In another alternative embodiment, the C-terminal carboxyl group or a C-terminal ester may be induced to cyclize by displacement of the $-OH$ or the ester ($-OR$) of the carboxyl group or ester, respectively, with the N-terminal amino group to form a cyclic peptide. For example, after synthesis and cleavage to give the peptide acid, the free acid is converted in solution to an activated ester by an appropriate carboxyl group activator such as dicyclohexylcarbodiimide (DCC), for example, in methylene chloride (CH_2Cl_2), dimethyl formamide (DMF), or mixtures thereof. The cyclic peptide is then formed by displacement of the activated ester with the N-terminal amine. Cyclization, rather than polymerization, may be enhanced by use of very dilute solutions according to methods well known in the art.

[070] Peptide mimetics as understood in the art and provided by the invention are structurally similar to the peptide of the invention, but have one or more peptide linkages optionally replaced by a linkage selected from the group consisting of: $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$ (in both *cis* and *trans* conformers), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, and $-CH_2SO-$, by methods known in the art and further described in the following references: Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, (Weinstein, ed.), Marcel Dekker: New York, p. 257, 1983; Spatola, Peptide Backbone Modifications 1:3, 1983; Morley, Trends Pharm. Sci. pp. 483-488, 1980; Hudson, et al., Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185, 1979; Spatola, et al., Life Sci. 38:1243-1249, 1986; Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 307-314, 1982; Almquist, et al., J. Med. Chem. 23:1392-1398, 1980; Jennings-White, et al., Tetrahedron Lett. 23:2533, 1982; Szalka, et al., EP045885A; Holladay, et al., Tetrahedron Lett. 24:4401-4404, 1983; and Hruby, Life Sci. 31:189-199, 1982; each of which is incorporated herein by reference. Such peptide mimetics may have significant advantages over polypeptide embodiments, including, for example, more economical to

31
38

produce, having greater chemical stability or enhanced pharmacological properties (such as half-life, absorption, potency, efficacy, etc.), reduced antigenicity, and other properties.

[071] Mimetic analogs of the peptides of the invention may also be obtained using the principles of conventional or rational drug design (see, e.g., Andrews, et al., Proc. Alfred Benzon Symp. 28:145-165, 1990; McPherson, Eur. J. Biochem. 189:1-24, 1990; Hol, et al., in Molecular Recognition: Chemical and Biochemical Problems, (Roberts, ed.); Royal Society of Chemistry; pp. 84-93, 1989a; Hol, Arzneim-Forsch. 39:1016-1018, 1989b; Hol, Agnew Chem. Int. Ed. Engl. 25:767-778, 1986; the disclosures of which are herein incorporated by reference).

[072] In accordance with the methods of conventional drug design, the desired mimetic molecules may be obtained by randomly testing molecules whose structures have an attribute in common with the structure of a "native" peptide. The quantitative contribution that results from a change in a particular group of a binding molecule may be determined by measuring the biological activity of the putative mimetic in comparison with the activity of the peptide. In one embodiment of rational drug design, the mimetic is designed to share an attribute of the most stable three-dimensional conformation of the peptide. Thus, for example, the mimetic may be designed to possess chemical groups that are oriented in a way sufficient to cause ionic, hydrophobic, or van der Waals interactions that are similar to those exhibited by the peptides of the invention, as disclosed herein.

[073] One method for performing rational mimetic design employs a computer system capable of forming a representation of the three-dimensional structure of the peptide, such as those exemplified by Hol, 1989a; Hol, 1989b; and Hol, 1986. Molecular structures of the peptide-, organo-, and chemical mimetics of the peptides of the invention may be produced using computer-assisted design programs commercially available in the art. Examples of such programs include SYBYL 6.5®, HQSAR™, and ALCHEMY 2000™ (Tripos); GALAXY™ and AM2000™ (AM Technologies, Inc., San Antonio, TX); CATALYST™ and CERIUS™ (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA); CACHE PRODUCTS™, TSAR™, AMBER™, and CHEM-X™ (Oxford Molecular Products, Oxford, CA) and CHEMBUILDER3D™ (Interactive Simulations, Inc., San Diego, CA).

[074] The peptide-, organo-, and chemical mimetics produced using the peptides disclosed herein using, for example, art-recognized molecular modeling programs may be produced using conventional chemical synthetic techniques, and designed to accommodate high throughput screening, including combinatorial chemistry methods. Combinatorial methods useful in the production of the peptide-, organo-, and chemical mimetics of the invention include solid-phase synthesis and combinatorial chemistry arrays, as provided, for example, by SIDDCO (Tucson, Arizona); Tripos, Inc.; Calbiochem/Novabiochem (San Diego, CA); Symyx Technologies, Inc. (Santa Clara, CA); Medichem Research, Inc. (Lamont, IL); Pharm-Eco Laboratories, Inc. (Bethlehem, PA); or N.V. Organon (Oss, Netherlands). Combinatorial chemistry production of the peptide-, organo-, and chemical mimetics of the invention may be produced according to methods known in the art, including, but not limited to, techniques disclosed in Terrett, (Combinatorial

40
39

Chemistry, Oxford University Press, London, 1998); Gallop, et al., J. Med. Chem. 37:1233-51, 1994; Gordon, et al., J. Med. Chem. 37:1385-1401, 1994; Look, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 6:707-12, 1996; Ruhland, et al., J. Amer. Chem. Soc. 118: 253-4, 1996; Gordon, et al., Acc. Chem. Res. 29:144-54, 1996; Thompson & Ellman, Chem. Rev. 98:555-600, 1998; Fruchtel & Jung, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:17-42, 1996; Pavia, "The Chemical Generation of Molecular Diversity", Network Science Center, www.netsci.org, 1995; Adnan, et al., "Solid Support Combinatorial Chemistry in Lead Discovery and SAR Optimization," Id., 1995; Davies and Briant, "Combinatorial Chemistry Library Design using Pharmacophore Diversity," Id., 1995; Pavia, "Chemically Generated Screening Libraries: Present and Future," Id., 1996; and U.S. Patents, Nos. 5,880,972; 5,463,564; 5,331,573; and 5,573,905.

[076] The newly synthesized polypeptides may be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (see, e.g., Creighton, Proteins: Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The composition of a synthetic polypeptide of the present invention may be confirmed by amino acid analysis or sequencing by, for example, the Edman degradation procedure (Creighton, *supra*). Additionally, any portion of the amino acid sequence of the polypeptide may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a fusion polypeptide.

[076] Also included in this invention are antibodies and antibody fragments that selectively bind the polypeptides of this invention. Any type of antibody known in the art may be generated using methods well known in the art. For example, an antibody may be generated to bind specifically to an epitope of a polypeptide of this invention. "Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv, which are capable of binding an epitope of a polypeptide of this invention. Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. However, epitopes which involve non-contiguous amino acids may require more amino acids, for example, at least 15, 25, or 50 amino acids.

[077] An antibody which specifically binds to an epitope of a polypeptide of this invention may be used therapeutically, as well as in immunochemical assays, such as Western blots, ELISAs, radioimmunoassays, immunohistochemical assays, immunoprecipitations, or other immunochemical assays known in the art. Various immunoassays may be used to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between an immunogen and an antibody which specifically binds to the immunogen.

[078] Typically, an antibody which specifically binds to a polypeptide of this invention provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20-fold higher than a detection signal provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies which specifically bind to

45
40

a polypeptide of this invention do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate a polypeptide of this invention from solution.

[078] Polypeptides of this invention, or fragments thereof, may be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human, to produce polyclonal antibodies. If desired, a polypeptide of this invention or a fragment thereof may be conjugated to a carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g., lysolécithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (bacilli Calmette-Guérin) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

[080] Monoclonal antibodies which specifically bind to a polypeptide of this invention or a fragment thereof may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B cell hybridoma technique, and the EBV hybridoma technique (Kohler, et al., *Nature* 258:495-97, 1985; Kozbor, et al., *J. Immunol. Methods* 81:3142, 1985; Cote, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2028-30, 1983; Cole, et al., *Mol. Cell Biol.* 82:108-20, 1984).

[081] In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, may be used (Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55, 1984; Neuberger, et al., *Nature* 312:604-08, 1984; Takeda, et al., *Nature* 314:452-54, 1985). Monoclonal and other antibodies also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly in therapy or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences may be minimized by replacing residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual residues or by grafting of entire complementarity determining regions. Alternatively, humanized antibodies may be produced using recombinant methods (see, e.g., GB2188638B). Antibodies which specifically bind to a polypeptide of this invention may contain antigen binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. Patent No. 5,585,332.

[082] Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies may be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies which specifically bind to a polypeptide of this invention. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotype composition, can be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:11120-23, 1991).

42
41

[083] Single-chain antibodies also may be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion, et al., *Eur. J. Cancer Prev.* 5:507-11, 1996). Single-chain antibodies can be mono- or bi-specific, and can be bivalent or tetravalent. Construction of tetravalent, bi-specific single-chain antibodies is described, for example, in Coloma & Morrison (*Nat. Biotechnol.* 15:159-63, 1997). Construction of bivalent, bispecific single-chain antibodies is described in Mallender & Voss (*J. Biol. Chem.* 269:199-206, 1994).

[084] A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody may be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence, as described below. Alternatively, single-chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage technology (Verhaar, et al., *Int. J. Cancer* 61:497-501, 1995; Nicholls, et al., *J. Immunol. Meth.* 165:81-91, 1993).

[085] Antibodies which specifically bind to a polypeptide of this invention may also be produced by inducing in vivo production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:3833-37, 1989; Winter, et al., *Nature* 349:293-99, 1991).

[086] Other types of antibodies may be constructed and used therapeutically in methods of the invention. For example, chimeric antibodies may be constructed as disclosed in WO 93/03151. Binding proteins which are derived from immunoglobulins and which are multivalent and multi-specific, such as the "diabodies" also can be prepared (see, e.g., WO 94/13804).

[087] Human antibodies with the ability to bind to the polypeptides of this invention may also be identified from the MorphoSys HuCAL[®] library as follows. A polypeptide of this invention may be coated on a microtiter plate and incubated with the MorphoSys HuCAL[®] Fab phage library. Those phage-linked Fabs not binding to the polypeptide of this invention can be washed away from the plate, leaving only phage which tightly bind to the polypeptide of this invention. The bound phage can be eluted, for example, by a change in pH or by elution with E. coli and amplified by infection of E. coli hosts. This panning process can be repeated once or twice to enrich for a population of antibodies that tightly bind to the polypeptide of this invention. The Fabs from the enriched pool are then expressed, purified, and screened in an ELISA assay.

[088] Antibodies according to the invention may be purified by methods well known in the art. For example, antibodies may be affinity purified by passage over a column to which a polypeptide of this invention is bound. The bound antibodies can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

[089] As used herein, various terms are defined below.

[090] When introducing elements of the present invention or the preferred embodiment(s) thereof, the articles "a," "an," "the," and "said" are intended to mean that there are one or more of

43
42

the elements. The terms "comprising," "including," and "having" are intended to be inclusive and mean that there may be additional elements other than the listed elements.

[091] The term "subject" as used herein includes mammals (e.g., humans and animals).

[092] The term "treatment" includes any process, action, application, therapy, or the like, wherein a subject, including a human being, is provided medical aid with the object of improving the subject's condition, directly or indirectly, or slowing the progression of a condition or disorder in the subject.

[093] The term "combination therapy" or "co-therapy" means the administration of two or more therapeutic agents to treat a condition and/or disorder. Such administration encompasses co-administration of two or more therapeutic agents in a substantially simultaneous manner, such as in a single capsule having a fixed ratio of active ingredients or in multiple, separate capsules for each inhibitor agent. In addition, such administration encompasses use of each type of therapeutic agent in a sequential manner.

[094] The phrase "therapeutically effective" means the amount of each agent administered that will achieve the goal of improvement in a diabetic condition or disorder severity, while avoiding or minimizing adverse side effects associated with the given therapeutic treatment.

[095] The term "pharmaceutically acceptable" means that the subject item is appropriate for use in a pharmaceutical product.

[096] The polypeptides of the present invention, as a result of the ability to stimulate insulin secretion from pancreatic islet cells in vitro, and by causing a decrease in blood glucose in vivo, may be employed in treatment diabetes, including type 2 diabetes (non-insulin dependent diabetes mellitus). Such treatment may also delay the onset of diabetes and diabetic complications. The polypeptides may be used to prevent subjects with impaired glucose tolerance from proceeding to develop type 2 diabetes. Other diseases and conditions that may be treated or prevented using peptides of the invention in methods of the invention include: Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) (Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994); Latent Autoimmune Diabetes Adult (LADA) (Zimmet, et al., Diabetes Med. 11:289, 1994); impaired glucose tolerance (IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999); impaired fasting glucose (IFG) (Charles, et al., Diabetes 40:798, 1991); gestational diabetes (Metzger, Diabetes, 40:197, 1991); and metabolic syndrome X.

[097] The polypeptides of the present invention may also be effective in such disorders as obesity, and in the treatment of atherosclerotic disease, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, low HDL levels, hypertension, cardiovascular disease (including atherosclerosis, coronary heart disease, coronary artery disease, and hypertension), cerebrovascular disease and peripheral vessel disease; and for the treatment of lupus, polycystic ovary syndrome, carcinogenesis, and hyperplasia, asthma, male reproduction problems, ulcers, sleep disorders, disorders of lipid and carbohydrate metabolism, circadian dysfunction, growth disorders, disorders of energy

94
43

homeostasis, immune diseases including autoimmune diseases (e.g., systemic lupus erythematosus), as well as acute and chronic inflammatory diseases, and septic shock.

[098] The polypeptides of the present invention may also be useful for treating physiological disorders related to, for example, cell differentiation to produce lipid accumulating cells, regulation of insulin sensitivity and blood glucose levels, which are involved in, for example, abnormal pancreatic β -cell function, insulin secreting tumors and/or autoimmune hypoglycemia due to autoantibodies to insulin, autoantibodies to the insulin receptor, or autoantibodies that are stimulatory to pancreatic β -cells), macrophage differentiation which leads to the formation of atherosclerotic plaques, inflammatory response, carcinogenesis, hyperplasia, adipocyte gene expression, adipocyte differentiation, reduction in the pancreatic β -cell mass, insulin secretion, tissue sensitivity to insulin, liposarcoma cell growth, polycystic ovarian disease, chronic anovulation, hyperandrogenism, progesterone production, steroidogenesis, redox potential and oxidative stress in cells, nitric oxide synthase (NOS) production, increased gamma glutamyl transpeptidase, catalase, plasma triglycerides, HDL, and LDL cholesterol levels, and the like.

[099] The polypeptides of the invention may also be used in methods of the invention to treat secondary causes of diabetes (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999). Such secondary causes include glucocorticoid excess, growth hormone excess, pheochromocytoma, and drug-induced diabetes. Drugs that may induce diabetes include, but are not limited to, pyriminil, nicotinic acid, glucocorticoids, phenytoin, thyroid hormone, β -adrenergic agents, α -interferon and drugs used to treat HIV infection.

[100] In addition, the polypeptides of the invention may be used for treatment of asthma (Bolin, et al., Biopolymer 37:57-66, 1995; U.S. Patent No. 5,677,418; showing that polypeptide R3P0 is active in relaxing guinea pig tracheal smooth muscle); hypotension induction (VIP induces hypotension, tachycardia, and facial flushing in asthmatic patients (Morice, et al., Peptides 7:279-280, 1986; Morice, et al., Lancet 2:1225-1227, 1983); male reproduction problems (Slow, et al., Arch. Androl. 43(1):67-71, 1999); as an anti-apoptosis/neuroprotective agent (Brenneman, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:207-12, 1998); cardioprotection during ischemic events (Kalfin, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1288(2):952-8, 1994; Das, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:287-308, 1998), manipulation of the circadian clock and its associated disorders (Hamar, et al., Cell 109:497-508, 2002; Shan, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97:11575-80, 2000), and finally as an anti-ulcer agent (Tuncel, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:309-22, 1998).

[101] The polypeptides of the present invention may be used alone or in combination with additional therapies and/or compounds known to those skilled in the art in the treatment of diabetes and related disorders. Alternatively, the methods and polypeptides described herein may be used, partially or completely, in combination therapy.

[102] The polypeptides of the invention may also be administered in combination with other known therapies for the treatment of diabetes, including PPAR agonists, sulfonylurea drugs, non-sulfonylurea secretagogues, α -glucosidase inhibitors, insulin sensitizers, insulin secretagogues,

45
44

hepatic glucose output lowering compounds, insulin and anti-obesity drugs. Such therapies may be administered prior to, concurrently with or following administration of the polypeptides of the invention. Insulin includes both long and short acting forms and formulations of insulin. PPAR agonist may include agonists of any of the PPAR subunits or combinations thereof. For example, PPAR agonist may include agonists of PPAR- α , PPAR- γ , PPAR- δ or any combination of two or three of the subunits of PPAR. PPAR agonists include, for example, rosiglitazone, troglitazone, and pioglitazone. Sulfonylurea drugs include, for example, glyburide, glimepiride, chlorpropamide, tolbutamide, and glipizide. α -glucosidase inhibitors that may be useful in treating diabetes when administered with a polypeptide of the invention include Precose®, Miglitol®, and Voglibose™. Insulin sensitizers that may be useful in treating diabetes include PPAR- γ agonists such as the glitazones (e.g., troglitazone, pioglitazone, englitazone, MCC-555, rosiglitazone, and the like); biguanides such as metformin and phenformin; protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) inhibitors; dipeptidyl peptidase IV (DP-IV) inhibitors; and thiazolidinediones and non-thiazolidinediones. Hepatic glucose output lowering compounds that may be useful in treating diabetes when administered with a polypeptide of the invention include metformin, such as Glucophage® and Glucophage XR®. Insulin secretagogues that may be useful in treating diabetes when administered with a polypeptide of the invention include sulfonylurea and non-sulfonylurea drugs: GLP-1, GIP, secretin, nateglinide, meglitinide, repaglinide, glibendamide, glimepiride, chlorpropamide, glipizide. GLP-1 includes derivatives of GLP-1 with longer half-lives than native GLP-1, such as, for example, fatty-acid derivatized GLP-1 and exendin. In one embodiment of the invention, polypeptides of the invention are used in combination with insulin secretagogues to increase the sensitivity of pancreatic β -cells to the insulin secretagogue.

[103] Polypeptides of the invention may also be used in methods of the invention in combination with anti-obesity drugs. Anti-obesity drugs include β -3 agonists; CB-1 antagonists; neuropeptide Y inhibitors; appetite suppressants, such as, for example, sibutramine (Meridia®, Abbott Laboratories); and lipase inhibitors, such as, for example, orlistat (Xenical®, Roche Pharmaceuticals).

[104] Polypeptides of the invention may also be used in methods of the invention in combination with drugs commonly used to treat lipid disorders in diabetic patients. Such drugs include, but are not limited to, HMG-CoA reductase inhibitors, nicotinic acid, lipid lowering drugs (e.g., statin esters, sterol glycosides such as tiqueside, and azetidinones such as ezetimibe), ACAT inhibitors (such as avasimibe), bile acid sequestrants, bile acid reuptake inhibitors, microsomal triglyceride transport inhibitors, and fibric acid derivatives. HMG-CoA reductase inhibitors include, for example, lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, rivastatin, itavastatin, cerivastatin, and ZD-4522. Fibric acid derivatives include, for example, clofibrate, fenofibrate, bezafibrate, ciprofibrate, bezclofibrate, etofibrate, and gemfibrozil. Sequestrants include, for example, cholestyramine, colestipol, and dialkylaminoalkyl derivatives of a cross-linked dextran.

46
45

[105] Polypeptides of the invention may also be used in combination with anti-hypertensive drugs, such as, for example, β -blockers and ACE inhibitors. Examples of additional anti-hypertensive agents for use in combination with the polypeptides of the present invention include calcium channel blockers (L-type and T-type; e.g., diltiazem, verapamil, nifedipine, amlodipine and flunarizine), diuretics (e.g., chlorothiazide, hydrochlorothiazide, furosemide, bumetanide, triamterene, acetazolamide, methychlorothiazide, trichloromethiazide, polythiazide, benzthiazide, ethacrynic acid, triarylsulfonamide, chlorthalidone, furosemide, bumetanide, triamterene, amiloride, spironolactone), renin inhibitors, ACE inhibitors (e.g., captopril, zofenopril, fosinopril, enalapril, ceranopril, cilazapril, delapril, pentopril, quinopril, ramipril, lisinopril), AT-1 receptor antagonists (e.g., losartan, irbesartan, valsartan), ET receptor antagonists (e.g., sitaxsentan, bosentan, neutral endopeptidase (NEP) inhibitors, vasopressin receptor antagonists (dual NEP-ACE inhibitors) (e.g., omapatrilat and zileuton), and nitrates.

[106] Such co-therapies may be administered in any combination of two or more drugs (e.g., a polypeptide of the invention in combination with an insulin sensitizer and an anti-obesity drug). Such co-therapies may be administered in the form of pharmaceutical compositions, as described above.

[107] Based on well known assays used to determine the efficacy for treatment of conditions identified above in mammals, and by comparison of these results with the results of known medicaments that are used to treat these conditions, the effective dosage of the polypeptides of this invention can readily be determined for treatment of each desired indication. The amount of the active ingredient (e.g., polypeptides) to be administered in the treatment of one of these conditions can vary widely according to such considerations as the particular polypeptide and dosage unit employed, the mode of administration, the period of treatment, the age and sex of the patient treated, and the nature and extent of the condition treated.

[108] The total amount of the active ingredient to be administered may generally range from about 0.00001 mg/kg to about 1 mg/kg, and preferably from about 0.0001 mg/kg to about 0.1 mg/kg body weight per day. A unit dosage may contain from about 0.01 mg to about 20 mg of active ingredient, and may be administered one or more times per week. The weekly dosage for administration by injection, including intravenous, intramuscular, subcutaneous, and parenteral injections, and use of infusion techniques may be from about 0.0001 to about 0.1 mg/kg. The daily rectal dosage regimen may be from 0.001 to 1 mg/kg of total body weight. The transdermal concentration may be that required to maintain a daily dose of from 0.001 to 1 mg/kg.

[109] Of course, the specific initial and continuing dosage regimen for each patient will vary according to the nature and severity of the condition as determined by the attending diagnostician, the activity of the specific polypeptide employed, the age of the patient, the diet of the patient, time of administration, route of administration, rate of excretion of the drug, drug combinations, and the like. The desired mode of treatment and number of doses of a polypeptide of the present invention may be ascertained by those skilled in the art using conventional treatment tests.

47
46

[110] The polypeptides of this invention may be utilized to achieve the desired pharmacological effect by administration to a patient in need thereof in an appropriately formulated pharmaceutical composition. A patient, for the purpose of this invention, is a mammal, including a human, in need of treatment for a particular condition or disease. Therefore, the present invention includes pharmaceutical compositions which are comprised of a pharmaceutically acceptable carrier and a therapeutically effective amount of a polypeptide. A pharmaceutically acceptable carrier is any carrier which is relatively non-toxic and innocuous to a patient at concentrations consistent with effective activity of the active ingredient so that any side effects ascribable to the carrier do not vitiate the beneficial effects of the active ingredient. A therapeutically effective amount of a polypeptide is that amount which produces a result or exerts an influence on the particular condition being treated. The polypeptides described herein may be administered with a pharmaceutically-acceptable carrier using any effective conventional dosage unit forms, including, for example, immediate and timed release preparations, orally, parenterally, topically, or the like.

[111] The polypeptides of this invention may be administered parenterally, that is, intravenously, intramuscularly, intraperitoneally, or, preferably, subcutaneously, as injectable dosages of the polypeptide in a physiologically acceptable diluent with a pharmaceutical carrier which may be a sterile liquid or mixture of liquids such as water, saline, aqueous dextrose and related sugar solutions; an alcohol such as ethanol, isopropanol, or hexadecyl alcohol; glycols such as propylene glycol or polyethylene glycol; glycerol ketals such as 2,2-dimethyl-1,1-dioxolane-4-methanol, ethers such as poly(ethyleneglycol) 400; an oil; a fatty acid; a fatty acid ester or glyceride; or an acetylated fatty acid glyceride with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant such as a soap or a detergent, suspending agent such as pectin, carbomers, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, or carboxymethylcellulose, or emulsifying agent and other pharmaceutical adjuvants.

[112] Illustrative of oils which can be used in the parenteral formulations of this invention are those of petroleum, animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, sesame oil, cottonseed oil, corn oil, olive oil, petrolatum, and mineral oil. Suitable fatty acids include oleic acid, stearic acid, and lauric acid. Suitable fatty acid esters are, for example, ethyl oleate and isopropyl myristate. Suitable soaps include fatty alkali metal, ammonium, and triethanolamine salts and suitable detergents include cationic detergents, for example, dimethyl dialkyl ammonium halides, alkyl pyridinium halides, and alkylamine acetates; anionic detergents, for example, alkyl, aryl, and olefin sulfonates, alkyl, olefin, ether, and monoglyceride sulfates, and sulfosuccinates; nonionic detergents, for example, fatty amine oxides, fatty acid alkanolamides, and polyoxyethylenepolypropylene copolymers; and amphoteric detergents, for example, alkyl-beta-aminopropionates, and 2-alkylimidazoline quaternary ammonium salts, as well as mixtures.

[113] The parenteral compositions of this invention may typically contain from about 0.5% to about 25% by weight of the active ingredient in solution. Preservatives and buffers may also be used advantageously. In order to minimize or eliminate irritation at the site of injection, such compositions may contain a non-ionic surfactant having a hydrophile-lipophile balance (HLB) of

48
47

from about 12 to about 17. The quantity of surfactant in such formulation ranges from about 5% to about 15% by weight. The surfactant can be a single component having the above HLB or can be a mixture of two or more components having the desired HLB.

[114] Illustrative of surfactants used in parenteral formulations are the class of polyethylene sorbitan fatty acid esters, for example, sorbitan monooleate and the high molecular weight adducts of ethylene oxide with a hydrophobic base, formed by the condensation of propylene oxide with propylene glycol.

[115] The pharmaceutical compositions may be in the form of sterile injectable aqueous suspensions. Such suspensions may be formulated according to known methods using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents such as, for example, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents which may be a naturally occurring phosphatide such as lecithin, a condensation product of an alkylene oxide with a fatty acid, for example, polyoxyethylene stearate, a condensation product of ethylene oxide with a long chain aliphatic alcohol, for example, heptadecaethyleneoxycetanol, a condensation product of ethylene oxide with a partial ester derived from a fatty acid and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or a condensation product of an ethylene oxide with a partial ester derived from a fatty acid and a hexitol anhydride, for example polyoxyethylene sorbitan monooleate.

[116] The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally acceptable diluent or solvent. Diluents and solvents that may be employed are, for example, water, Ringer's solution, and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile fixed oils are conventionally employed as solvents or suspending media. For this purpose, any bland, fixed oil may be employed including synthetic mono or diglycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid may be used in the preparation of injectables.

[117] A composition of the invention may also be administered in the form of suppositories for rectal administration of the drug. These compositions may be prepared by mixing the drug (e.g., polypeptide) with a suitable non-irritation excipient which is solid at ordinary temperatures but liquid at the rectal temperature and will therefore melt in the rectum to release the drug. Such material are, for example, cocoa butter and polyethylene glycol.

[118] Another formulation employed in the methods of the present invention employs transdermal delivery devices ("patches"). Such transdermal patches may be used to provide continuous or discontinuous infusion of the polypeptides of the present invention in controlled amounts. The construction and use of transdermal patches for the delivery of pharmaceutical agents is well known in the art (see, e.g., U.S. Patent No. 5,023,252, incorporated herein by reference). Such patches may be constructed for continuous, pulsatile, or on demand delivery of pharmaceutical agents.

4x
4B

[119] It may be desirable or necessary to introduce the pharmaceutical composition to the patient via a mechanical delivery device. The construction and use of mechanical delivery devices for the delivery of pharmaceutical agents is well known in the art. For example, direct techniques for administering a drug directly to the brain usually involve placement of a drug delivery catheter into the patient's ventricular system to bypass the blood-brain barrier. One such implantable delivery system, used for the transport of agents to specific anatomical regions of the body, is described in U.S. Patent No. 5,011,472, incorporated herein by reference.

[120] The compositions of the invention may also contain other conventional pharmaceutically acceptable compounding ingredients, generally referred to as carriers or diluents, as necessary or desired. Any of the compositions of this invention may be preserved by the addition of an antioxidant such as ascorbic acid or by other suitable preservatives. Conventional procedures for preparing such compositions in appropriate dosage forms can be utilized.

[121] Commonly used pharmaceutical ingredients which may be used as appropriate to formulate the composition for its intended route of administration include: acidifying agents, for example, but are not limited to, acetic acid, citric acid, fumaric acid, hydrochloric acid, nitric acid; and alkalizing agents such as, but are not limited to, ammonia solution, ammonium carbonate, diethanolamine, monoethanolamine, potassium hydroxide, sodium borate, sodium carbonate, sodium hydroxide, triethanolamine, triamine.

[122] Other pharmaceutical ingredients include, for example, but are not limited to, adsorbents (e.g., powdered cellulose and activated charcoal); aerosol propellants (e.g., carbon dioxide, CCl_2F_2 , $\text{F}_2\text{CIC-CClF}_2$ and CClF_3); air displacement agents (e.g., nitrogen and argon); antifungal preservatives (e.g., benzoic acid, butylparaben, ethylparaben, methylparaben, propylparaben, sodium benzoate); antimicrobial preservatives (e.g., benzalkonium chloride, benzethonium chloride, benzyl alcohol, cetylpyridinium chloride, chlorobutanol, phenol, phenylethyl alcohol, phenylmercuric nitrate and thimerosal); antioxidants (e.g., ascorbic acid, ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, hypophosphorus acid, monothioglycerol, propyl gallate, sodium ascorbate, sodium bisulfite, sodium formaldehyde sulfoxylate, sodium metabisulfite); binding materials (e.g., block polymers, natural and synthetic rubber, polyacrylates, polyurethanes, silicones and styrene-butadiene copolymers); buffering agents (e.g., potassium metaphosphate, potassium phosphate monobasic, sodium acetate, sodium citrate anhydrous and sodium citrate dihydrate); carrying agents (e.g., acacia syrup, aromatic syrup, aromatic elixir, cherry syrup, cocoa syrup, orange syrup, syrup, corn oil, mineral oil, peanut oil, sesame oil, bacteriostatic sodium chloride injection and bacteriostatic water for injection); chelating agents (e.g., edetate disodium and edetic acid); colorants (e.g., FD&C Red No. 3, FD&C Red No. 20, FD&C Yellow No. 6, FD&C Blue No. 2, D&C Green No. 5, D&C Orange No. 5, D&C Red No. 8, caramel and ferric oxide red); clarifying agents (e.g., bentonite); emulsifying agents (but are not limited to, acacia, cetomacrogol, cetyl alcohol, glyceryl monostearate, lecithin, sorbitan monooleate, polyethylene 50 stearate); encapsulating agents (e.g., gelatin and cellulose acetate phthalate); flavorants (e.g., anise oil, cinnamon oil, cocoa, menthol, orange oil, peppermint oil and

50
49

vanillin); humectants (e.g., glycerin, propylene glycol and sorbitol); levigating agents (e.g., mineral oil and glycerin); oils (e.g., arachis oil, mineral oil, olive oil, peanut oil, sesame oil and vegetable oil); ointment bases (e.g., lanolin, hydrophilic ointment, polyethylene glycol ointment, petrolatum, hydrophilic petrolatum, white ointment, yellow ointment, and rose water ointment); penetration enhancers (transdermal delivery) (e.g., monohydroxy or polyhydroxy alcohols, saturated or unsaturated fatty alcohols, saturated or unsaturated fatty esters, saturated or unsaturated dicarboxylic acids, essential oils, phosphatidyl derivatives, cephalin, terpenes, amides, ethers, ketones and ureas); plasticizers (e.g., diethyl phthalate and glycerin); solvents (e.g., alcohol, corn oil, cottonseed oil, glycerin, isopropyl alcohol, mineral oil, oleic acid, peanut oil, purified water, water for injection, sterile water for injection and sterile water for irrigation); stiffening agents (e.g., cetyl alcohol, cetyl esters wax, microcrystalline wax, paraffin, stearyl alcohol, white wax and yellow wax); suppository bases (e.g., cocoa butter and polyethylene glycols (mbdurea)); surfactants (e.g., benzalkonium chloride, nonoxynol 10, octoxynol 9, polysorbate 80, sodium lauryl sulfate and sorbitan monopalmitate); suspending agents (e.g., agar, bentonite, carbomers, carboxymethylcellulose sodium, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, kaolin, methylcellulose, tragacanth and veegum); sweetening e.g., aspartame, dextrose, glycerin, mannitol, propylene glycol, saccharin sodium, sorbitol and sucrose); tablet anti-adherents (e.g., magnesium stearate and talc); tablet binders (e.g., acacia, alginate acid, carboxymethylcellulose sodium, compressible sugar, ethylcellulose, gelatin, liquid glucose, methylcellulose, povidone and pregelatinized starch); tablet and capsule diluents (e.g., dibasic calcium phosphate, kaolin, lactose, mannitol, microcrystalline cellulose, powdered cellulose, precipitated calcium carbonate, sodium carbonate, sodium phosphate, sorbitol and starch); tablet coating agents (e.g., liquid glucose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, methylcellulose, ethylcellulose, cellulose acetate phthalate and shellac); tablet direct compression excipients (e.g., dibasic calcium phosphate); tablet disintegrants (e.g., alginate acid, carboxymethylcellulose calcium, microcrystalline cellulose, polacrillin potassium, sodium alginate, sodium starch glycolate and starch); tablet glidants (e.g., colloidal silica, corn starch and talc); tablet lubricants (e.g., calcium stearate, magnesium stearate, mineral oil, stearic acid and zinc stearate); tablet/capsule opaquants (e.g., titanium dioxide); tablet polishing agents (e.g., caruba wax and white wax); thickening agents (e.g., beeswax, cetyl alcohol and paraffin); tonicity agents (e.g., dextrose and sodium chloride); viscosity increasing agents (e.g., alginate acid, bentonite, carbomers, carboxymethylcellulose sodium, methylcellulose, povidone, sodium alginate and tragacanth); and wetting agents (e.g., heptadecethylenes oxycetanol, lecithine, polyethylene sorbitol monooleate, polyoxyethylene sorbitol monooleate, and polyoxyethylene stearate).

[123] The polypeptides described herein may be administered as the sole pharmaceutical agent or in combination with one or more other pharmaceutical agents where the combination causes no unacceptable adverse effects. For example, the polypeptides of this invention can be combined with known anti-obesity, or with known anti-diabetic or other indication agents, and the like, as well as with admixtures and combinations thereof.

850

[124] The polypeptides described herein may also be utilized, in free base form or in compositions, in research and diagnostics, or as analytical reference standards, and the like. Therefore, the present invention includes compositions which are comprised of an inert carrier and an effective amount of a polypeptide identified by the methods described herein, or a salt or ester thereof. An inert carrier is any material which does not interact with the polypeptide to be carried and which lends support, means of conveyance, bulk, traceable material, and the like to the polypeptide to be carried. An effective amount of polypeptide is that amount which produces a result or exerts an influence on the particular procedure being performed.

[125] Polypeptides are known to undergo hydrolysis, deamidation, oxidation, racemization and isomerization in aqueous and non-aqueous environment. Degradation such as hydrolysis, deamidation or oxidation can readily be detected by capillary electrophoresis, mass spectrometry, or Edman degradation. Enzymatic degradation notwithstanding, polypeptides having a prolonged plasma half-life, or biological resident time, should, at minimum, be stable in aqueous solution. It is essential that polypeptide exhibits less than 10% degradation over a period of one day at body temperature. It is still more preferable that the polypeptide exhibits less than 5% degradation over a period of one day at body temperature. Because of the life time treatment in chronic diabetic patient, much preferably these therapeutic agents are convenient to administer, furthermore infrequently if by parenteral route. Stability (i.e., less than a few percent of degradation) over a period of weeks at body temperature will allow less frequent dosing. Stability (i.e., less than a few percent of degradation) to degradation through proteolysis, as to DPP4 or in plasma over periods of days to weeks will further support less frequent dosing. Stability in the magnitude of years at refrigeration temperature will allow the manufacturer to present a liquid formulation, thus avoid the inconvenience of reconstitution. Additionally, stability in organic solvent would provide polypeptide be formulated into novel dosage forms such as implant.

[126] Formulations suitable for subcutaneous, intravenous, intramuscular, and the like; suitable pharmaceutical carriers; and techniques for formulation and administration may be prepared by any of the methods well known in the art (see, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 20th edition, 2000).

[127] It should be apparent to one of ordinary skill in the art that changes and modifications can be made to this invention without departing from the spirit or scope of the invention as it is set forth herein.

52
51

EXAMPLES

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

Example 1. Peptide Synthesis Methodology

[129] The following general procedure was followed to synthesize some of the polypeptides of the invention:

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

Example 2. Peptide Acetylation

[130] Peptides were synthesized by standard methods well known in the art. Peptides were synthesized with an Applied Biosystems 430A peptide synthesizer using Fmoc chemistry with HBTU activation on Rink amide resin and the N-terminus was acetylated with acetic anhydride. The peptide was cleaved with 84.8% TFA, 4.4% phenol, 4.4% water, 4.4% thioanisole, and 2.2% ethanedithiol. Peptides were precipitated from the cleavage cocktail using cold tertbutylmethyl ether. The precipitate was washed with the cold ether and dried under argon. Peptides were purified with reversed phase C18 chromatography with linear water/acetonitrile gradients containing 0.1% TFA. Peptide identity was confirmed with MALDI and electrospray mass spectrometry and with amino acid analysis.

Example 3. Peptide PEGylation

[131] The half-life of a peptide in vivo may be increased through attachment of a polyethylene glycol (PEG) moiety to the peptide thereby reducing clearance of the peptide by the kidney and

53
52

decreasing protease degradation of the peptide. The use of a VPAC2 receptor agonist peptide is severely limited by its very short half-life *in vivo*; however, attachment of a PEG moiety to the peptide (PEGylation) prolonged the half-life of the peptide sufficiently to allow for once/day to once/week treatment.

[132] PEGylation may be performed by any method known to those skilled in the art. However, in this example, PEGylation was performed by introducing a unique cysteine mutation into the peptide followed by PEGylating the cysteine via a stable thioether linkage between the sulfhydryl of the peptide and maleimide group of the methoxy-PEG-maleimide reagent (Nektar (Inhalo/Shearwater), San Carlos, CA; NOF, Tokyo, Japan). The unique cysteine may be introduced at the C-terminus of the peptide to minimize potential reduction of activity by PEGylation.

[133] As an example, a 2-fold molar excess of mPEG-mal (MW 22kD and 43kD) reagent was added to 1 mg of peptide (e.g., SEQ ID NO:1 having a cysteine mutation at the C-terminus of the peptide) and dissolved in reaction buffer at pH 6 (0.1 M Na phosphate/ 0.1 M NaCl/ 0.1 M EDTA). After 30 minutes at room temperature, the reaction was terminated with 2-fold molar excess of DTT to mPEG-mal. The peptide-PEG-mal reaction mixture was applied to a cation exchange column to remove residual PEG reagents followed by gel filtration column to remove residual free peptide. The purity, mass, and number of PEGylated sites were determined by SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. When a 22 kD PEG was attached to peptides of the present invention, potent VPAC2 receptor activation was retained. Furthermore, VPAC2 versus VPAC1 and PAC1 selectivity of receptor activation was also retained. It is possible that PEGylation with a smaller PEG (e.g., a linear 22 kD PEG) may be less likely reduce activity of the peptide, whereas a larger PEG (e.g., a branched 43kD PEG) will more likely reduce activity. However, the larger PEG will increase plasma half-life further so that once a week injection may be possible (Harris, et al., Clin. Pharmacokinet. 40:539-551, 2001).

Example 4. Pharmaceutical Composition – IV and SC Formulations

[134] A sterile IV injectable formulation is prepared with 4 mg of a polypeptide of SEQ ID NO: 1, or a derivatized polypeptide having equivalent of 4 mg polypeptide content, and 1 L sterile saline, using any manufacturing process well known in the art. Higher concentrations of polypeptide may be used for SC formulation. In the case of the polypeptide identified as SEQ ID NO: 1, or a derivatized polypeptide, 4 mg is dissolved in 100 mL saline or DMSO and sterile vials after aseptic filtration, are filled with the composition.

Example 5. Mass spectrometric analysis of peptides

[135] Forty pmol/2 μ l aliquots of peptides were diluted up to 10 μ l with water. The HEPES buffer was removed by application of 50% of the sample (20 pmol/5 μ l) to a conditioned Millipore C18 ZipTip, as per manufacturers instructions. Sample was eluted from the ZipTip with matrix (10 mg/ml alpha-cyanohydroxycinnamic acid in 50% ACN, 0.1% TFA) directly onto the MALDI plate. Samples were analyzed on an Applied Biosystems Voyager DE-PRO MALDI operated in

SA
33

the reflector ion mode. Data was collected in the 500 - 4000 Da range and resulting masses were compared to those expected by manual calculation.

Example 6. Edman analysis of peptides

[136] Peptide samples were supplied for Edman degradation at 1 nmol/10 μ l in 10 mM HEPES, pH 7.4, 5% TFA. Prior to Edman analysis, the HEPES buffer salt was removed by using an Applied Biosystems ProSorb sample cartridge as per manufacturers instructions. Briefly, sample was applied to a PVDF membrane and washed with 0.1% TFA, then the membrane was removed and inserted into the protein sequencer for Edman degradation. Edman degradation was carried out on an Applied Biosystems Procise 494HT protein sequencing system using the pulsed-liquid method according to manufacturer instructions. Sequence calls were made manually.

Example 7. Stability of Peptides

[137] The formulations described in Example 4 were placed in constant stability chamber. Peptides were also analyzed for stability to degradation in solutions of DPP4 and in plasma. Samples were removed periodically for analysis by capillary electrophoresis, mass spectrometry, Edman degradation, ELISA, and assays of peptide activity, which are sensitive methods to detect degradation of polypeptide. The area of various peaks was summed and the area for peak of the parent polypeptide is divided by the total peak area. The quotient is the % purity. Since there are impurities present in the fresh polypeptide, the purity change is normalized by dividing the purity at different time point by the initial purity. For stability to DPP4 and plasma, peptides at 20 pmol/ μ l were incubated at 37°C in the presence of 300 pM DPP-IV in 100 mM HEPES, pH 7.4 (Figure 2a). At various timepoints, the reaction (2 μ l aliquot) was terminated by addition of 1 μ M DPP-IV inhibitor and freezing. For MALDI mass spectrometric analysis, T = 0 hr, 1 hr, 5 hr, and 24 hr timepoints were evaluated. The results are plotted as percent intact peptide or peptide derivative as compared to degradation products.

Example 8. Binding of Peptides to PACAP1 and VPAC1 and 2 Receptors

[138] CHO cells overexpressing the PAC1, VPAC1, and VPAC2 receptors were grown to confluency, scraped from their flasks and pelleted in a soft spin in 50 ml tubes. The pellets were resuspended in a Tris based homogenization buffer and homogenized in a Dounce tissue grinder with 30-40 manual strokes on ice. The suspension was spun in an ultracentrifuge which resulted in the pelleting of membranes. This pellet was resuspended in a small amount of homogenization buffer and a protein concentration was determined through the use of a BCA kit from Pierce.

[139] A binding reaction containing 10 μ g membrane protein, 0.1 nM ^{125} I-PACAP 27, and a dose curve of compound to be tested was incubated in a 96-well plate at 37°C for 20 minutes. The reaction was stopped by placement of the plate on ice for 20 minutes. The reaction was added to a filter plate preincubated with 0.1% PEI to avoid non-specific binding, processed on a vacuum manifold and washed several times with a BSA based wash solution. The filter plate was dried,

55
54

scintillant added, and read on a MicroBeta counter. The data was analyzed and presented in Prism graphs.

Example 9. Elevation of cAMP in Response to Peptides

[140] CHO cells expressing the VPAC2 peptide were plated in 96-well plates at 8×10^4 cells/well and grown at 37°C for 24 hours in α MEM, nucleosides, glutamine (Gibco/BRL, Rockville, MD), 5% FBS, 100 μ g/mL Pen/Strep, 0.4 mg/mL hygromycin, and 1.5 mg/mL Geneticin (Gibco/BRL). The media was removed and the plates were washed with PBS. The cells were incubated with a peptide (in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 (pH 7.4) with 1% BSA and 100 μ M IBMX) for 15 minutes at 37°C. Cyclic AMP in the cell extracts was quantitated using the cAMP SPA direct screening assay system (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ,). The amount of cAMP present in the lysates was determined following instructions provided with this kit. The amount of cAMP (in pmol) produced at each concentration of peptide was plotted and analyzed by nonlinear regression using Prism software to determine the EC_{50} for each peptide.

[141] Alternatively, the elevation of cAMP in response to receptor activation can be measured in a reporter cell line, such as CHO, which not only expresses the desired receptor but which also expresses a reporter, such as luciferase, linked to a cAMP response element (CRE). Such cell are plated in 96 well plates at 10^4 cells per well and grown at 37°C for 48 hours in α MEM, nucleosides, glutamine (Gibco/BRL, Rockville, MD), 5% FBS, 100 μ g/mL Pen/Strep, 0.4 mg/mL hygromycin, and 1.5 mg/mL Geneticin (Gibco/BRL). The cells are then incubated with peptide for 6 hours, the media removed, and Bright-Glo reagent (Promega) added. The signal is detected using a scintillation counter.

[142] The polypeptides of this invention are designed based on VIP, which has been shown to lack activity at PAC1 (Vaudry, et al., Pharmacol. Rev. 52:289-324, 2000). Therefore, it is believed that the polypeptides of this invention do not possess appreciable activity at PAC1.

[143] The results of this assay with representative polypeptides of this invention are shown in Figure 3. Peptides identified as SEQ ID Nos: 1 and 112 are potent agonists of the VPAC2 receptor, activating the receptor to 100% the maximal level of receptor activation achieved by the endogenous peptide, PACAP-27. Furthermore, the peptides identified as SEQ ID Nos: 1, 112, 152, and 154 are selective VPAC2 receptor agonists, possessing very weak agonist activity on VPAC1. PACAP-27 is a potent agonist of VPAC1.

Example 10. Insulin Secretion from Dispersed Rat Islet Cells

[144] Insulin secretion of dispersed rat islets mediated by a number of peptides of the present invention was measured as follows. Islets of Langerhans, isolated from SD rats (200-250 g), were digested using collagenase. The dispersed islet cells were treated with trypsin, seeded into 96 V-bottom plates, and pelleted. The cells were then cultured overnight in media with or without peptides of this invention. The media was aspirated, and the cells were pre-incubated with Krebs-

56
55

Ringer-HEPES buffer containing 3 mM glucose for 30 minutes at 37°C. The pre-incubation buffer was removed, and the cells were incubated at 37°C with Krebs-Ringer-HEPES buffer containing the appropriate glucose concentration (e.g., 8 mM) with or without peptides for an appropriate time. In some studies, an appropriate concentration of GLP-1 was also included. A portion of the supernatant was removed and its insulin content was measured by SPA. The results were expressed as "fold over control" (FOC).

[145] In this assay, an increase of insulin secretion from dispersed rat islet cells was defined as an increase of at least 1.4-fold. The VPAC2 receptor agonist component of the polypeptides of this invention produced an increase in insulin secretion from dispersed islet cells by at least 1.4-fold to about 1.7-fold.

Example 11. Generation of Peptide Specific Antibodies and Peptide Measurement by ELISA

[146] Polyclonal antibodies specific to the polypeptides of the present invention were generated by synthesizing a specific fragment of a polypeptide of this invention using an ABI 433A peptide synthesizer. The peptide was then cleaved from the resin, and purified on a Beckman System Gold Analytical and Preparative HPLC system. A Perspective MALDI mass spectrophotometer system was used to identify the correct product. The peptide was dried using a lyophilizer. The peptide (2 mg) was then conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) via the free sulphhydryl group on the Cys.

[147] Female New Zealand White rabbits were immunized on Day 0, 14, 35, 56, and 77. On Day 0, each rabbit was injected subcutaneous with 250 µg peptide and complete Freund's adjuvant. Subsequent immunizations utilized 125 µg peptide per rabbit. Bleeds were started on Day 21 and continued at 21-day intervals thereafter. Purification of anti-peptide antibodies was performed by passing the crude serum over a specific peptide affinity purification column. The antibody titer was determined by ELISA.

[148] A 96-well Immulon 4HBX plate was coated with a C-terminal Morphosys F(ab) antibody, specific to the peptides of the present invention, and allowed to incubate overnight at 4°C. The plate was then blocked to prevent non-specific binding. Then, peptide standards (2500 ng/mL-160 pg/mL) were diluted in 33% plasma and the samples were diluted 1:3 in buffer followed by incubation for 1.5 hours at room temperature. After washing, a polyclonal N-terminal antibody specific to the peptides of this invention was incubated on the plate for one hour. This was followed by the addition of horseradish peroxidase (HRP)-donkey-anti-rabbit antibody and the samples and standards were incubated for another hour. Detection was assessed following incubation with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution, and the plate is read at OD₄₅₀ (Figure 4a).

[149] Alternatively, the 96-well Immulon 4HBX plate was coated with a polyclonal N-terminal antibody, specific to the peptides of the present invention, and allowed to incubate overnight at 4°C. The plate was then blocked to prevent non-specific binding. Then, peptide standards (2500

57
5b

ng/mL-100 pg/mL) were diluted in 50% plasma, and the samples were diluted 1:2 in buffer followed by incubation for 1.5 hours at room temperature. After washing, a monoclonal anti-PEG antibody specific to the peptides of this invention was incubated on the plate for one hour. This was followed by the addition of horseradish peroxidase (HRP)-anti-mouse antibody and the samples and standards were incubated for another hour. Detection was assessed following incubation with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution, and the plate is read at OD₄₅₀ (Figure 4b).

Example 12. Pharmacokinetics of Peptides Following IV and Subcutaneous Dosing

[150] Plasma samples are transferred to a microcentrifuge tube and an equal volume of acetonitrile is added to the sample (a 50% final concentration). The sample is vigorously vortexed for about 5 minutes and allowed to sit on ice for 10 minutes. The sample is again vortexed for about 1 minute, and then centrifuged for 30 minutes in a microcentrifuge (4°C) at maximum (about 15,000 x g).

[151] Following centrifugation, the aqueous phase is carefully transferred to a clean centrifuge tube, and the sample is centrifuged for 5 minutes in a microcentrifuge (4°C) at maximum speed (about 15,000 x g). The extracted sample is dried under vacuum using a Speed Vac SC110 (Savant) with a medium heat setting until dry. The sample is resuspended in an appropriate volume of sterile water and is maintained at 4°C. The sample is then sonicated in a sonic bath for 10 minutes at room temperature prior to analysis. The peptide concentration is determined utilizing the reporter assay as described in Example 9.

[152] Using this method, the pharmacokinetic properties of SEQ ID NO: 112 were compared to that of SEQ ID NO: 154 (Figure 5a). The peptide acetylation present on SEQ ID NO: 112 demonstrates improved pharmacokinetic properties, being detected at 24 and 48 hours, while the non-acetylated peptide, SEQ ID NO: 154, is only detected at 8 hours. Further studies comparing these two peptide demonstrated that SEQ ID NO: 112 had a half-life of 10.9 hours in the rat, while that of the non-acetylated SEQ ID NO: 154 was approximately 6 hours (Figure 5b).

[153] Plasma peptide concentrations may also be measured using ELISA, as described in Example 11. Using this methodology, the pharmacokinetics of SEQ ID NO: 112 was characterized further (Figure 5c). In dog, SEQ ID NO: 112 remains present at detectable concentration for one week.

Example 13. Effect of PEGylated Peptides on Intraperitoneal Glucose Tolerance in Rats

[154] The in vivo activity of the PEGylated peptides of this invention when administered subcutaneously was examined in rats. Rats fasted overnight were given a subcutaneous injection of control or PEGylated peptide (1-100 µg/kg). Three hours later, basal blood glucose was measured, and the rats were given 2 g/kg of glucose intraperitoneally. Blood glucose was measured again after 15, 30, and 60 minutes. A PEGylated peptide of this invention significantly reduced blood glucose levels relative to the vehicle following the IPGTT (Intraperitoneal Glucose

58
57

Tolerance Test), with 17%-28% reduction in the glucose AUC (Figures 8a-8d). This demonstrates that the PEGylated peptide has prolonged glucose lowering activity in vivo. In addition to the glucose lowering activity of the PEGylated peptides of the present invention, it also indicates prolonged peptide half-life in vivo. PACAP-27 has a very short half-life in vivo (< 10 minutes). The ability of the PEGylated peptides of the invention to lower blood glucose at 24 (Figure 8b), 41 (Figure 8c), 65 (Figure 8c), and 72 (Figure 8d) hours following peptide administration is a clear indication that the peptide is present in the circulation at this time point and hence, has prolonged half-life relative to PACAP-27 (Figure 8c). Furthermore, the peptides of SEQ ID NO: 112 demonstrates greater potency and efficacy at longer time points as compared to the peptides of SEQ ID NO: 154 and 155 (Figure 8b and 8d).

[155] Demonstration of the activity of the polypeptides of the present invention may be accomplished through in vitro, ex vivo, and in vivo assays that are well known in the art. For example, to demonstrate the efficacy of a pharmaceutical agent for the treatment of diabetes and related disorders such as Syndrome X, impaired glucose tolerance, impaired fasting glucose, and hyperinsulinemia; atherosclerotic disease and related disorders such as hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia; and obesity, the following assays may be used.

Method for Measuring Blood Glucose Levels

[156] db/db mice (obtained from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) are bled (by either eye or tail vein) and grouped according to equivalent mean blood glucose levels. They are dosed orally (by gavage in a pharmaceutically acceptable vehicle) with the test polypeptide once daily for 14 days. At this point, the animals are bled again by eye or tail vein and blood glucose levels were determined. In each case, glucose levels are measured with a Glucometer Elite XL (Bayer Corporation, Elkhart, IN).

Method for Measuring an Effect on Cardiovascular Parameters

[157] Cardiovascular parameters (e.g., heart rate and blood pressure) are also evaluated. SHR rats are orally dosed once daily with vehicle or test polypeptide for 2 weeks. Blood pressure and heart rate are determined using a tail-cuff method as described by Grinsell, et al., (Am. J. Hypertens. 13:370-375, 2000). In monkeys, blood pressure and heart rate are monitored as described by Shan, et al., (J. Pharmacol. Exp. Therap. 278:1435-1443, 1996).

Method for Measuring Triglyceride Levels

[158] hApoA1 mice (obtained from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) are bled (by either eye or tail vein) and grouped according to equivalent mean serum triglyceride levels. They are dosed orally (by gavage in a pharmaceutically acceptable vehicle) with the test polypeptide once daily for 8 days. The animals are then bled again by eye or tail vein, and serum triglyceride levels are determined. In each case, triglyceride levels are measured using a Technicon Axon Autoanalyzer (Bayer Corporation, Tarrytown, NY).

54
58***Method for Measuring HDL-Cholesterol Levels***

[150] To determine plasma HDL-cholesterol levels, hApoA1 mice are bled and grouped with equivalent mean plasma HDL-cholesterol levels. The mice are orally dosed once daily with vehicle or test polypeptide for 7 days, and then bled again on day 8. Plasma is analyzed for HDL-cholesterol using the Synchron Clinical System (CX4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Method for Measuring Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, Triglycerides, and Glucose Levels

[160] In another in vivo assay, obese monkeys are bled, then orally dosed once daily with vehicle or test polypeptide for 4 weeks, and then bled again. Serum is analyzed for total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, and glucose using the Synchron Clinical System (CX4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Lipoprotein subclass analysis is performed by NMR spectroscopy as described by Oliver, et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:5306-5311, 2001).

[161] All publications and patents mentioned in the above specification are incorporated herein by reference. Various modifications and variations of the described compositions and methods of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the above-described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in the field of biochemistry or related fields are intended to be within the scope of the following claims. Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein.

60
59**We claim:**

1. A polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 to 148, and functionally equivalent fragments, derivatives, and variants thereof.
2. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 112, 113, 114, 115, and 116.
3. An antibody which binds specifically to the polypeptide of claim 1.
4. The antibody of claim 3, wherein said antibody is a polyclonal antibody.
5. The antibody of claim 3, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
6. An antibody which binds specifically to the polyethylene glycol.
7. The antibody of claim 6, wherein said antibody is a polyclonal antibody.
8. The antibody of claim 6, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
9. A method for detecting a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 to 148 in a sample comprising:
 - a. contacting the sample with an antibody of claim 3 or claim 6,
 - b. detecting said antibody, and
 - c. correlating the detection of antibody with the amount of polypeptide in the sample.
10. A method for detecting a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 to 148 in a sample comprising:
 - a. contacting the sample with a first antibody of claim 3 or claim 6,
 - b. contacting the sample with a second labeled antibody, wherein the second antibody binds to the first antibody,
 - c. detecting the label, and
 - d. correlating the detection of label with the amount of polypeptide in the sample.
11. A kit for detecting a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 to 148 in a sample comprising: a first antibody of claim 3 or claim 6 and a second antibody wherein the second antibody binds to the first antibody.
12. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1, or functionally equivalent fragments, derivatives, and variants thereof, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.
13. The pharmaceutical composition of claim 12, wherein said polypeptide is selected from the

6x
60

group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 112, 113, 114, 115, and 116.

14. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1, or functionally equivalent fragments, derivatives, and variants thereof, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier and one or more pharmaceutical agents.
15. The pharmaceutical composition of claim 14, wherein said pharmaceutical agent is selected from the group consisting of PPAR ligands, insulin secretagogues, sulfonylurea drugs, α -glucosidase inhibitors, insulin sensitizers, hepatic glucose output lowering compounds, insulin and insulin derivatives, biguanides, protein tyrosine phosphatase-1B, dipeptidyl peptidase IV, 11 β -HSD inhibitors, anti-obesity drugs, HMG-CoA reductase inhibitors, nicotinic acid, lipid lowering drugs, ACAT inhibitors, bile acid sequestrants, bile acid reuptake inhibitors, microsomal triglyceride transport inhibitors, fibric acid derivatives, β -blockers, ACE inhibitors, calcium channel blockers, diuretics, renin inhibitors, AT-1 receptor antagonists, ET receptor antagonists, neutral endopeptidase inhibitors, vasopeptidase inhibitors, and nitrates.
16. A composition comprising an effective amount of a polypeptide of claim 1, or functionally equivalent fragments, derivatives, and variants thereof, in combination with an inert carrier.
17. A method of treating diabetes comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
18. The method of claim 17, wherein said diabetes is selected from the group consisting of type 2 diabetes, maturity-onset diabetes of the young, latent autoimmune diabetes adult, and gestational diabetes.
19. A method of treating Syndrome X comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
20. A method of treating diabetes-related disorders comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
21. The method of claim 20, wherein said diabetes-related disorder is selected from the group consisting of hyperglycemia, hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance, impaired fasting glucose, dyslipidemia, hypertriglyceridemia, and insulin resistance.
22. A method of treating diabetes comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 in combination with one

82
61

or more pharmaceutical agents.

23. The method of claim 20, wherein said pharmaceutical agent is selected from the group consisting of PPAR agonists, sulfonylurea drugs, non-sulfonylurea secretagogues, α -glucosidase inhibitors, insulin sensitizers, insulin secretagogues, hepatic glucose output lowering compounds, insulin, and anti-obesity agents.
24. The method of claim 23, wherein said diabetes is selected from the group consisting of type 2 diabetes, maturity-onset diabetes of the young, latent autoimmune diabetes adult, and gestational diabetes.
25. A method of treating Syndrome X comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 in combination with one or more pharmaceutical agents.
26. The method of claim 25, wherein said pharmaceutical agent is selected from the group consisting of PPAR agonists, sulfonylurea drugs, non-sulfonylurea secretagogues, α -glucosidase inhibitors, insulin sensitizers, insulin secretagogues, hepatic glucose output lowering compounds, insulin, and anti-obesity agents.
27. A method of treating diabetes-related disorders comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 in combination with one or more pharmaceutical agents.
28. The method of claim 27, wherein said diabetes-related disorder is selected from the group consisting of hyperglycemia, hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance, impaired fasting glucose, dyslipidemia, hypertriglyceridemia, and insulin resistance.
29. The method of claim 28, wherein said pharmaceutical agent is selected from the group consisting of PPAR agonists, sulfonylurea drugs, non-sulfonylurea secretagogues, α -glucosidase inhibitors, insulin sensitizers, insulin secretagogues, hepatic glucose output lowering compounds, insulin, and anti-obesity agents.
30. A method of treating diabetes, Syndrome X, or diabetes-related disorders comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 in combination with one or more agents selected from the group consisting of HMG-CoA reductase inhibitors, nicotinic acid, lipid lowering drugs, ACAT inhibitors, bile acid sequestrants, bile acid reuptake inhibitors, microsomal triglyceride transport inhibitors, fibric acid derivatives, β -blockers, ACE inhibitors, calcium channel blockers, diuretics, renin inhibitors, AT-1 receptor antagonists, ET receptor antagonists, neutral endopeptidase inhibitors, vasopeptidase inhibitors, and nitrates.

63
62

31. The method of claim 30, wherein said diabetes-related disorder is selected from the group consisting of hyperglycemia, hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance, impaired fasting glucose, dyslipidemia, hypertriglyceridemia, and insulin resistance.
32. The method of any one of claims 22 to 31, wherein the polypeptide of claim 1 and one or more pharmaceutical agents are administered as a single pharmaceutical dosage formulation.
33. A method of treating or preventing secondary causes of diabetes comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
34. The method of claim 33, wherein said secondary cause is selected from the group consisting of glucocorticoid excess, growth hormone excess, pheochromocytoma, and drug-induced diabetes.
35. A method of treating or preventing secondary causes of diabetes comprising the step of administering a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 in combination with one or more pharmaceutical agents.
36. The method of claim 35, wherein said pharmaceutical agent is selected from the group consisting of PPAR agonists, sulfonylurea drugs, non-sulfonylurea secretagogues, α -glucosidase inhibitors, insulin sensitizers, insulin secretagogues, hepatic glucose output lowering compounds, insulin, and anti-obesity agents.
37. A method of treating respiratory disease comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
38. A method of treating obesity comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
39. A method of treating cardiovascular disease comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
40. The method of claim 39, wherein said cardiovascular disease is selected from atherosclerosis, coronary heart disease, coronary artery disease, and hypertension.
41. A method of treating disorders of lipid and carbohydrate metabolism comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.

64
63

42. A method of treating sleep disorders comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
43. A method of treating male reproductive disorders comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
44. A method of treating growth disorders or disorders of energy homeostasis comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
45. A method of treating immune diseases comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
46. A method of treating autoimmune diseases comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
47. A method of treating acute and chronic inflammatory diseases comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
48. A method of treating septic shock comprising the step of administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
49. A method of stimulating insulin release in a glucose-dependent manner in a subject in need thereof by administering to said subject a polypeptide of claim 1 or a pharmaceutical composition of claim 12.
50. Polypeptides according to claim 1 for the treatment and/or prophylaxis of diabetes and diabetes-related disorders.
51. Medicament containing at least one polypeptide according to claim 1 in combination with at least one pharmaceutically acceptable, pharmaceutically safe carrier or excipient.
52. Use of polypeptides according to claim 1 for manufacturing a medicament for the treatment and/or prophylaxis of diabetes and diabetes-related disorders.
53. Medicament according to claim 51 for the treatment and/or prophylaxis of diabetes.

68
69

SEQ ID NO	Sequence
1	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQVAACKYLQSIKQKRY
2	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKRY
3	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQVAACKYLQSIKQK
4	Ac-HTEAVFTDQYTLRKQVAACKYLQSIKQKRY
5	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQLAVKKYLQDIKQGGT
6	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKR
7	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQLAACKYLQTIKQKRY
8	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQTIKQKRY
9	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAAACKYLQSIKQKRY
10	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKHYLQSIKQKRY
11	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAGKKYLQSIKQKR
12	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKKYLQSIKQKR
13	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMARKKYLQSIKQKR
14	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAASKYLQSIKQKR
15	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKR
16	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQQR
17	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKR
18	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQRR
19	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKA
20	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKF
21	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKH
22	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKI
23	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKK
24	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKL
25	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKM
26	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKP
27	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKQ
28	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKS
29	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKT
30	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKV
31	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKW
32	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQKY
33	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAGKKYLQSIQRI
34	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKKYLQSIQRI
35	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAASKYLQSIQRI
36	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQRI
37	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAASKYLQSIQRI

FIG. 1a

66
65

SEQ ID NO	Sequence
38	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
39	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKRY
40	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQK
41	Ac-HTEAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
42	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLQDTKQGGT
43	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKR
44	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQLAACKYLQTIKQKRY
45	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQTIKQKRY
46	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKRY
47	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKHYLQSIKQKRY
48	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAAGKKYLQSIKQKR
49	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQKR
50	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQKR
51	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQKR
52	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIPOKR
53	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIQOKR
54	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIROKR
55	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQRR
56	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKA
57	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKF
58	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKH
59	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKI
60	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKK
61	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKL
62	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKM
63	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKP
64	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKQ
65	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKS
66	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKT
67	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKV
68	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKW
69	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKY
70	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAAGKKYLQSIKQRI
71	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQRI
72	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQRI
73	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIPORI
74	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIRORI

FIG. 1b

67
66

SEQ ID NO	Sequence
75	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLOSINKRY
76	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKRY
77	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLOSINKK
78	Ac-HTEAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLOSINKRY
79	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQLAVKKYLODIKNGGT
80	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKR
81	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLOTIKNKRY
82	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOTIKNKRY
83	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKHYLOSINKKRY
84	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKHYLOSINKRY
85	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLOSINKKR
86	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLOSINKKR
87	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLOSINKKR
88	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLOSINKKR
89	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSIPNKR
90	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSIQNKR
91	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSIRNKR
92	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKNR
93	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKA
94	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKF
95	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKH
96	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKI
97	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKK
98	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKL
99	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKM
100	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKP
101	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKQ
102	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKS
103	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKT
104	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKV
105	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKW
106	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSINKKY
107	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLOSINKRI
108	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLOSINKRI
109	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLOSINKRI
110	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLOSI PNRI
111	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLOSIRNRI

FIG. 1c

67
67

SEQ ID NO	Sequence
112	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQVAACKYLQSIKQKRYC-PEG
113	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKRYC-PEG
114	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQVAACKYLQSIKQKRC-PEG
115	Ac-HTEAVFTDQYTLRKQVAACKYLQSIKQKRYC-PEG
116	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQLAVKKYLQDIKQGGTC-PEG
117	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKRC-PEG
118	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQLAACKYLQTIKQKRYC-PEG
119	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQTIKQKRYC-PEG
120	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAAHKYLQSIKQKRYC-PEG
121	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAAKHYLQSIKQKRYC-PEG
122	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAGKKYLQSIKQKRC-PEG
123	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLQSIKQKRC-PEG
124	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMARKKYLQSIKQKRC-PEG
125	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLQSIKQKRC-PEG
126	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIPOKRC-PEG
127	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIQOKRC-PEG
128	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIROKRC-PEG
129	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQRRRC-PEG
130	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKAC-PEG
131	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKFC-PEG
132	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKHC-PEG
133	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKIC-PEG
134	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKRC-PEG
135	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKLC-PEG
136	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKMC-PEG
137	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKPC-PEG
138	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKQC-PEG
139	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKSC-PEG
140	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKTC-PEG
141	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKVC-PEG
142	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKWC-PEG
143	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIKQKYC-PEG
144	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAGKKYLQSIKQRIC-PEG
145	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLQSIKQRIC-PEG
146	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLQSIKQRIC-PEG
147	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQSIPORIC-PEG
148	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLQSIRORIC-PEG

FIG. 1d

68

SEQ ID NO	Sequence
149	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVK NK (PACAP38)
150	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL (PACAP27)
151	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLN SILN (VIP)
152	HSDAVFTDQYTRLRKQVA AKKYLS IKQ KRY
153	Ac-ETDAVFTDQYTRLRKQVA AKKYLS IKQ KRY
154	HSDAVFTDQYTRLRKQVA AKKYLS IKQ KRYC-PEG
155	Ac-ETDAVFTDQYTRLRKQVA AKKYLS IKQ KRYC-PEG

FIG. 1e

6/17

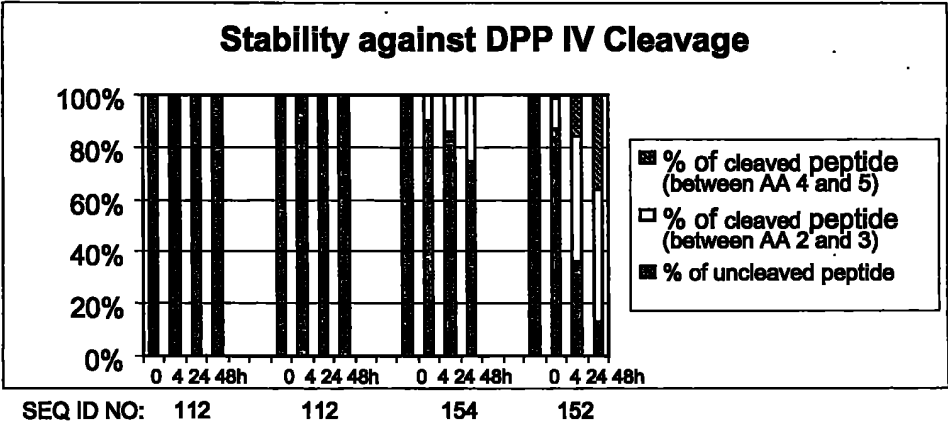
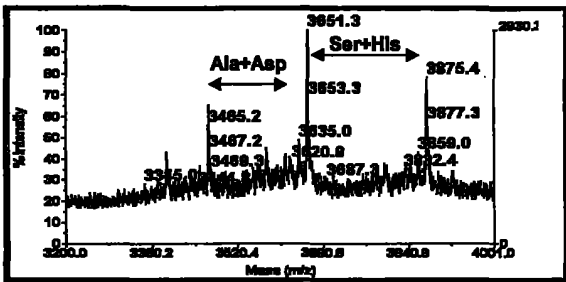


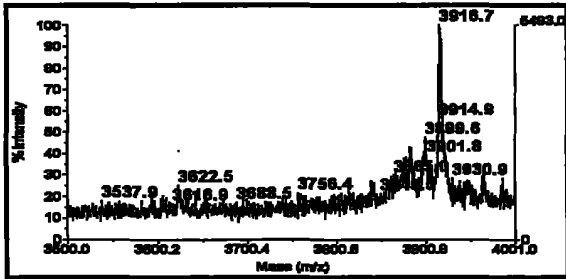
Figure 2a

20

W0 2005072385



SEQ ID NO: 152 is
cleaved by DPPIV



71

W/O 2005/072385

8/17

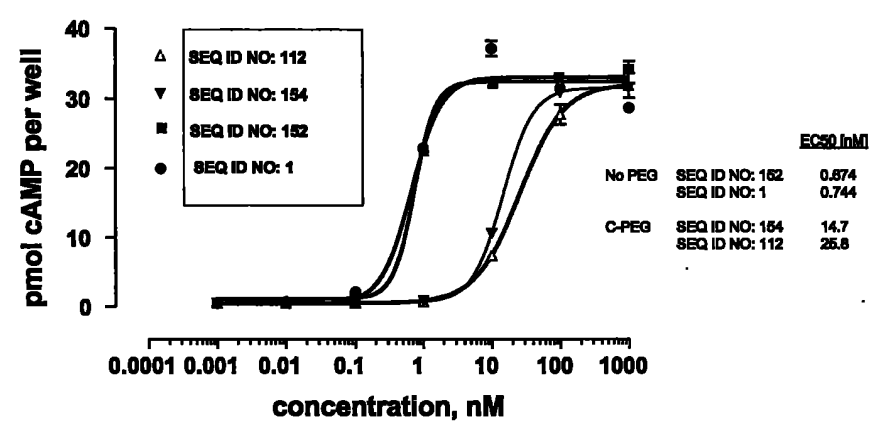


Figure 3

PCV/US2005/002609

22

72

23

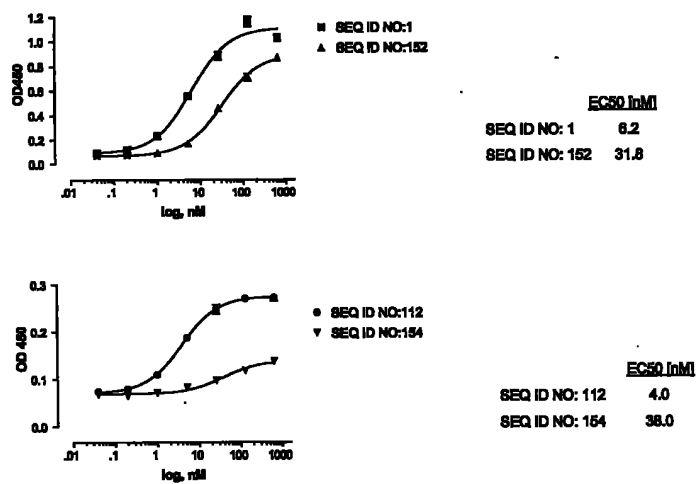
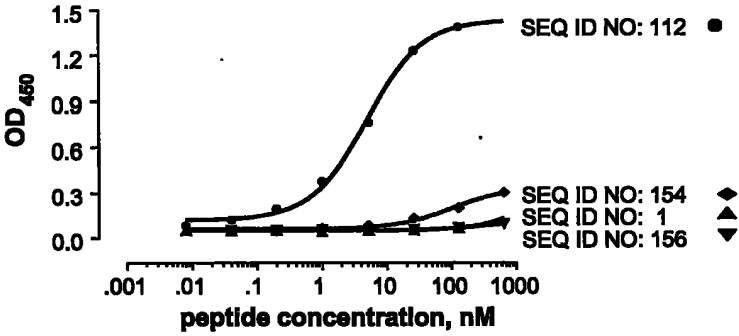


Figure 4a

24

10/17



SEQ ID NO:	112	1	156	154
EC50 (nM)	4.972	5834	332.6	103.3

Figure 4b

Handwritten signature

11/17

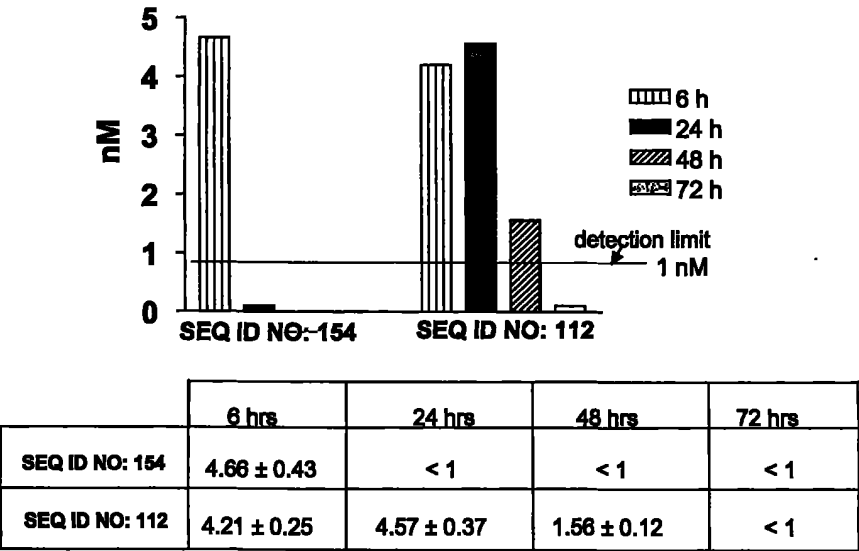


Figure 5a

2/2

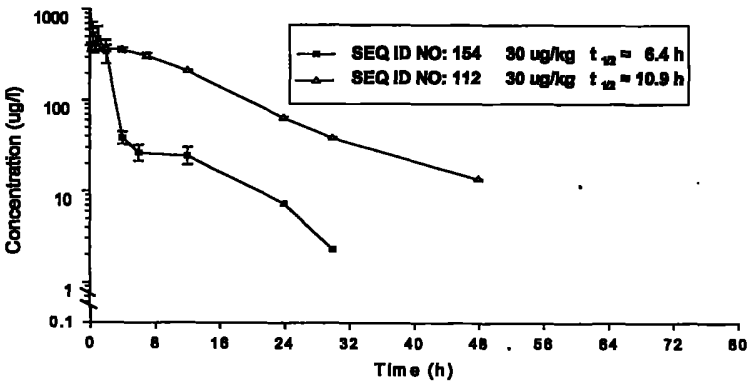


Figure 5b

2
2

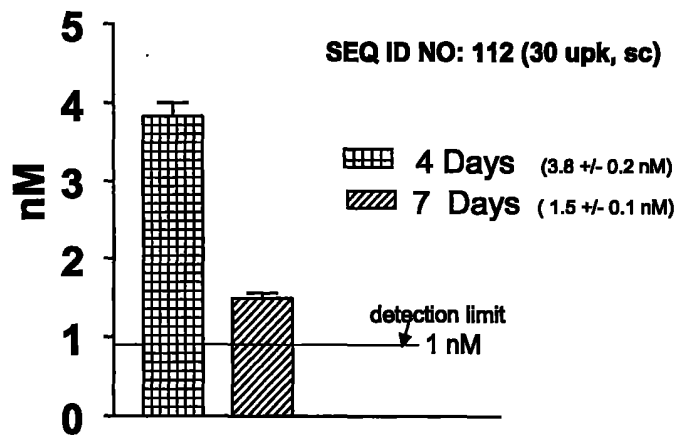


Figure 5c

46

28

PK (Cre-Luc Reporter Assay)

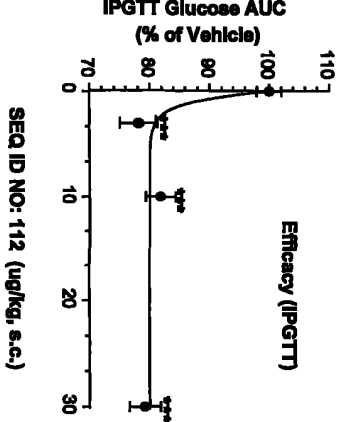


Figure 6a

29
28

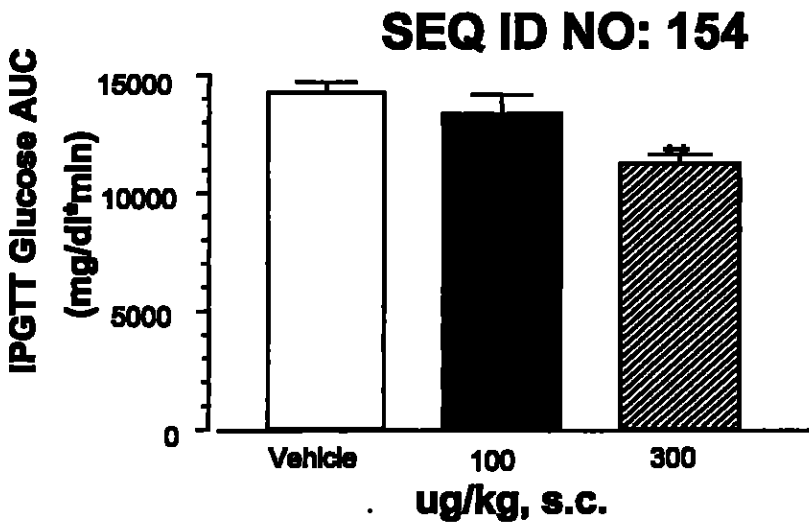
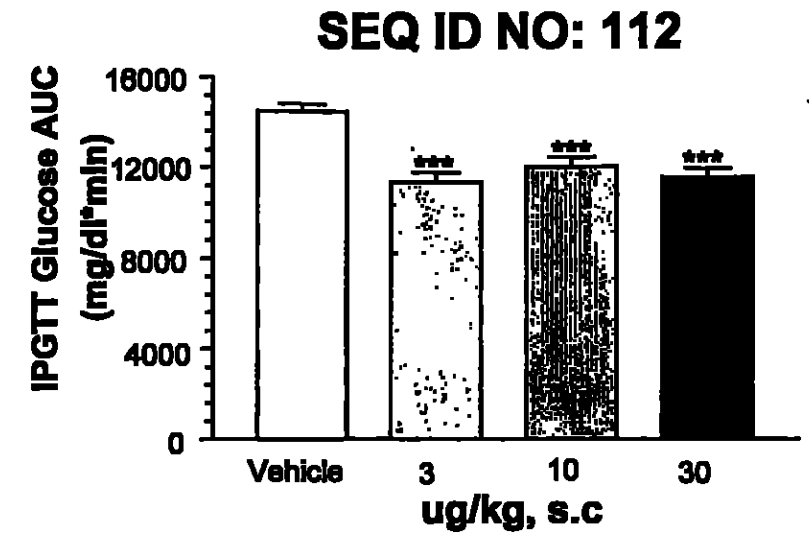


Figure 6b

16/17

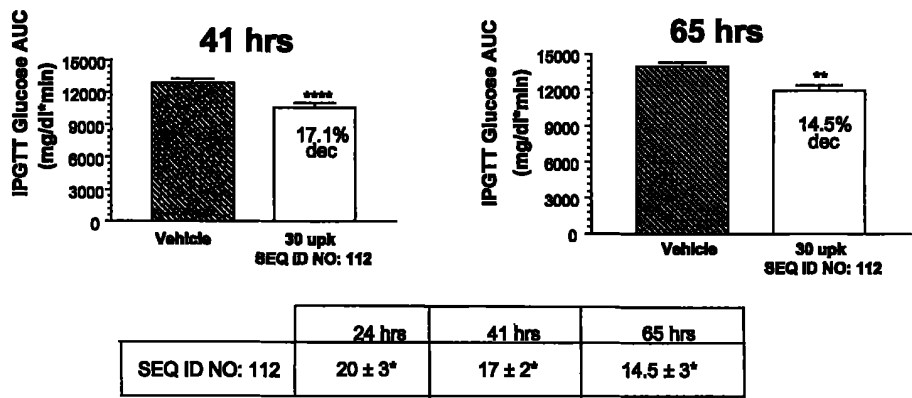


Figure 6c

18

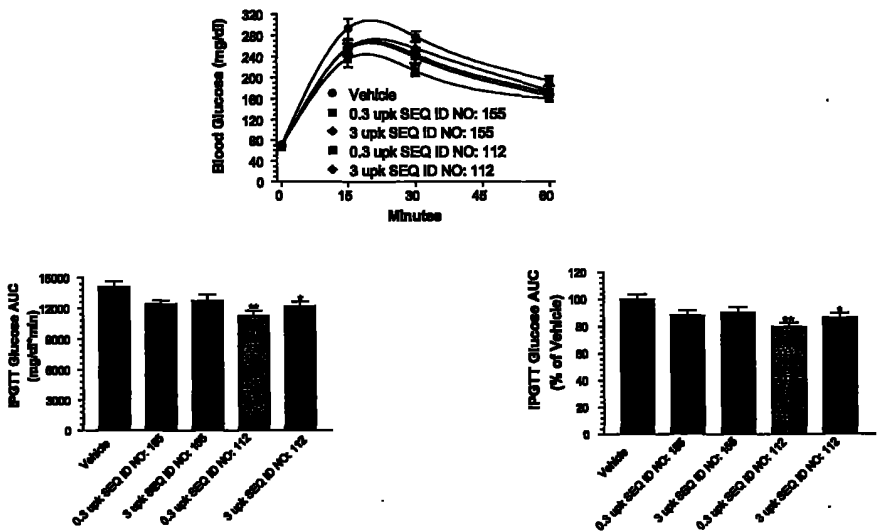


Figure 6d

82
81

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer Pharmaceuticals Corporation
 Clairmont, Kevin
 Lumb, Kevin
 Buckholz, Thomas
 Salhanick, Arthur

<120> PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING PEPTIDE (PACAP) RECEPTOR
 (VPAC2) AGONISTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF USE

<130> 5189

<150> US 60/539,550
 <151> 2004-01-27

<150> US 60/566,499
 <151> 2004-04-29

<160> 155

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 1

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 2
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 2

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 3
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

82

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(29)
<223> ACETYLATION

<400> 3

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys
20 25

<210> 4
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 4

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 5
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 5

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

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr
20 25 30

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

82
83

<400> 6

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

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 7

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

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 8

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

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 9

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

85
84

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 10
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 10

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

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 11
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 11

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 12
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 12

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 13

86
85

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 13

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

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 14

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 15

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg
20 25 30

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

<220>

87
86

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 16

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Gln Lys Arg
 20 25 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 17

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Lys Arg
 20 25 30

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 18

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Arg
 20 25 30

<210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 19

878
87

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala
20 25 30

<210> 20
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 20

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe
20 25 30

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 21

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His
20 25 30

<210> 22
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 22

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile
20 25 30

8/89

<210> 23
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 23

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys
20 25 30

<210> 24
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 24

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Leu
20 25 30

<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 25

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Met
20 25 30

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

90
89

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 26

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Pro
20 25 30

<210> 27
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 27

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln
20 25 30

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 28

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser
20 25 30

<210> 29
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

gt
al

<400> 29

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

<210> 30

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 30

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

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 31

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

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 32

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

qz
al

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Tyr
20 25 30

<210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 33

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 34

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 35
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 35

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 36

93
a2

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 36

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 37
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 37

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 38
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 38

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 39
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

94
93

<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLTATION

<400> 39

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 40
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(29)
<223> ACETYLTATION

<400> 40

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys
20 25

<210> 41
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLTATION

<400> 41

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 42
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLTATION

<400> 42

98
94

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr
20 25 30

<210> 43
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 43

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 44
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 44

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 45
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 45

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

96
as

<210> 46
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLTATION

<400> 46

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 47
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLTATION

<400> 47

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 48
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 48

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 49
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

97
96

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 49

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 50

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 51
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 51

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 52
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

98
a7

<400> 52

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 53

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLTATION

<400> 53

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 54

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLTATION

<400> 54

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 55

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLTATION

<400> 55

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

9A
9B

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Arg
20 25 30

<210> 56
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 56

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala
20 25 30

<210> 57
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 57

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe
20 25 30

<210> 58
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 58

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His
20 25 30

<210> 59

100
99

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 59

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile
20 25 30

<210> 60
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 60

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys
20 25 30

<210> 61
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 61

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Leu
20 25 30

<210> 62
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

101
100

<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 62

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Met
20 25 30

<210> 63
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 63

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Pro
20 25 30

<210> 64
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 64

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln
20 25 30

<210> 65
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 65

102
101

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser
20 25 30

<210> 66
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 66

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Thr
20 25 30

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 67

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Val
20 25 30

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 68

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Trp
20 25 30

193
192

<210> 69
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 69

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Tyr
 20 25 30

<210> 70
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 70

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 71
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 71

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 72
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

109
193

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 72

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 73
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 73

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 74
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 74

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 75
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

105
104

<400> 75

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 76

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 76

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 77

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(29)

<223> ACETYLATION

<400> 77

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys
20 25

<210> 78

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 78

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

105
103

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 79
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 79

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

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Asn Gly Gly Thr
 20 25 30

<210> 80
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 80

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 81
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 81

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

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 82

107
106

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 82

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 83
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 83

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

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 84
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 84

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

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 85
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

108
107

<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 85

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
20 25 30

<210> 86
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 86

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
20 25 30

<210> 87
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 87

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

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
20 25 30

<210> 88
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 88

109
(08)

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 89
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 89

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 90
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 90

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 91
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 91

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Asn Lys Arg
 20 25 30

140
109

<210> 92
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 92

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Arg
20 25 30

<210> 93
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 93

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ala
20 25 30

<210> 94
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 94

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Phe
20 25 30

<210> 95
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

141
110

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 95

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys His
20 25 30

<210> 96
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 96

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ile
20 25 30

<210> 97
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 97

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Lys
20 25 30

<210> 98
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

112
111

<400> 98

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Leu
 20 25 30

<210> 99

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLTATION

<400> 99

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Met
 20 25 30

<210> 100

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLTATION

<400> 100

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Pro
 20 25 30

<210> 101

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLTATION

<400> 101

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

143
112

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Gln
20 25 30

<210> 102
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 102

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ser
20 25 30

<210> 103
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 103

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Thr
20 25 30

<210> 104
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 104

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Val
20 25 30

<210> 105

114
113

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

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 105

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Trp
 20 25 30

<210> 106
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 106

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Tyr
 20 25 30

<210> 107
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 107

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
 20 25 30

<210> 108
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

118
119

<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 108

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
20 25 30

<210> 109
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 109

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
20 25 30

<210> 110
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 110

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Asn Arg Ile
20 25 30

<210> 111
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 111

146
115

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Asn Arg Ile
20 25 30

<210> 112
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 112

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 113
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 113

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 114
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(30)

117
116

<223> Cysteine at position 30 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 114

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Cys
 20 25 30

<210> 115
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(32)
 <223> ACETYLATION

<400> 115

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
 20 25 30

<210> 116
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(32)
 <223> ACETYLATION

<400> 116

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

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr Cys
 20 25 30

118
117

<210> 117
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 117

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
20 25 30

<210> 118
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 118

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

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 119
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 119

119
118

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 120
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 120

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

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 121
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 121

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

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 122
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE

120
119

<222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 122

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
 20 25 30

<210> 123
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 123

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
 20 25 30

<210> 124
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 124

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

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
 20 25 30

1251
129

<210> 125
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 125

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
20 25 30

<210> 126
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 126

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg Cys
20 25 30

<210> 127
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

122
121

<400> 127

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

<210> 128

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLTATION

<400> 128

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

<210> 129

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLTATION

<400> 129

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

<210> 130

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

123
122

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLTATION

<400> 130

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala Cys
 20 25 30

<210> 131
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLTATION

<400> 131

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe Cys
 20 25 30

<210> 132
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLTATION

<400> 132

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His Cys
 20 25 30

124
123

<210> 133
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 133

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile Cys
20 25 30

<210> 134
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 134

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys Cys
20 25 30

<210> 135
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

125
124

<400> 135

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Leu Cys
20 25 30

<210> 136

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 136

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Met Cys
20 25 30

<210> 137

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 137

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Pro Cys
20 25 30

<210> 138

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

126
129

20

25

30

<210> 141
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 141

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Val Cys
20 25 30

<210> 142
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 142

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Trp Cys
20 25 30

<210> 143
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)

127
126

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 138

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln Cys
20 25 30

<210> 139
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 139

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser Cys
20 25 30

<210> 140
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 140

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Thr Cys
45

128
127

<223> ACETYLATION

<400> 143

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

<210> 144

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 144

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

<210> 145

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 145

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

<210> 146

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

129
128

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 146

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile Cys
20 25 30

<210> 147
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 147

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile Cys
20 25 30

<210> 148
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 148

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

130
129

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile Cys
20 25 30

<210> 149
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 149

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

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys
35

<210> 150
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

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

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 151
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

<210> 152
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 152

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 153

131
130

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 153

His Thr Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 154
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<400> 154

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 155
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<400> 155

His Thr Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

132
131

**AGONISTAS DEL RECEPTOR (VPAC2) DEL PÉPTIDO ACTIVADOR DE LA
ADENILAT CICLASA HIPOFISARIA (PACAP) Y SUS MÉTODOS DE USO
FARMACOLÓGICO**

[001] La presente solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional N.º de Serie 60/539.550 de los EE. UU., presentada el 27 de enero de 2004 y la Solicitud Provisional N.º de Serie 60/568.499 de los EE. UU., presentada el 29 de abril de 2004, cuyo contenido se incluye en su totalidad en la presente por referencia.

ÁMBITO DE LA INVENCIÓN

[002] Esta invención se relaciona con polipéptidos recientemente identificados y con el uso de dichos polipéptidos con fines terapéuticos. Más específicamente, los polipéptidos de la presente invención son útiles para estimular la liberación de insulina de las células β pancreáticas en una forma dependiente de la glucosa, proporcionando de este modo una opción de tratamiento para las personas que tienen trastornos metabólicos, como la diabetes o la intolerancia a la glucosa, un estado prediabético.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[003] La diabetes se caracteriza por alteraciones en el metabolismo de la glucosa, que se manifiesta, entre otras cosas, por un elevado nivel de glucosa en sangre en el paciente diabético. Los defectos subyacentes llevan a una clasificación de la diabetes en dos grupos principales: diabetes tipo 1 o diabetes mellitus insulino dependiente (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM), que surge cuando los pacientes carecen de células β productoras de insulina en sus islotes de Langerhans pancreáticos; y diabetes tipo 2 o diabetes mellitus no insulino dependiente (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM), que se produce en pacientes con problemas en la función de las células β y alteraciones en la acción de la insulina.

[004] Actualmente, los pacientes con diabetes tipo 1 reciben tratamiento con insulina, mientras que la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 reciben tratamiento con agentes que estimulan la función de las células β o con agentes que aumentan la sensibilidad de los tejidos de los pacientes hacia la insulina. Con el transcurso del tiempo, casi la mitad de los sujetos con diabetes tipo 2 pierden su respuesta a estos agentes y deben comenzar a recibir terapia con insulina. A continuación, se describen los fármacos que se utilizan actualmente para tratar la diabetes tipo 2.

[005] Los inhibidores de la alfa glucosidasa (p. ej., Precose® (Bayer Pharmaceuticals Corporation), Voglibose™ (Takeda Pharmaceuticals Company Limited) y Miglitol® (Bayer Pharmaceuticals Corporation)) reducen las fluctuaciones de la glucosa postprandial al retardar la

absorción de glucosa del intestino. Estos fármacos son seguros y proporcionan tratamiento para los sujetos con diabetes de leve a moderada. Sin embargo, en la bibliografía se han informado efectos secundarios gastrointestinales.

[006] Los sensibilizantes a la insulina son fármacos que aumentan la respuesta del organismo a la insulina. Las tiazolidinedionas, como Avandia® (GlaxoSmithKline, rosiglitazona) y Actos™ (Takeda Pharmaceuticals Company Limited, pioglitazona) activan el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) del subtipo gamma y modulan la actividad de un conjunto de genes que no han sido bien descritos. Rezulin™ (Warner-Lambert Company, troglitazona), el primer fármaco de esta clase, fue retirado del mercado debido a que provocaba niveles elevados de enzimas hepáticas y hepatotoxicidad farmacógena. Estos efectos hepáticos no parecen ser un problema significativo en los pacientes que usan Avandia® y Actos™. De todos modos, se recomienda realizar un análisis de enzimas hepáticas cada 2 meses durante el primer año de la terapia y, en lo sucesivo, en forma periódica. Avandia® y Actos™ parecen estar asociados con la retención de líquidos y el edema. Otro posible efecto secundario es el aumento de peso. Avandia® no está indicado para su uso con insulina debido a que puede producirse insuficiencia cardíaca congestiva.

[007] Los secretagogos de insulina (p. ej., sulfonilureas (SFU) y otros agentes que actúan mediante el canal de K⁺ dependiente del trifosfato de adenosina [adenosine triphosphate, ATP]) son otro tipo de fármaco utilizado actualmente para tratar la diabetes tipo 2. Las SFU constituyen la terapia estándar para los pacientes con diabetes tipo 2 que tienen glucemia en ayunas de leve a moderada. Las SFU tienen limitaciones que incluyen la posibilidad de provocar hipoglucemia, aumento de peso, y tasas altas de fracaso primario y secundario. Entre el 10 y el 20% de los pacientes que reciben tratamiento inicialmente no muestran un efecto significativo del tratamiento (fracaso primario). El fracaso secundario queda demostrado por una pérdida adicional del efecto del tratamiento, de entre el 20 y el 30%, después de seis meses de recibir tratamiento con una SFU. El tratamiento con insulina es necesario en el 50% de los sujetos que respondieron a las SFU después de entre 5 y 7 años de terapia (Scheen, et al., Diabetes Res. Clin. Pract. 6:533-543, 1989).

[008] Glucophage® (Lipha Corporation, HCl de metformina) es una biguanida que disminuye el nivel de glucosa en sangre mediante la reducción de la producción de glucosa hepática y el aumento de la captación y utilización de glucosa periférica. El fármaco es efectivo para disminuir el nivel de glucosa en sangre en sujetos de leve a moderadamente afectados por la enfermedad, y no tiene los efectos secundarios de aumento de peso ni la posibilidad de provocar hipoglucemia. Sin embargo, Glucophage® tiene una serie de efectos secundarios que incluyen alteraciones gastrointestinales y acidosis láctica. Glucophage® está contraindicado en sujetos diabéticos mayores de 70 años y en sujetos con disfunción renal o hepática. Por último, las tasas de fracaso primario y secundario de Glucophage® son similares a las de las SFU.

739
133

[009] El tratamiento con insulina se instituye una vez que no se ha logrado controlar adecuadamente el nivel de glucosa en sangre mediante dieta, ejercicio y medicamentos orales. Este tratamiento tiene como desventajas que es inyectable, puede producir hipoglucemia y provoca aumento de peso.

[010] Debido a los problemas que plantean los tratamientos actuales, se necesitan nuevas terapias para tratar la diabetes tipo 2. En particular, se necesitan nuevos tratamientos para mantener la secreción de insulina (glucosa dependiente) normal. Dichos nuevos fármacos deberían tener las siguientes características: dependencia de la glucosa para promover la secreción de insulina (es decir, producir la secreción de insulina sólo en presencia de un nivel elevado de glucosa en sangre); tasas bajas de fracaso primario y secundario; y preservación de la función de las células de los islotes. La estrategia para desarrollar la nueva terapia divulgada en la presente se basa en el mecanismo de señalización del monofosfato de adenosina cíclico (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) y sus efectos en la secreción de insulina.

[011] El AMP cíclico es un importante regulador del proceso de secreción de insulina. La elevación de esta molécula de señalización promueve el cierre de los canales de K^+ tras la activación de la vía de la proteína quinasa A. El cierre de los canales de K^+ provoca la despolarización de las células y la subsecuente apertura de los canales de Ca^{++} , lo que a su vez lleva a la exocitosis de los gránulos de insulina. En ausencia de bajas concentraciones de glucosa, los efectos que se producen en la secreción de insulina son escasos o nulos (Weinhaus, et al., Diabetes 47:1428-1435, 1998). Los secretagogos, como el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (pituitary adenylate cyclase activating peptide, PACAP), el péptido intestinal vasoactivo (vasoactive intestinal peptide, VIP) y el péptido 1 similar al glucagón (glucagon-like peptide 1, GLP-1) utilizan el sistema del cAMP para regular la secreción de insulina en una forma dependiente de la glucosa (Komatsu, et al., Diabetes 46:1928-1938, 1997; Filipsson, et al., Diabetes 50:1959-1969, 2001; Drucker, Endocrinology 142:521-527, 2001). Los secretagogos de insulina que actúan a través de la elevación del cAMP, como el GLP-1, el VIP y el PACAP también pueden aumentar la síntesis de insulina, además de la liberación de insulina (Skoglund, et al., Diabetes 49:1156-1164, 2000; Borboni, et al., Endocrinology 140:5530-5537, 1999).

[012] El GLP-1 es liberado de las células L del intestino después de una comida y funciona como una hormona incretina (es decir, potencia la liberación de insulina inducida por la glucosa de la célula β pancreática). Es un péptido de 37 aminoácidos que es expresado diferencialmente por el gen del glucagón, en función del tipo de tejido. Con el GLP-1, se han recopilado datos clínicos que respaldan el efecto beneficioso de aumentar los niveles de cAMP en las células β . Las infusiones de GLP-1 en sujetos con control deficiente de la diabetes tipo 2 normalizaron sus niveles de glucosa en sangre en ayunas (Gutniak, et al., New Eng. J. Med. 326:1316-1322, 1992) y al administrar infusiones más prolongadas, se mejoró la función de las células β hasta alcanzar los niveles de los sujetos normales (Rachman, et al., Diabetes 45:1524-1530, 1996). Un informe reciente ha demostrado que el GLP-1 mejora la capacidad de las células β para responder a la

134

glucosa en sujetos con intolerancia a la glucosa (Byrne, et al., Diabetes 47:1259-1265, 1998). Sin embargo, todos estos efectos tienen poca duración debido a la corta vida media del péptido.

[013] Amylin Pharmaceuticals ha llevado a cabo ensayos clínicos con Exendin-4 (AC2993), un péptido de 39 aminoácidos originalmente identificado en el Monstruo de Gila. Amylin ha informado que los estudios clínicos demostraron un mejor control glucémico en los pacientes con diabetes tipo 2 tratados con Exendin-4. Sin embargo, la incidencia de náuseas y vómitos fue significativa.

[014] El PACAP es un potente estimulador de la secreción de insulina glucosa dependiente de las células β pancreáticas. Se han descrito tres tipos diferentes de receptores del PACAP (PAC1, VPAC1 y VPAC2) (Hamar, et al., Pharmacol. Reviews 50:265-270, 1998; Vaudry, et al., Pharmacol. Reviews 52:289-324, 2000). El PACAP no presenta selectividad para los receptores, y los tres receptores tienen actividades y potencias comparables. El PAC1 se ubica predominantemente en el sistema nervioso central, mientras que el VPAC1 y el VPAC2 tienen una distribución más amplia. El VPAC1 se ubica en el sistema nervioso central, y en el hígado, los pulmones y el intestino. El VPAC2 se ubica en el sistema nervioso central, el páncreas, el músculo esquelético, el corazón, el riñón, el tejido adiposo, el testículo y el estómago. Un trabajo reciente afirma que el VPAC2 es responsable de la secreción de insulina de las células β (Inagaki, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2679-2683, 1994; Tsutsumi, et al., Diabetes 51:1453-1460, 2002). Esta acción insulínica del PACAP es mediada por las proteínas G de unión del trifosfato de guanósina (guanosine triphosphate, GTP). La acumulación de cAMP intracelular, a su vez, activa los canales de cationes no selectivos en las células β aumentando el $[Ca^{++}]$ y promueve la exocitosis de los gránulos secretorios que contienen insulina.

[015] El PACAP es el integrante más nuevo de la superfamilia de hormonas peptídicas metabólicas, neuroendocrinas y neurotransmisoras que ejercen su acción a través de la vía de transducción de señales mediada por el cAMP (Arimura, Regul. Peptides 37:287-303, 1992). Los péptidos biológicamente activos son liberados del precursor biosintético en dos formas moleculares: como un péptido de 38 aminoácidos (PACAP-38) y/o como un péptido de 27 aminoácidos (PACAP-27) con un terminal carboxilo amidado (Arimura, *supra*).

[016] Las concentraciones más altas de las dos formas del péptido se encuentran en el cerebro y el testículo (Arimura, *supra*). La forma más corta del péptido, el PACAP-27, muestra una homología estructural del 68% con respecto al polipéptido intestinal vasoactivo (vasoactive intestinal polypeptide, VIP). Sin embargo, la distribución del PACAP y el VIP en el sistema nervioso central sugiere que estos péptidos estructuralmente relacionados tienen diferentes funciones neurotransmisoras (Koves, et al., Neuroendocrinology 54:159-169, 1991).

[017] Estudios recientes han demostrado efectos biológicos distintos del PACAP-38, que abarcan desde un papel en la reproducción (McArdle, Endocrinology 135:815-817, 1994) hasta la capacidad de estimular la secreción de insulina (Yada, et al., J. Biol. Chem. 269:1290-1293, 1994). Además, el PACAP parece desempeñar una función en la regulación hormonal del metabolismo de los lípidos y carbohidratos (Gray, et al., Mol. Endocrinol. 15:1739-47, 2001); en la

136
135

función circadiana (Hamar, et al., Cell 109: 497-508, 2002); en la función del sistema inmunitario, el crecimiento, la homeostasis energética y la reproducción masculina (Asnicar, et al., Endocrinol. 143:3994-4006, 2002); en la regulación del apetito (Tachibana, et al., Neurosci. Lett. 339:203-206, 2003); así como en las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, el choque séptico y las enfermedades autoinmunes (p. ej., el lupus eritematoso sistémico) (Pozo, Trends Mol. Med. 9:211-217, 2003).

[018] El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un péptido de 28 aminoácidos que se aisló por primera vez de la porción superior del intestino delgado del cerdo (Said y Mutt, Science 169:1217-1218, 1970; Patente estadounidense n.º 3.879.371). Este péptido pertenece a una familia de pequeños polipéptidos estructuralmente relacionados que incluye la helodermina, la secretina, las somatostatinas y el glucagón. Los efectos biológicos del VIP son mediados por la activación de las proteínas receptoras fijadas a la membrana que están acopladas al sistema de señalización del cAMP intracelular. Estos receptores se conocían originalmente como VIP-R1 y VIP-R2; sin embargo, posteriormente se descubrió que eran los mismos receptores que el VPAC1 y el VPAC2. El VIP muestra actividades y potencias comparables a las del VPAC1 y del VPAC2.

[019] Para mejorar la estabilidad del VIP en el líquido pulmonar humano, Bolln, et al., (Biopolymers 37:57-66, 1995) elaboraron una serie de variantes del VIP diseñadas para aumentar la propensión a una estructura helicoidal de este péptido y reducir la degradación proteolítica. Las sustituciones se concentraron en las posiciones 8, 12, 17 y 25-28, sobre las cuales se infirió que no eran importantes para la unión a receptores. Además, la secuencia "GGT" se pegó al C-terminal de las mutinas VIP, con la esperanza de agregar la caperuza en la hélice con mayor efectividad. Por último, para estabilizar más la hélice, se sintetizaron diversas variantes cíclicas (Patente estadounidense n.º 5.677.419). Si bien estos esfuerzos no estaban dirigidos hacia la selectividad para los receptores, dieron dos análogos que tienen mayor selectividad para el VPAC2 (Gourlet, et al., Peptides 18:403-408, 1997; Xia, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 281:629-633, 1997).

[020] Se necesitan mejores péptidos que tengan la actividad de secretagogo de insulina glucosa dependiente del PACAP, el GLP-1 o Exendin-4, pero con menos efectos secundarios y, preferentemente, que sean estables en la formulación y tengan largas vidas medias plasmáticas *in vivo*. Esa mejor vida media *in vivo* se obtiene a partir de péptidos con menor depuración y menor susceptibilidad a la proteólisis. Asimismo, un control más estricto de los niveles de glucosa en plasma puede prevenir complicaciones diabéticas a largo plazo. De este modo, los nuevos fármacos para la diabetes deberían brindar una mejor calidad de vida a los pacientes.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[021] Esta invención proporciona polipéptidos nuevos que funcionan *in vivo* como agonistas del receptor VPAC2 (en adelante, el VPAC2) y que son efectivos en el tratamiento de enfermedades y condiciones que pueden mejorar gracias a agentes que tienen actividad agonista sobre el VPAC2.

137
136

Preferentemente, los polipéptidos de esta invención son agonistas selectivos del VPAC2 y tienen mayor potencia en el VPAC2 que en el VPAC1 y el PAC1. Por ejemplo, a mero título enunciativo, estos polipéptidos estimulan la síntesis y liberación de insulina de las células β pancreáticas en una forma dependiente de la glucosa y la posterior reducción de la glucosa en plasma. Se ha demostrado que estos polipéptidos secretagogos disminuyen el nivel de glucosa en sangre *in vivo* en mayor medida que el control del vehículo al realizar una prueba de tolerancia a la glucosa. Asimismo, los polipéptidos de esta invención son estables en la formulación y tienen vidas medias plasmáticas largas y una larga duración de la acción *in vivo* cuando son derivatizados.

[022] Los polipéptidos de la presente invención tienen una mejor estabilidad a la proteólisis mediante la dipeptidil-peptidasa IV (DPP4) y en plasma, en comparación con el PACAP o el VIP. Si bien se ha informado que tanto el VIP como el PACAP27 son resistentes al clivaje mediante la DPP4 (Zhu, et al., J. Biol. Chem 278: 22418-22423, 2003), la Figura 2a demuestra que estos péptidos son clivados en puntos en el tiempo más prolongados, mientras que los péptidos de la presente invención son resistentes al clivaje en los puntos en el tiempo evaluados. Los derivados de la presente invención demuestran una duración extendida de la acción *in vivo*, lo que respalda un intervalo posológico de menos de una vez por día, y una vez por semana o más cuando son derivatizados.

[023] Los polipéptidos de la presente invención proporcionan una terapia para pacientes que tienen, por ejemplo, trastornos metabólicos como los que se producen como consecuencia de la reducción de la secreción de insulina endógena, tales como los pacientes con diabetes tipo 2, o para pacientes con intolerancia a la glucosa, un estado prediabético que se caracteriza por una alteración leve de la secreción de insulina. Además, los polipéptidos de la presente invención pueden ser útiles para prevenir y/o tratar la diabetes gestacional, la diabetes hereditaria juvenil tipo 2 (maturity-onset diabetes of the young, MODY), la diabetes autoinmune latente del adulto (latent autoimmune diabetes adult, LADA) y la dislipidemia asociada a la diabetes, y otras complicaciones diabéticas, como también la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa, la alteración de la glucosa en ayunas, la dislipidemia, la hipertrigliceridemia, el síndrome X y la resistencia a la insulina.

[024] Los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse para prevenir y/o tratar la obesidad (p. ej., regulación del apetito y la ingesta de alimentos), la enfermedad aterosclerótica, la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia, los niveles bajos de HDL, la hipertensión, la enfermedad cardiovascular (incluida la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca coronaria, la enfermedad de las arterias coronarias y la hipertensión), la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad de los vasos periféricos; y para prevenir y/o tratar el lupus, el síndrome de ovario poliquístico, la carcinogénesis y la hiperplasia, el asma, los problemas reproductivos masculinos, las úlceras, los trastornos del sueño, los trastornos del metabolismo de los lípidos y carbohidratos, la disfunción circadiana, los trastornos del crecimiento, los trastornos de la homeostasis energética, las enfermedades inmunitarias, incluidas las enfermedades autoinmunes (p. ej., el lupus eritematoso sistémico), como también las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, el choque

septicémico y otras condiciones identificadas en la presente; o bien pueden desempeñar otras funciones, que se describen más adelante en la presente.

[025] Un aspecto de la invención es un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148, y los fragmentos, derivados y variantes de éste que demuestran al menos una función biológica que es sustancialmente igual a la de los polipéptidos de los números de ID de SECUENCIA mencionados (en conjunto, los "polipéptidos de esta invención"), incluidos los equivalentes funcionales de estos. Otra aplicación de esta invención es un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 37, y las ID de SECUENCIA N.º 112 a 148, y los fragmentos, derivados y variantes de éste que demuestran al menos una función biológica que es sustancialmente igual a la de los polipéptidos de los números de ID de SECUENCIA mencionados. Otra aplicación de esta invención es un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 5, y las ID de SECUENCIA N.º 112 a 115, y los fragmentos, derivados y variantes de éste que demuestran al menos una función biológica que es sustancialmente igual a la de los polipéptidos de los números de SECUENCIA de ID mencionados. Otra aplicación de esta invención es un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 y 112, y los fragmentos, derivados y variantes de éste que demuestran al menos una función biológica que es sustancialmente igual a la de los polipéptidos de los números de ID de SECUENCIA mencionados.

[026] También se proporcionan anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a los polipéptidos de esta invención. Dichos anticuerpos son útiles para detectar los polipéptidos de esta invención, y pueden identificarse y fabricarse mediante procedimientos bien conocidos en el campo. Se han generado un anticuerpo IgG N-terminal policlonal y un anticuerpo Fab C-terminal monoclonal que reconocen los polipéptidos de esta invención.

[027] La invención también está orientada a un método para tratar la diabetes, los trastornos relacionados con la diabetes, y/u otras enfermedades o condiciones afectadas por los polipéptidos de esta invención, por ejemplo, afectadas por la función de los polipéptidos de esta invención como agonistas del VPAC2, en un mamífero, que implica administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los polipéptidos de la presente invención o cualquier polipéptido activo en el VPAC2, como los de las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148. También se divulgan los métodos de fabricación de los polipéptidos de esta invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA ILUSTRACIÓN

[028] Las Figuras 1a-1d representan las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148. Las ID de SECUENCIA N.º 112-148 se refieren a péptidos que están PEGilados en la cisteína C-terminal mediante un enlace de maleimida. El polietilenglicol (polyethylene glycol, PEG) puede ser de cualquier longitud, por ejemplo, un PEG lineal de 22 kD o

un PEG ramificado de 43 kD o más grande. La Figura 1e se refiere a los estándares de los péptidos relacionados.

[029] Las Figuras 2a y 2b representan la estabilidad de los análogos del VPAC2 ante el clivaje proteolítico mediante la DPP4.

[030] La Figura 3 representa la respuesta al cAMP de las células tratadas con los péptidos del VPAC.

[031] Las Figuras 4a y 4b representan un ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA) para la detección de péptidos.

[032] Las Figuras 5a, 5b y 5c demuestran las propiedades farmacocinéticas de los péptidos del VPAC.

[033] Las Figuras 6a, 6b, 6c y 6d ilustran la eficacia *in vivo*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[034] Esta invención proporciona polipéptidos nuevos, y fragmentos, derivados y variantes de éstos que demuestran al menos una función biológica que es sustancialmente igual a la de los polipéptidos de las Figuras 1a-1d (en conjunto, los polipéptidos de esta invención). Los polipéptidos de esta invención funcionan *in vivo* como agonistas del VPAC2 y pueden usarse para prevenir y/o tratar enfermedades o condiciones como la diabetes, incluida la diabetes tipo 2, la diabetes gestacional, la diabetes hereditaria juvenil tipo 2 (MODY) (Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994); la diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) (Zimmet, et al., Diabetes Med. 11:299, 1994); y la dislipidemia asociada a la diabetes y otras complicaciones diabéticas, como también la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa, la alteración de la glucosa en ayunas, la dislipidemia, la hipertrigliceridemia, el síndrome X y la resistencia a la insulina.

[035] Además, los polipéptidos de la presente invención también pueden utilizarse para prevenir y/o tratar la obesidad (p. ej., la regulación del apetito y la ingesta de alimentos), la enfermedad aterosclerótica, la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia, los niveles bajos de HDL, la hipertensión, la enfermedad cardiovascular (incluida la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca coronaria, la enfermedad de las arterias coronarias y la hipertensión), la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad de los vasos periféricos; y para prevenir y/o tratar el lupus, el síndrome de ovario poliquístico, la carcinogénesis y la hiperplasia, el asma, los problemas reproductivos masculinos, incluida la motilidad del espermatozoide humano, las úlceras, los trastornos del sueño y otras condiciones identificadas en el presente; o bien pueden desempeñar otras funciones, que se describen más adelante en la presente.

[036] Asimismo, los polipéptidos de esta invención estimulan la liberación de insulina de las células β pancreáticas en una forma dependiente de la glucosa. Los polipéptidos de esta

invención también son estables en formulaciones acuosas y no acuosas, y exhiben una vida media plasmática de más de una hora, por ejemplo, de más de 6 horas.

[037] Los polipéptidos de esta invención son agonistas del VPAC2. Son agonistas selectivos del VPAC2 que tienen como mínimo, por ejemplo, una selectividad para el VPAC2 igual a 10 veces la que tienen para el VPAC1 y/o el PAC1. Los polipéptidos de esta invención estimulan la liberación de insulina en el plasma en una forma dependiente de la glucosa sin provocar estasis ni aumento del nivel de glucosa en plasma que es contraproducente para el tratamiento, por ejemplo, de la diabetes tipo 2. Además, los polipéptidos de esta invención son agonistas selectivos del receptor VPAC2; de este modo, por ejemplo, provocan un aumento en la liberación de insulina en el plasma, a la vez que son selectivos respecto de otros receptores que son responsables de efectos secundarios desagradables o peligrosos, como la retención de agua en el tubo gastrointestinal y/o efectos cardiovasculares no deseados, como aumento de la frecuencia cardíaca o la presión arterial.

[038] Los polipéptidos de esta invención también son estables en formulaciones acuosas y no acuosas. Por ejemplo, los polipéptidos de esta invención exhiben una degradación menor al 10% a 37-40 °C durante un período de una semana, cuando se disuelven en agua (a un pH de entre 7-8) o en un solvente orgánico no acuoso. Asimismo, las composiciones y formulaciones de la presente invención pueden comprender los polipéptidos de la presente invención, y uno o más de los vehículos farmacéuticamente aceptables, los diluyentes farmacéuticamente aceptables y los solventes farmacéuticamente aceptables.

[039] Los polipéptidos de esta invención proporcionan una terapia para los pacientes con una reducción de la secreción de insulina endógena o con intolerancia a la glucosa, por ejemplo, diabetes tipo 2. Es decir que los polipéptidos de la presente invención son agonistas del VPAC2 de acción prolongada que pueden usarse para mantener, mejorar y restablecer la secreción de insulina estimulada por la glucosa. Asimismo, un péptido agonista selectivo del receptor VPAC2 aumenta la secreción de insulina dependiente de la glucosa en el páncreas, sin provocar los efectos secundarios asociados con la activación no selectiva de los otros receptores del PACAP.

[040] Ciertos términos que se usan a lo largo de esta especificación se definen a continuación y otros se definirán a medida que aparezcan. A continuación se incluye la abreviatura de una sola letra para un aminoácido específico, su aminoácido correspondiente y la abreviatura de tres letras: A, alanina (ala); C, cisteína (cys); D, ácido aspártico (asp); E, ácido glutámico (glu); F, fenilalanina (phe); G, glicina (gly); H, histidina (his); I, isoleucina (ile); K, lisina (lys); L, leucina (leu); M, metionina (met); N, asparagina (asn); P, prolina (pro); Q, glutamina (gln); R, arginina (arg); S, serina (ser); T, treonina (thr); V, valina (val); W, triptofano (trp); e Y, tirosina (tyr).

[041] Las expresiones "equivalente funcional" y "sustancialmente la misma función o actividad biológica" significan el grado de actividad biológica que se encuentra comprendido aproximadamente entre el 30% y el 100% o más de la actividad biológica demostrada por el polipéptido con el que se está haciendo la comparación, cuando la actividad biológica de cada

144
140

polipéptido se determina mediante el mismo procedimiento. Por ejemplo, un polipéptido que es funcionalmente equivalente a un polipéptido de la Figura 1 es aquel que, al ser evaluado con el ensayo de centelleo por proximidad para el AMP cíclico (cAMP) del Ejemplo 9, demuestra la acumulación del cAMP en la línea celular de ovario de hámster chino (Chinese Hamster Ovary, CHO) que expresa el receptor VPAC2 humano.

[042] Los términos "fragmento", "derivado" y "variante", referidos a los polipéptidos de la Figura 1, significan los fragmentos, derivados y variantes de los polipéptidos que conservan sustancialmente la misma función o actividad biológica que dichos polipéptidos, tal como se describe más detalladamente a continuación.

[043] Un análogo incluye un pro-polipéptido que incluye en su interior la secuencia de aminoácidos del polipéptido de esta invención. El polipéptido activo de esta invención puede ser clivado a partir de los aminoácidos adicionales que completan la molécula del pro-polipéptido mediante procesos *in vivo* naturales, o mediante procedimientos bien conocidos en el campo, tales como el clivaje enzimático o químico. Por ejemplo, el péptido VIP nativo de 28 aminoácidos se expresa naturalmente como un polipéptido mucho más grande que luego se procesa *in vivo* para liberar el péptido maduro activo de 28 aminoácidos.

[044] Un fragmento es una porción del polipéptido que conserva una actividad funcional sustancialmente similar, tal como se describe en los modelos *in vivo* divulgados en la presente.

[045] Un derivado incluye todas las modificaciones al polipéptido que preservan sustancialmente las funciones divulgadas en la presente e incluyen una estructura y función relacionada adicionales (p. ej., polipéptidos PEGilados o acetilados que tienen una mayor vida media), polipéptidos de fusión que confieren una mayor vida media, orientados a la especificidad o actividad adicional, como una reducción de la toxicidad para un objetivo propuesto, tal como se describe más detalladamente a continuación.

[046] El fragmento, derivado o variante de los polipéptidos de la presente invención puede ser (i) aquel en el cual uno o más de los residuos de aminoácidos son sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede estar o no codificado por el código genético; (ii) aquel en el cual uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente; (iii) aquel en el cual el grupo acetilo N-terminal es reemplazado por otro sustituyente en uno o más de los tres primeros aminoácidos o aquel en el cual uno o más de los tres primeros aminoácidos es sustituido por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede estar o no codificado por el código genético, a fin de conferir resistencia a la proteólisis; (iv) aquel en el cual el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, como un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido (p. ej., polietilenglicol o ácido graso); (v) aquel en el cual los aminoácidos adicionales se fusionan con el polipéptido maduro, como una secuencia líder o secretoria, o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia

142
141

propolipeptídica, o (vi) aquel en el cual la secuencia polipeptídica se fusiona con un polipéptido más grande (p. ej., una albúmina humana, un anticuerpo o Fc para aumentar la duración del efecto). Dichos fragmentos, derivados, y variantes y análogos se consideran incluidos dentro del alcance de los especialistas en la materia de conformidad con lo descrito en la presente.

[047] Los derivados de la presente invención pueden contener sustituciones de aminoácidos conservadoras (definidas más detalladamente a continuación) que se realizan en uno o más residuos de aminoácidos previstos, preferentemente no esenciales. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse a partir de la secuencia natural de una proteína sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" es necesario para la actividad biológica. Una "sustitución de un aminoácido conservadora" es aquella en la cual el residuo de aminoácido es reemplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en el campo. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales beta ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tiroslina, fenilalanina, triptofano, histidina). No se realizarían sustituciones no conservadoras para los residuos de aminoácidos conservados ni para los residuos de aminoácidos que residen dentro del dominio de una proteína conservada, como los residuos 19 y 27 que son esenciales para la actividad de la proteína, como la actividad del VPAC2 y/o la selectividad para el VPAC2. Los fragmentos o las porciones biológicamente activas incluyen fragmentos de polipéptidos apropiados para su uso como medicamento, para generar anticuerpos, como un reactivo para investigaciones, y para usos similares. Los fragmentos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares a las secuencias de aminoácidos de un polipéptido de esta invención o derivadas de éstas, y que exhiben al menos una actividad de ese polipéptido, pero que incluyen menos aminoácidos que los polipéptidos de longitud completa divulgados en la presente. Por lo general, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo que tenga al menos una actividad del polipéptido. Una porción biológicamente activa de un polipéptido puede, por ejemplo, ser un péptido que tenga una longitud de cinco o más aminoácidos. Dichas porciones biológicamente activas pueden prepararse sintéticamente o mediante técnicas recombinantes, y pueden ser evaluadas en relación con una o más de las actividades funcionales de un polipéptido de esta invención por los medios divulgados en la presente y/o bien conocidos en el campo.

[048] Las variantes de los polipéptidos de esta invención incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos de los números de ID de SECUENCIA de la Figura 1 (a-d) o un dominio de estos. El término "suficientemente similar" significa una primera secuencia de aminoácidos que contiene una cantidad suficiente o mínima de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes a los de una segunda secuencia de

143
142

aminoácidos, de forma tal que la primera y segunda secuencia de aminoácidos tienen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que es al menos alrededor de un 45% idéntico, alrededor de un 75% a un 98% idéntico, o que es idéntico son definidas en la presente como suficientemente similares. Por ejemplo, las variantes pueden ser suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de esta invención.

[049] Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en cuanto a la secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis. Las variantes que funcionan como agonistas del VPAC2 pueden identificarse mediante el cribado de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes por truncamiento, de los polipéptidos de esta invención en relación con la actividad agonista sobre el VPAC2.

[050] Además, los derivados de la presente invención incluyen polipéptidos maduros que se han fusionado con otro compuesto, por ejemplo un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido y/o reducir la posible inmunogenicidad del polipéptido (p. ej., polietilenglicol ["PEG"] o ácido graso). En el caso de la PEGilación, la fusión del polipéptido con el PEG puede lograrse por cualquier medio conocido por una persona idónea en la materia. Por ejemplo, la PEGilación puede lograrse introduciendo primero una mutación en la cisteína en el polipéptido para proporcionar un enlace al cual pueda unirse el PEG, seguida de la derivatización específica para el sitio con PEG-maleimida. Como ejemplo, se puede agregar la cisteína al C-terminal de los péptidos (ver, p. ej., Tsutsumi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(15):8548-53, 2000; Veronesi, Biomaterials 22:405-417, 2001; Goodsoon y Katre, Bio/Technology 8:343-346, 1990). Además de la maleimida, hay numerosos grupos reactivos de Cys que son conocidos para los especialistas en la materia del entrecruzamiento de proteínas, como el uso de halogenuros de alquilo y sulfonas vinílicas (ver, p. ej., T. E. Creighton, Proteins, 2^a Ed., 1993). Además, el PEG puede introducirse mediante unión directa al grupo carboxilato C-terminal, a la cadena lateral de un C-terminal, a un aminoácido interno, como Cys, Lys, Asp o Glu, o a aminoácidos no naturales que contengan fracciones de cadenas laterales reactivas similares.

[051] El enlace entre el PEG y el grupo de entrecruzamiento de péptidos puede variar. Por ejemplo, el PEG de 40 kDa reactivo para Cys (mPEG2-MAL; Nektar, San Carlos, CA) disponible comercialmente emplea un grupo maleimida para la conjugación con la Cys, y el grupo maleimida se une al PEG mediante un enlace que contiene una Lys. Como segundo ejemplo, el PEG de 43 kDa reactivo para Cys (GL2-400MA; NOF, Tokio, Japón) disponible comercialmente emplea un grupo maleimida para la conjugación con la Cys, y el grupo maleimida se une al PEG mediante un enlace alcano disustituido.

[052] La presente invención ejemplifica, a mero título enunciativo, el uso de Cys como un sitio de entrecruzamiento. Es bien conocido que otras fracciones presentes en los aminoácidos como el grupo amino N-terminal, el carboxilato C-terminal y las cadenas laterales de aminoácidos como Lys, Arg, Asp o Glu, proporcionan grupos reactivos con fracciones adecuadas para la modificación

146
143

covalente y la unión al PEG. Hay numerosos ejemplos de agentes de entrecruzamiento apropiados que son conocidos para los especialistas en la materia (ver, p. ej., T. E. Creighton, *Proteins*, 2^a Ed., 1993). Dichos agentes de entrecruzamiento pueden unirse al PEG según se ilustra, a título enunciativo, mediante derivados del PEG disponibles comercialmente que contienen aminas, aldehídos, acetales, maleimidas, succinimidas y tioles que están disponibles comercialmente, por ejemplo, Nektar y NOF (p. ej., Harris, et al., *Clin. Pharmacokinet.* 40, 539-551, 2001).

[053] La invención también proporciona polipéptidos quiméricos o de fusión. Los polipéptidos de esta invención pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por uniones peptídicas o uniones peptídicas modificadas (es decir, isómeros peptídicos) y pueden contener aminoácidos que no sean los 20 aminoácidos codificados por los genes. Los polipéptidos pueden ser modificados mediante procesos naturales, como el procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en el campo. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, como también en la bibliografía de investigación. Pueden producirse modificaciones en cualquier parte de un polipéptido, incluida la cadena principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y el terminal amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en igual o distinto grado en diversos sitios de un polipéptido determinado. Además, un polipéptido determinado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, los polipéptidos ramificados y los polipéptidos cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos postraduccionales naturales o fabricarse mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclización, formación de unión disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formulación, gamma carboxilación, glicosilación, formación de anclaje de glicosil fosfatidilinositol (Glycosyl Phosphatidylinositol, GPI), hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por el ARN de transferencia, como la arginilación y ubiquitinación (ver, p. ej., Proteins, Structure and Molecular Properties, 2.a ed., T. E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter, et al., *Meth. Enzymol* 182:826-846, 1990; Rattan, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62, 1992).

[054] Los polipéptidos de la presente invención incluyen los polipéptidos de la Figura 1a-d (ID de SECUENCIA N.º 1 a 148), como también las secuencias que tengan variaciones insustanciales con respecto a estos. Una "variación insustancial" incluiría cualquier adición, sustitución o

145
149

eliminación de la secuencia que mantenga sustancialmente, al menos, una función biológica de los polipéptidos de esta invención, por ejemplo, la actividad agonista sobre el VPAC2, la actividad agonista selectiva sobre el VPAC2 o la actividad de secreción de insulina demostrada en la presente. Estos equivalentes funcionales pueden incluir polipéptidos que tengan al menos una identidad de aproximadamente el 90%, el 95% o el 97% con los polipéptidos de la Figura 1a-d, y también incluyen las porciones de dichos polipéptidos que tengan sustancialmente la misma actividad biológica. Sin embargo, cualquier polipéptido que tenga una variación insustancial en la secuencia de aminoácidos con respecto a los polipéptidos de la Figura 1a-d y que demuestre una equivalencia funcional tal como se describe más detalladamente en la presente está incluido en la descripción de la presente invención.

[055] Como se conoce en el campo, la "similitud" entre dos polipéptidos puede determinarse comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Dichas sustituciones conservadoras incluyen las descritas anteriormente, y las descritas por Dayhoff (The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978) y por Argos (EMBO J. 8:779-785, 1989). Por ejemplo, los aminoácidos pertenecientes a uno de los siguientes grupos representan cambios conservadores:

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

[056] Los polipéptidos de esta invención pueden ser un producto de procedimientos sintéticos químicos y, como tal, un polipéptido de esta invención aislado o purificado, o una parte biológicamente activa de éste, puede estar sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando esté sintetizado químicamente. Por ejemplo, un polipéptido de esta invención aislado puede tener menos que aproximadamente el 30% (en peso seco) de material no polipeptídico o contaminante. Cuando un péptido de esta invención es producido mediante síntesis química, los preparados pueden contener menos de aproximadamente el 30%, en peso seco, de precursores químicos o sustancias químicas no incluidas en la invención.

[057] Los polipéptidos de esta invención pueden ser aislados de manera conveniente tal como se describe en los ejemplos específicos incluidos a continuación. Un preparado de polipéptido purificado, por ejemplo, tiene una pureza mínima de aproximadamente el 70%; o una pureza de aproximadamente el 85% al 99%. La pureza de los preparados puede evaluarse por cualquier medio conocido en el campo, como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate, SDS) y espectroscopia de masas/cromatografía líquida.

[055] También se proporcionan los péptidos y compuestos relacionados (p. ej., molécula pequeña) que son comprendidos por los especialistas en la materia, como sustancias químicas miméticas, moléculas orgánicas miméticas o péptidos miméticos. Tal como se usan en la presente, se pretende que los términos "mimético", "péptido mimético", "molécula orgánica mimética" y "sustancia química mimética" comprendan los derivados de péptidos, los análogos de péptidos y los compuestos químicos que tienen una disposición de los átomos en una orientación tridimensional que es equivalente a la de un péptido de la presente invención. Se entiende que la frase "equivalente a", tal como se usa en la presente, comprende los péptidos o compuestos que tienen una o más sustituciones de determinados átomos o fracciones químicas en dicho péptido, que tienen longitudes de unión, ángulos de unión y disposiciones en el compuesto mimético que producen una disposición u orientación de dichos átomos y fracciones igual o suficientemente similar como para tener la función biológica de los péptidos de la invención. En los péptidos miméticos de la invención, la disposición tridimensional de los constituyentes químicos es estructural y/o funcionalmente equivalente a la disposición tridimensional de la cadena principal del péptido y las cadenas laterales de aminoácidos componentes del péptido; como resultado de ello, dichos péptidos miméticos, moléculas orgánicas miméticas y sustancias químicas miméticas de los péptidos de la invención tienen actividad biológica sustancial. Estos términos se usan conforme a lo que se sabe en la materia, como ilustra, por ejemplo, Fauchere, (Adv. Drug Res. 15:29, 1986); Veber y Freidinger, (TINS p.392, 1985); y Evans, et al., (J. Med. Chem. 30:1229, 1987), que se incluye en la presente por referencia.

[059] Se entiende que existe un farmacóforo para la actividad biológica de cada péptido de la invención. En este campo se entiende que un farmacóforo comprende una definición idealizada tridimensional de los requisitos estructurales para la actividad biológica. Los péptidos miméticos, moléculas orgánicas miméticas y sustancias químicas miméticas pueden ser diseñados de modo que se ajusten a cada farmacóforo con el software actual de modelización por computadora (diseño de fármacos asistido por computadora). Dichas sustancias miméticas pueden ser producidas mediante un análisis de estructura-función, sobre la base de la información posicional de los átomos sustituyentes en los péptidos de la invención.

[060] Los péptidos tal como son proporcionados por la invención pueden ser sintetizados ventajosamente mediante cualquiera de las técnicas de síntesis química conocidas en el campo, particularmente las técnicas de síntesis en fase sólida, por ejemplo, usando sintetizadores automáticos de péptidos disponibles comercialmente. Las sustancias miméticas de la presente invención pueden sintetizarse mediante los métodos en fase sólida o en fase de solución utilizados convencionalmente para la síntesis de péptidos (ver, p. ej., Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54, 1963; Carpino, Acc. Chem. Res. 6:191-98, 1973; Birr, Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis, Springer-Verlag: Heidelberg, 1978; The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1, 2, 3 y 5, (Gross y Melnhofer, eds.), Academic Press: Nueva York, 1979; Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2.a ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, Ill., 1984; Kent, Ann. Rev.

747
196

Biochem. 57:957-89, 1988; y Gregg, et al., Int. J. Peptide Protein Res. 55:161-214, 1990, que se incluyen en su totalidad en la presente por referencia).

[061] Por ejemplo, puede utilizarse la metodología en fase sólida. Brevemente, un residuo de aminoácido C-terminal N-protégido se une a un soporte insoluble, como poliestireno entrecruzado con divinilbenceno, resina de poliacrilamida, Kieselguhr/poliamida (Pepsyn K), vidrio de poro controlado, celulosa, membranas de polipropileno, varillas de polietileno recubiertas con ácido acrílico u otros similares. Los ciclos de desprotección, neutralización y acoplamiento de derivados de aminoácidos protegidos sucesivos se usan para unir los aminoácidos del C-terminal, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos. Para algunos péptidos sintéticos, puede usarse una estrategia Fmoc, usando una resina sensible al ácido. En este sentido, los soportes sólidos son resinas de poliestireno entrecruzado con divinilbenceno, que están comercialmente disponibles en diversas formas funcionalizadas, que incluyen la resina de clorometilo, la resina de hidroximetilo, la resina de paraacetamidometilo, la resina de bencidrilamina (BHA), la resina de 4-metilbencidrilamina (MBHA), las resinas de oxima, la resina de alcohol 4-alcoxibencillico (resina Wang), la resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil aminometil)-fenoximetilo, la resina de 2,4-dimetoxibencidrilamina y la resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-amino-metil)-fenoxiacetamidonorleucil-MBHA (resina Rink amida MBHA). Además, las resinas sensibles al ácido también proporcionan ácidos C-terminales, si se desea. Un grupo protector de los aminoácidos alfa es el 9-fluorenilmetoxi-carbonilo (Fmoc) lábil a bases.

[062] Los grupos protectores adecuados de las funcionalidades de las cadenas laterales de aminoácidos químicamente compatibles con los grupos BOC (t-butiloxycarbonilo) y Fmoc son bien conocidos en el campo. Al usar la química del Fmoc, se prefieren los siguientes derivados de aminoácidos protegidos: Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Ser(But), Fmoc-Asn(Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Thr(Trt), Fmoc-Val, Fmoc-Gly, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Glu(Obut), Fmoc-His(Trt), Fmoc-Tyr(But), Fmoc-Arg(PMC (2,2,5,7,8-pentametilcroman-8-sulfonilo)), Fmoc-Arg(BOC), Fmoc-Pro y Fmoc-Trp(BOC). Los residuos de aminoácidos pueden acoplarse utilizando diversos agentes y químicas de acoplamiento conocidos en el campo, como acoplamiento directo con DIC (diisopropilcarbodiimida), DCC (diciclohexilcarbodiimida), BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilaminofosfonio)), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(pirrolidinofosfonio)), PyBrOP (hexafluorofosfato de bromo-tris(pirrolidinofosfonio)); mediante anhídridos simétricos preformados; mediante ésteres activos, como ésteres de pentafluorofenilo; o mediante ésteres activos de HOBt (1-hidroxibenzotriazol) preformados o utilizando fluoruro y cloruros de aminoácidos con Fmoc, o utilizando N-carboxi anhídridos de aminoácidos con Fmoc. Se prefiere la activación con HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il),1,1,3,3-tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de 2-(1H-7-aza-benzotriazol-1-il),1,1,3,3-tetrametiluronio) en presencia de HOBt o HOAt (7-azahidroxibenzotriazol).

[063] El método en fase sólida puede llevarse a cabo manualmente, si bien puede usarse la síntesis automática mediante un sintetizador de péptidos disponible comercialmente (p. ej.,

148
147

Applied Biosystems 431A u otro similar; Applied Biosystems, Foster City, CA). En una síntesis típica, el primer aminoácido (C-terminal) se carga en la resina de clorotritilo. Se puede usar la desprotección sucesiva (con piperidina al 20%/NMP (N-metilpirrolidona)) y ciclos de acoplamiento de acuerdo con los protocolos ABI FastMoc (Applied Biosystems), a fin de generar la secuencia peptídica. También puede usarse el acoplamiento doble y triple, con adición de caperuza mediante anhídrido acético.

[064] El péptido mimético sintético puede clivarse de la resina y desprotegerse mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (trifluoroacetic acid, TFA) que contenga los antioxidantes apropiados. También pueden usarse muchos de estos reactivos de clivaje, como el reactivo K (0,75 g de fenol cristalino, 0,25 mL de etanoditol, 0,5 mL de tioanisol, 0,5 mL de agua desionizada y 10 mL de TFA) y otros reactivos. El péptido puede separarse de la resina mediante filtración y aislarse mediante precipitación con éter. Puede lograrse la purificación ulterior mediante métodos convencionales, como filtración por gel y cromatografía líquida de alto rendimiento (high performance liquid chromatography, HPLC) en fase invertida. Los péptidos miméticos sintéticos de acuerdo con la presente invención pueden tener la forma de sales farmacéuticamente aceptables, especialmente sales con adición de una base, incluidas las sales de bases orgánicas y bases inorgánicas. Las sales con adición de base de los residuos de aminoácidos ácidos pueden prepararse mediante el tratamiento del péptido con la base o base inorgánica apropiada, de acuerdo con los procedimientos bien conocidos por los especialistas en la materia, o también, la sal deseada puede obtenerse directamente mediante la liofilización de la base apropiada.

[065] Por lo general, los especialistas en la materia reconocerán que los péptidos como los descritos en la presente pueden modificarse mediante diversas técnicas químicas, a fin de producir péptidos que tengan esencialmente la misma actividad que el péptido no modificado, y que opcionalmente tengan otras propiedades deseables. Por ejemplo, los grupos de ácido carboxílico del péptido pueden proporcionarse en la forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable. Los grupos amino del péptido pueden tener la forma de una sal con adición de un ácido farmacéuticamente aceptable, como HCl, HBr, y sales de ácido acético, benzoico, tolueno sulfónico, maleico, tartárico, y otras sales orgánicas, o pueden convertirse en una amida. Los tioles pueden protegerse mediante cualquiera de diversos grupos protectores bien reconocidos, como los grupos acetamida. Los especialistas en la materia reconocerán también métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de esta invención, a fin de aproximarse más a la configuración de unión nativa. Por ejemplo, se puede agregar al péptido un residuo de cisteína carboxilo terminal o amino terminal, de modo que al ser oxidado el péptido contenga una unión disulfuro, generando de este modo un péptido cíclico. Otros métodos de ciclización de péptidos incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres carboxilo y amino terminales.

[066] Específicamente, se dispone de diversas técnicas para construir derivados y análogos de péptidos con una actividad biológica deseable igual o similar a la del péptido correspondiente, pero con una actividad más favorable que la del péptido con respecto a la solubilidad, estabilidad

145
148

y susceptibilidad a la hidrólisis y proteólisis. Dichos derivados y análogos incluyen péptidos modificados en el grupo amino N-terminal, el grupo carboxilo C-terminal y/o el cambio de uno o más de los enlaces amido en el péptido por un enlace no amido. Se entiende que dos o más de dichas modificaciones pueden acoplarse en la estructura de un péptido mimético (p. ej., la modificación en el grupo carboxilo C-terminal y la inclusión de un enlace carbamato-CH₂ entre dos aminoácidos del péptido).

[067] Las modificaciones en los amino terminales incluyen la alquilación, la acetilación, la adición de un grupo carbobenzilo y la formación de un grupo succinimida. Específicamente, se puede hacer reaccionar al grupo amino N-terminal para que forme un grupo amida de la fórmula RC(O)NH-, donde R es un alquilo, por ejemplo, un alquilo inferior, y se agrega mediante la reacción con un halogenuro de ácido, RC(O)Cl o anhídrido de ácido. Por lo general, la reacción puede llevarse a cabo mediante el contacto de cantidades aproximadamente equimolares o en exceso (p. ej., aproximadamente 5 equivalentes) de un halogenuro de ácido con el péptido en un diluyente inerte (p. ej., diclorometano), que preferentemente contenga un exceso (p. ej., aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, como la diisopropilietilamina, para recoger el ácido generado durante la reacción. Las demás condiciones en que se produce la reacción son las convencionales (p. ej., temperatura ambiente durante 30 minutos). La alquilación del amino terminal para proporcionar una N-sustitución de un alquilo inferior seguida de una reacción con un halogenuro de ácido, tal como se describió anteriormente, proporcionará un grupo amida N-alquilo de la fórmula RC(O)NR-. En forma alternativa, el amino terminal puede unirse en forma covalente al grupo succinimida mediante la reacción con anhídrido succínico. Se usa una cantidad aproximadamente equimolar o un exceso de anhídrido succínico (p. ej., aproximadamente 5 equivalentes) y el grupo amino terminal se convierte en la succinimida mediante métodos bien conocidos en el campo, que incluyen el uso de un exceso (p. ej., 10 equivalentes) de una amina terciaria, como la diisopropilietilamina, en un solvente inerte apropiado (p. ej., diclorometano), tal como se describe en Wollenberg, et al., (Patente estadounidense n.º 4.612.132), que se incorpora en su totalidad en la presente por referencia. También se entiende que el grupo succínico podrá sustituirse, por ejemplo, por un C₂ a C₆ alquilo o sustituyentes -SR, que son preparados de manera convencional para proporcionar la succinimida sustituida en el N-terminal del péptido. Dichos sustituyentes alquilo pueden prepararse mediante la reacción de una olefina inferior (C₂ a C₆ alquilo) con anhídrido maleico de la manera descrita por Wollenberg, et al., *supra.*, y los sustituyentes -SR pueden prepararse mediante la reacción de RSH con anhídrido maleico, donde R es lo que se definió anteriormente. En otra aplicación ventajosa, el amino terminal puede ser derivatizado para formar un grupo bencloxycarbonil-NH- o bencloxycarbonil-NH- sustituido. Este derivado puede producirse mediante la reacción con una cantidad aproximadamente equivalente o un exceso de cloruro de bencloxycarbonilo (CBZ-Cl) o un CBZ-Cl sustituido en un diluyente inerte apropiado (p. ej., diclorometano) que contenga, por ejemplo, una amina terciaria para recoger el ácido generado durante la reacción. En aún otro derivado, el N-terminal comprende un grupo sulfonamida mediante la reacción con una cantidad

equivalente o un exceso (p. ej., 5 equivalentes) de $R-S(O)_2Cl$ en un diluyente inerte apropiado (diclorometano) para convertir la amina terminal en una sulfonamida, donde R es un alquilo y preferentemente, un alquilo inferior. Por ejemplo, el diluyente inerte puede contener un exceso de una amina terciaria (p. ej., 10 equivalentes), como la diisopropilietilamina, para recoger el ácido generado durante la reacción. Las demás condiciones en que se produce la reacción son las convencionales (p. ej., temperatura ambiente durante 30 minutos). Los grupos carbamato pueden producirse en el amino terminal mediante la reacción con una cantidad equivalente o un exceso (p. ej., 5 equivalentes) de $R-OC(O)Cl$ o $R-OC(O)OC_6H_4-p-NO_2$ en un diluyente inerte apropiado (p. ej., diclorometano) para convertir la amina terminal en carbamato, donde R es un alquilo y preferentemente, un alquilo inferior. Por ejemplo, el diluyente inerte puede contener un exceso (p. ej., aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, como la diisopropilietilamina, para recoger cualquier ácido generado durante la reacción. Las demás condiciones en que se produce la reacción son las convencionales (p. ej., temperatura ambiente durante 30 minutos). Pueden formarse grupos urea en el amino terminal mediante la reacción con una cantidad equivalente o un exceso (p. ej., 5 equivalentes) de $R-N=C=O$ en un diluyente inerte apropiado (p. ej., diclorometano) para convertir la amina terminal en un grupo urea (es decir, $RNHC(O)NH-$), donde R es lo que se definió anteriormente. Por ejemplo, el diluyente inerte puede contener un exceso (p. ej., aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, como la diisopropilietilamina. Las demás condiciones en que se produce la reacción son las convencionales (p. ej., temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos).

[068] Al preparar péptidos miméticos donde el grupo carboxilo C-terminal puede ser reemplazado por un éster (p. ej., $-C(O)OR$, donde R es un alquilo y preferentemente, un alquilo inferior), pueden emplearse las resinas utilizadas para preparar los ácidos peptídicos, y el péptido protegido por la cadena lateral puede clivarse con una base y con el alcohol apropiado (p. ej., metanol). Los grupos protectores de la cadena lateral pueden removerse del modo habitual mediante el tratamiento con fluoruro de hidrógeno, a fin de obtener el éster deseado. Al preparar péptidos miméticos donde el grupo carboxilo C-terminal es reemplazado por la amida $-C(O)NR_3R_4$, se utiliza una resina de bencidrilamina como soporte sólido para la síntesis peptídica. Al completarse la síntesis, el tratamiento con fluoruro de hidrógeno para liberar el péptido del soporte da como resultado directo la amida peptídica libre (es decir, el C-terminal es $-C(O)NH_2$). En forma alternativa, el uso de la resina clorometilada durante la síntesis peptídica junto con la reacción con amoníaco para clivar el péptido protegido por la cadena lateral del soporte da la amida peptídica libre, y la reacción con una alquilamina o dialquilamina da una alquillamida o dialquillamida protegida por la cadena lateral (es decir, el C-terminal es $-C(O)NRR_1$, donde R y R_1 son alquillos y preferentemente, alquillos inferiores). Luego se remueve la protección de la cadena lateral del modo habitual, mediante el tratamiento con fluoruro de hidrógeno, a fin de obtener las amidas, alquillamidas o dialquillamidas libres.

[069] En otra aplicación alternativa, se puede inducir la ciclización del grupo carboxilo C-terminal o de un éster C-terminal mediante el desplazamiento del $-OH$ o el éster ($-OR$) del grupo

187
150

carboxilo o éster, respectivamente, con el grupo amino N-terminal para formar un péptido cíclico. Por ejemplo, después de la síntesis y el clivaje para dar el ácido peptídico, el ácido libre se convierte en solución en un éster activado mediante un grupo carboxilo activador apropiado, como la diciclohexilcarbodiimida (DCC), por ejemplo, en cloruro de metileno (CH_2Cl_2), formamida de dimetilo (DMF) o mezclas de estos. El péptido cíclico se forma luego mediante el desplazamiento del éster activado con la amina N-terminal. La ciclización, más que la polimerización, puede mejorarse mediante el uso de soluciones muy diluidas de acuerdo con los métodos bien conocidos en el campo.

[070] Los péptidos miméticos, según se entiende en el campo y tal como son proporcionados por la invención, son estructuralmente similares al péptido de la invención, pero tienen uno o más enlaces peptídicos que pueden reemplazarse por un enlace seleccionado del grupo compuesto por: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (conformeros *cis* y *trans*), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, mediante los métodos conocidos en el campo y descritos más detalladamente en las siguientes referencias: Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, (Weinstein, ed.), Marcel Dekker: Nueva York, pág. 267, 1983; Spatola, Peptide Backbone Modifications 1:3, 1983; Morley, Trends Pharm. Sci. págs. 463-466, 1980; Hudson, et al., Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185, 1979; Spatola, et al., Life Sci. 36:1243-1249, 1986; Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 307-314, 1982; Almquist, et al., J. Med. Chem. 23:1392-1398, 1980; Jennings-White, et al., Tetrahedron Lett. 23:2533, 1982; Szelke, et al., EP045665A; Holladay, et al., Tetrahedron Lett. 24:4401-4404, 1983; y Hruby, Life Sci. 31:189-199, 1982; cada una de las cuales se incluye en la presente por referencia. Dichos péptidos miméticos tienen ventajas significativas con respecto a las aplicaciones polipeptídicas, que incluyen por ejemplo, costo de producción más económico, mayor estabilidad química o mejores propiedades farmacológicas (tales como vida media, absorción, potencia, eficacia, etc.), antigenicidad reducida, y otras propiedades.

[071] Los análogos miméticos de los péptidos de la invención también pueden obtenerse usando los principios del diseño de fármacos convencional o racional (ver, p. ej., Andrews, et al., Proc. Alfred Benzon Symp. 28:145-165, 1990; McPherson, Eur. J. Biochem. 189:1-24, 1990; Hol, et al., en Molecular Recognition: Chemical and Biochemical Problems, (Roberts, ed.); Royal Society of Chemistry; págs. 84-93, 1989a; Hol, Arzneim-Forsch. 39:1016-1018, 1989b; Hol, Agnew Chem. Int. Ed. Engl. 25:767-778, 1986; cuyas divulgaciones se incluyen en la presente por referencia).

[072] De acuerdo con los métodos del diseño de fármacos convencional, las moléculas miméticas deseadas pueden obtenerse evaluando en forma aleatoria las moléculas cuyas estructuras tengan un atributo en común con la estructura de un péptido "nativo". La contribución cuantitativa que se obtiene al cambiar un grupo específico de una molécula de unión puede determinarse midiendo la actividad biológica de la sustancia mimética supuesta en comparación con la actividad del péptido. En una aplicación del diseño de fármacos racional, la sustancia mimética es diseñada para que comparta un atributo de la conformación tridimensional más

282
151

estable del péptido. De este modo, por ejemplo, la sustancia mimética puede estar diseñada para poseer grupos químicos que estén orientados de forma tal que sea suficiente para provocar interacciones iónicas, hidrofóbicas o de van der Waals similares a las que exhiben los péptidos de la invención, tal como se divulga en la presente.

[073] Un método para realizar el diseño de sustancias miméticas racional emplea un sistema computarizado capaz de formar una representación de la estructura tridimensional del péptido, como las ilustradas por Hol, 1989a; Hol, 1989b; y Hol, 1988. Las estructuras moleculares de los péptidos miméticos, las moléculas orgánicas miméticas y las sustancias químicas miméticas de los péptidos de la invención pueden producirse usando programas de diseño asistido por computadora disponibles comercialmente en el campo. Algunos ejemplos de dichos programas incluyen SYBYL 6.5®, HQSAR™ y ALCHEMY 2000™ (Tripos); GALAXY™ y AM2000™ (AM Technologies, Inc., San Antonio, TX); CATALYST™ y CERIOUS™ (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA); CACHE PRODUCTS™, TSAR™, AMBER™, y CHEM-X™ (Oxford Molecular Products, Oxford, CA) y CHEMBUILDER3D™ (Interactive Simulations, Inc., San Diego, CA).

[074] Los péptidos miméticos, las moléculas orgánicas miméticas y las sustancias químicas miméticas producidos usando los péptidos divulgados en la presente, que utilizan, por ejemplo, programas de modelización molecular reconocidos en el campo, pueden producirse usando técnicas sintéticas químicas convencionales y diseñarse de forma tal de permitir el cribado ultrarrápido, incluidos métodos de química combinatoria. Los métodos combinatorios útiles para producir los péptidos miméticos, las moléculas orgánicas miméticas y las sustancias químicas miméticas de la invención incluyen síntesis en fase sólida y series de química combinatoria, según, por ejemplo, SIDDCO (Tucson, Arizona); Tripos, Inc.; Calbiochem/Novabiochem (San Diego, CA); Symyx Technologies, Inc. (Santa Clara, CA); Medichem Research, Inc. (Lemont, IL); Pharm-Eco Laboratories, Inc. (Bethlehem, PA); o N.V. Organon (Oss, Países Bajos). En la producción mediante química combinatoria de los péptidos miméticos, las moléculas orgánicas miméticas y las sustancias químicas miméticas de la invención pueden utilizarse los métodos conocidos en el campo, que incluyen, a mero título enunciativo, las técnicas divulgadas en Temett, (Combinatorial Chemistry, Oxford University Press, Londres, 1998); Gallop, et al., J. Med. Chem. 37:1233-51, 1994; Gordon, et al., J. Med. Chem. 37:1385-1401, 1994; Look, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 6:707-12, 1996; Ruhland, et al., J. Amer. Chem. Soc. 118: 253-4, 1996; Gordon, et al., Acc. Chem. Res. 29:144-54, 1996; Thompson y Ellman, Chem. Rev. 96:555-600, 1996; Fruchtal y Jung, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:17-42, 1996; Pavia, "The Chemical Generation of Molecular Diversity", Network Science Center, www.netsci.org, 1995; Adnan, et al., "Solid Support Combinatorial Chemistry in Lead Discovery and SAR Optimization," Id., 1995; Davies y Brant, "Combinatorial Chemistry Library Design using Pharmacophore Diversity", Id., 1995; Pavia, "Chemically Generated Screening Libraries: Present and Future", Id., 1996; y las Patentes estadounidenses n.º 5.880.972, 5.483.584, 5.331.573 y 5.573.905.

[075] Los polipéptidos recientemente sintetizados pueden purificarse sustancialmente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa (ver, p. ej., Creighton, Proteins: Structures

183
15~

And Molecular Principles, WH Freeman and Co., Nueva York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido sintético de la presente invención puede confirmarse mediante análisis o secuenciación de aminoácidos, por ejemplo, mediante el procedimiento de degradación de Edman (Creighton, *supra*). Además, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con las secuencias de otras proteínas, a fin de producir una variante del polipéptido o un polipéptido de fusión.

[076] En esta invención también se incluyen los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que unen selectivamente los polipéptidos de esta invención. Cualquier tipo de anticuerpo conocido en el campo puede generarse usando métodos bien conocidos en el campo. Por ejemplo, puede generarse un anticuerpo para que se una específicamente a un epítipo de un polipéptido de esta invención. El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente, incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, como también fragmentos de éstas, como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de un polipéptido de esta invención. Por lo general, se requieren al menos 6, 8, 10 o 12 aminoácidos contiguos para formar un epítipo. Sin embargo, los epítipos que involucran aminoácidos no contiguos pueden requerir más aminoácidos, por ejemplo, al menos 15, 25 o 50 aminoácidos.

[077] Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de un polipéptido de esta invención puede usarse con fines terapéuticos, como también en ensayos inmunoquímicos, por ejemplo, inmunoelctrotransferencias o "Western blot", ensayos ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en el campo. Pueden usarse varios inmunoensayos para identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. Numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos son bien conocidos en el campo. Por lo general, dichos inmunoensayos implican la medición de la formación de un complejo entre un inmunógeno y un anticuerpo que se une específicamente al inmunógeno.

[078] Por lo general, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de esta invención proporciona una señal de detección al menos 5, 10 o 20 veces más alta que una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se usa en un ensayo inmunoquímico. Preferentemente, los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de esta invención no detectan otras proteínas en ensayos inmunoquímicos y pueden inmunoprecipitar un polipéptido de esta invención de la solución.

[079] Los polipéptidos de esta invención, o fragmentos de estos, pueden usarse para inmunizar un mamífero, como un ratón, una rata, un conejo, un cobayo, un mono o un ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, un polipéptido de esta invención o un fragmento de éste puede conjugarse con una proteína portadora, como la albúmina sérica bovina, la tiroglobulina y la hemocianina de lapa californiana. En función de la especie huésped, pueden usarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen,

154
153

a mero título enunciativo, el adyuvante de Freund, geles minerales (p. ej., hidróxido de aluminio) y sustancias tensioactivas (p. ej., lisolectina, polialcoholes Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol). Entre los adyuvantes utilizados en los seres humanos, el BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y el *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

[080] Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido de esta invención o a un fragmento de éste pueden prepararse usando cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, a mero título enunciativo, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de células B humanas y la técnica del hibridoma con el virus de Epstein Barr (Epstein-Barr virus, EBV) (Kohler, et al., Nature 256:495-97, 1985; Kozbor, et al., J. Immunol. Methods 81:3142, 1985; Cote, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-30, 1983; Cole, et al., Mol. Cell Biol. 82:109-20, 1984).

[081] Además, pueden usarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos a fin de obtener una molécula con la especificidad antigénica y la actividad biológica apropiadas (Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55, 1984; Neuberger, et al., Nature 312:604-06, 1984; Takeda, et al., Nature 314:452-54, 1985). Los anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos también pueden "humanizarse" para impedir que un paciente desarrolle una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo cuando se use con fines terapéuticos. Dichos anticuerpos pueden ser suficientemente similares a los anticuerpos humanos, en cuanto a la secuencia, como para ser utilizados directamente en terapias o pueden requerir la alteración de algunos residuos clave. Las diferencias con respecto a la secuencia entre los anticuerpos de roedores y humanos pueden minimizarse mediante el reemplazo de los residuos que difieren de aquellos presentes en las secuencias humanas mediante la mutagénesis de residuos individuales dirigida a los sitios o mediante el tamizaje de regiones enteras determinantes de la complementariedad. En forma alternativa, los anticuerpos humanizados pueden producirse usando métodos recombinantes (ver, p. ej., GB2188638B). Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de esta invención pueden contener sitios de unión de antígenos que estén parcial o totalmente humanizados, según lo divulgado en la Patente estadounidense n.º 5.565.332.

[082] En forma alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple pueden adaptarse usando métodos conocidos en el campo para producir anticuerpos de cadena simple que se unan específicamente a un polipéptido de esta invención. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de diferente composición idiotípica pueden generarse mediante el intercambio de cadenas de bibliotecas combinatorias aleatorias de inmunoglobulina (Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:11120-23, 1991).

[083] Los anticuerpos de cadena simple también pueden construirse usando un método de amplificación del ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction,

185
194

PCR), que usa ADNc del híbrido como molde (Thirion, et al., Eur. J. Cancer Prev. 5:507-11, 1996). Los anticuerpos de cadena simple pueden ser monoespecíficos o blespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La elaboración de anticuerpos de cadena simple tetravalentes, blespecíficos se describe, por ejemplo, en Coloma y Morrison (Nat. Biotechnol. 15:159-63, 1997). La elaboración de anticuerpos de cadena simple bivalentes, blespecíficos se describe en Mallender y Voss (J. Biol. Chem. 269:199-206, 1994).

[064] Se puede construir una secuencia de nucleótidos que codifique un anticuerpo de cadena simple usando la síntesis de nucleótidos manual o automática, clonarla en una construcción de expresión utilizando métodos estándar de ADN recombinante e introduciría en una célula para expresar la secuencia de codificación, tal como se describe a continuación. En forma alternativa, los anticuerpos de cadena simple pueden producirse utilizando directamente, por ejemplo, la tecnología de fagos filamentosos (Verhaar, et al., Int. J. Cancer 61:497-501, 1995; Nicholls, et al., J. Immunol. Meth. 165:81-91, 1993).

[065] Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de esta invención también pueden producirse incluyendo la producción in vivo en la población linfocítica o cribando bibliotecas de inmunoglobulina o paneles de reactivos de unión altamente específicos tal como se divulga en la bibliografía (Orlandi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3833-37, 1989; Winter, et al., Nature 349:293-99, 1991).

[066] Otros tipos de anticuerpos pueden elaborarse y usarse con fines terapéuticos en los métodos de la invención. Por ejemplo, se pueden elaborar anticuerpos quiméricos, según lo divulgado en WO 93/03151. También pueden prepararse proteínas de unión que son derivadas de las inmunoglobulinas y que son multivalentes y multiespecíficas, como los "fragmentos bivalentes" (ver, p. ej., WO 94/13804).

[067] Los anticuerpos humanos que tienen la capacidad de unirse a los polipéptidos de esta invención también pueden identificarse a partir de la biblioteca HuCAL[®] de MorphoSys, tal como se indica a continuación. Un polipéptido de esta invención puede ser recubierto en una placa de pocillos e incubado con la biblioteca de fagos vinculados con Fab HuCAL[®] de MorphoSys. Esos Fab vinculados con fagos que no se unen al polipéptido de esta invención pueden quitarse de la placa mediante lavado, dejando sólo el fago que se una firmemente al polipéptido de esta invención. El fago unido puede eluirse, por ejemplo, mediante un cambio en el pH o mediante la elución con E. coli, y amplificarse mediante la infección de huéspedes de E. coli. Este proceso de cribado conocido como "panning" puede repetirse una o dos veces para obtener una población más grande de anticuerpos que se unan firmemente al polipéptido de esta invención. Luego, los Fab del conjunto enriquecido son expresados, purificados y cribados en un ensayo ELISA.

[068] Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden purificar mediante métodos bien conocidos en el campo. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar por afinidad haciéndolos pasar por una columna a la que está unido un polipéptido de esta invención. Luego, los

186
155

anticuerpos unidos pueden eluirse de la columna usando una solución amortiguadora con una alta concentración de sal.

[009] A continuación se definen varios términos, tal como se los usa en la presente.

[000] Al presentar los elementos de la presente invención o la(s) aplicación(es) preferida(s) de ésta, se pretende que los artículos "un(a)", "el(la)" y "dicho(a)" signifiquen que hay uno o más de los elementos. Se pretende que los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" sean incluyentes y signifiquen que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos mencionados.

[001] El término "sujeto" tal como se usa en la presente incluye los mamíferos (p. ej., seres humanos y animales).

[002] El término "tratamiento" incluye cualquier proceso, acción, aplicación, terapia u otro procedimiento similar, en el que un sujeto, incluso un ser humano, recibe asistencia médica con el objeto de mejorar la condición del sujeto, directa o indirectamente, o de hacer más lenta la progresión de una condición o un trastorno en el sujeto.

[003] El término "terapia combinada" o "terapia conjunta" significa la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una condición y/o un trastorno. Dicha administración incluye la administración conjunta de dos o más agentes terapéuticos en una manera sustancialmente simultánea, por ejemplo, en una única cápsula que tenga una proporción fija de principios activos o en múltiples cápsulas separadas para cada agente inhibidor. Además, dicha administración incluye el uso de cada tipo de agente terapéutico de manera secuencial.

[004] La frase "terapéuticamente efectivo(a)" significa la cantidad de cada agente administrado que logrará el objetivo de mejorar la severidad de una condición o trastorno diabéticos, evitando o minimizando a la vez los efectos secundarios asociados con un tratamiento terapéutico determinado.

[005] El término "farmacéuticamente aceptable" significa que el elemento en cuestión es apropiado para su uso en un producto farmacéutico.

[006] Dado que los polipéptidos de la presente invención tienen la capacidad de estimular la secreción de insulina de las células de los islotes pancreáticos in vitro y provocan una disminución del nivel de glucosa en sangre in vivo, pueden emplearse en el tratamiento de la diabetes, incluida la diabetes tipo 2 (diabetes mellitus no insulino dependiente). Dicho tratamiento también puede retardar la aparición de la diabetes y las complicaciones diabéticas. Los polipéptidos pueden usarse para prevenir que los sujetos con intolerancia a la glucosa desarrollen diabetes tipo 2. Otras enfermedades y condiciones que pueden tratarse o prevenirse utilizando los péptidos de la invención en métodos de la invención incluyen: la diabetes hereditaria juvenil tipo 2 (MODY) (Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994); la diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) (Zimmet, et al., Diabetes Med. 11:299, 1994); la intolerancia a la glucosa (IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Sup. 1):S5, 1999); la alteración de la

15/7
156

glucosa en ayunas (IFG) (Charles, et al., Diabetes 40:796, 1991); la diabetes gestacional (Metzger, Diabetes, 40:197, 1991); y el síndrome metabólico X.

[097] Los polipéptidos de la presente invención también pueden ser efectivos en trastornos como la obesidad, y para tratar la enfermedad aterosclerótica, la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia, los niveles bajos de HDL, la hipertensión, la enfermedad cardiovascular (incluida la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca coronaria, la enfermedad de las arterias coronarias y la hipertensión), la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad de los vasos periféricos; y para tratar el lupus, el síndrome de ovario poliquístico, la carcinogénesis y la hiperplasia, el asma, los problemas reproductivos masculinos, las úlceras, los trastornos del sueño, los trastornos del metabolismo de los lípidos y carbohidratos, la disfunción circadiana, los trastornos del crecimiento, los trastornos de la homeostasis energética, las enfermedades inmunitarias, incluidas las enfermedades autoinmunes (p. ej., el lupus eritematoso sistémico), como también las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, y el choque séptico.

[098] Los polipéptidos de la presente invención también pueden ser útiles para tratar trastornos fisiológicos relacionados, por ejemplo, con la diferenciación celular para producir células acumuladoras de lípidos, la regulación de la sensibilidad a la insulina y los niveles de glucosa en sangre que están relacionados, por ejemplo, con la función anormal de las células β pancreáticas, los tumores que segregan insulina y/o hipoglucemia autoinmune debido a los autoanticuerpos contra la insulina, los autoanticuerpos contra el receptor de insulina o los autoanticuerpos que estimulan las células β pancreáticas, la diferenciación de macrófagos que lleva a la formación de placas ateroscleróticas, respuesta inflamatoria, carcinogénesis, hiperplasia, expresión génica de adipocitos, diferenciación de adipocitos, reducción en la masa de células β pancreáticas, secreción de insulina, sensibilidad de los tejidos a la insulina, proliferación de células de liposarcoma, enfermedad de ovario poliquístico, anovulación crónica, hiperandrogenismo, producción de progesterona, esteroidogénesis, potencial de oxidoreducción y agresión oxidativa en las células, producción de óxido nítrico sintasa (nitric oxide synthase, NOS), aumento de la gamma glutamil transpeptidasa, catalasa, niveles de triglicéridos y colesterol HDL y LDL en plasma, y para usos similares.

[099] Los polipéptidos de la invención también pueden usarse en métodos de la invención para tratar las causas secundarias de la diabetes (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Sup. 1):S5, 1999). Dichas causas secundarias incluyen exceso de glucocorticoides, exceso de la hormona de crecimiento, feocromocitoma y diabetes farmacógena. Los fármacos que pueden provocar la diabetes incluyen, a mero título enunciativo, el piriminil, el ácido nicotínico, los glucocorticoides, la fenitoína, la hormona tiroidea, los agentes β -adrenérgicos, el interferón α y los fármacos usados para tratar la infección por VIH.

[100] Además, los polipéptidos de la invención pueden usarse para el tratamiento del asma (Bolin, et al., Biopolymer 37:57-66, 1995; Patente estadounidense n.º 5.677.419; que muestra que el polipéptido R3P0 tiene actividad para relajar el músculo liso de la tráquea del cobayo); para la

157

Inducción de hipotensión (el VIP provoca hipotensión, taquicardia y rubor facial en los pacientes asmáticos (Morice, et al., *Peptides* 7:279-280, 1986; Morice, et al., *Lancet* 2:1225-1227, 1983); para los problemas reproductivos masculinos (Slow, et al., *Arch. Androl.* 43(1):67-71, 1999); como agente antiapoptosis/neuroprotector (Brenneman, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865:207-12, 1998); para la cardioprotección durante eventos isquémicos (Kalfin, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1268(2):952-8, 1994; Das, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865:297-308, 1998), para la manipulación del reloj circadiano y los trastornos relacionados (Hamar, et al., *Cell* 109:497-508, 2002; Shen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:11575-80, 2000) y finalmente, como agente antiulceroso (Tuncel, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865:309-22, 1998).

[101] Los polipéptidos de la presente invención pueden usarse solos o en combinación con terapias y/o compuestos adicionales que son conocidos para los especialistas en la materia en el tratamiento de la diabetes y los trastornos relacionados. En forma alternativa, los métodos y los polipéptidos descritos en la presente pueden usarse, parcial o completamente, en terapia combinada.

[102] Los polipéptidos de la invención también pueden administrarse en combinación con otras terapias conocidas para el tratamiento de la diabetes, que incluyen los agonistas del PPAR, las sulfonilureas, los secretagogos no sulfonilureas, los inhibidores de la α -glucosidasa, los sensibilizantes a la insulina, los secretagogos de insulina, los compuestos que disminuyen la producción de glucosa hepática, la insulina y los fármacos contra la obesidad. Dichas terapias pueden administrarse antes de la administración de los polipéptidos de la invención, junto con estos o con posterioridad a ellos. La insulina incluye las formas de acción corta y prolongada, y las formulaciones de insulina. El agonista del PPAR puede incluir los agonistas de cualquiera de las subunidades del PPAR o las combinaciones de este. Por ejemplo, el agonista del PPAR puede incluir los agonistas del PPAR- α , PPAR- γ , PPAR- δ , o cualquier combinación de dos o tres de las subunidades del PPAR. Los agonistas del PPAR incluyen, por ejemplo, la rosiglitazona, la troglitazona y la pioglitazona. Las sulfonilureas incluyen, por ejemplo, la gliburida, la glimepirida, la clorpropamida, la tolbutamida y la glipizida. Los inhibidores de la α -glucosidasa que pueden ser útiles para tratar la diabetes al administrarlos con un polipéptido de la invención incluyen Precose®, Miglitol® y Voglibose™. Los sensibilizantes a la insulina que pueden ser útiles para tratar la diabetes incluyen los agonistas del PPAR- γ , como las glitazonas (p. ej., troglitazona, pioglitazona, englitazona, MCC-555, rosiglitazona y otras similares); las biguanidas, como la metformina y la fenformina; los inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B); los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DP-IV); y las tiazolidinedionas y no tiazolidinedionas. Los compuestos que disminuyen la producción de glucosa hepática que pueden ser útiles para tratar la diabetes al administrarlos con un polipéptido de la invención incluyen la metformina, como Glucophage® y Glucophage XR®. Los secretagogos de insulina que pueden ser útiles para tratar la diabetes al administrarlos con un polipéptido de la invención incluyen las sulfonilureas y no sulfonilureas: GLP-1, péptido inhibidor gástrico (gastric inhibitor peptide, GIP), secretina, nateglinida, meglitinida, repaglinida, glibenclamida, glimepirida, clorpropamida y glipizida. El GLP-

159
158

1 incluye los derivados del GLP-1 que tienen vidas medias más largas que el GLP-1 nativo, como por ejemplo, el GLP-1 derivatizado de ácidos grasos y el exendin. En una aplicación de la invención, los polipéptidos de la invención se usan en combinación con secretagogos de insulina para aumentar la sensibilidad de las células β pancreáticas al secretagogo de insulina.

[103] Los polipéptidos de la invención también pueden usarse en métodos de la invención en combinación con fármacos contra la obesidad. Los fármacos contra la obesidad incluyen los agonistas β -3; los antagonistas CB-1; los inhibidores del neuropéptido Y; los anoréxicos, como por ejemplo, la sibutramina (Meridia®, Abbott Laboratories); y los inhibidores de la lipasa, como por ejemplo, el orlistat (Xenical®, Roche Pharmaceuticals).

[104] Los polipéptidos de la invención también pueden usarse en métodos de la invención en combinación con fármacos comúnmente utilizados para tratar los trastornos lipídicos en pacientes diabéticos. Dichos fármacos incluyen, a mero título enunciativo, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, ácido nicotínico, fármacos que disminuyen los lípidos (p. ej., ésteres de estanol, glucósidos de estanol como la tiquesida y azetidinas como la ezetimiba), inhibidores de la acetil-CoA-C-acetiltransferasa (acetyl-CoA C-acetyltransferase, ACAT) (como la avasimiba), secuestradores de ácidos biliares, inhibidores de la recaptación de ácidos biliares, inhibidores del transporte de triglicéridos microsomaes y derivados de ácido fibríco. Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa incluyen, por ejemplo, la lovastatina, la simvastatina, la pravastatina, la fluvastatina, la atorvastatina, la rivasatina, la itavastatina, la cerivastatina y la ZD-4522. Los derivados de ácido fibríco incluyen, por ejemplo, el clofibrato, el fenofibrato, el bezafibrato, el ciprofibrato, el bedofibrato, el etofibrato y el gemfibrozil. Los secuestradores incluyen, por ejemplo, la colestiramina, el colestípol y los derivados dialquilaminoalquilo de un dextrano entrecruzado.

[105] Los polipéptidos de la invención también pueden usarse en combinación con fármacos antihipertensivos, como por ejemplo, β -bloqueadores e inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (angiotensin converting enzyme, ACE). Los ejemplos de agentes antihipertensivos adicionales para uso en combinación con los polipéptidos de la presente invención incluyen bloqueadores de los canales de calcio (tipo L y tipo T; p. ej., diltiazem, verapamilo, nifedipina, amlodipina y milbefradil), diuréticos (p. ej., clorotiazida, hidrocortiazida, flumetiazida, hidroflumetiazida, bendroflumetiazida, metilclorotiazida, triclorometiazida, poltiazida, benzotiazida, tícinafeno de ácido etacrínico, clortalidona, furosemida, musollmina, bumetanida, triamtereno, amilorida, espironolactona), inhibidores de la renina, inhibidores de la ACE (p. ej., captoprílo, zofenoprílo, fosinoprílo, enalaprílo, ceranoprílo, cilazoprílo, delapril, pentopril, quinaprílo, ramiprílo, lisinoprílo), antagonistas del receptor de la angiotensina 1 (AT-1) (p. ej., losartán, irbesartán, valsartán), antagonistas del receptor de la endotelina (ET) (p. ej., sitaxsentan, atrasentan, inhibidores de la endopeptidasa neutra (neutral endopeptidase, NEP), inhibidores de la vasopectidasa (inhibidores duales de la NEP-ACE) (p. ej., omapatrilat y gemopatrilat) y nitratos.

[106] Dichas terapias conjuntas pueden administrarse en cualquier combinación de dos o más fármacos (p. ej., un polipéptido de la invención en combinación con un sensibilizante a la insulina y un fármaco contra la obesidad). Dichas terapias conjuntas pueden administrarse en forma de composiciones farmacéuticas, tal como se describió anteriormente.

[107] Sobre la base de ensayos bien conocidos usados para determinar la eficacia para el tratamiento de las condiciones identificadas anteriormente en mamíferos y por comparación de estos resultados con los resultados de medicamentos conocidos que se usan para tratar estas condiciones, la dosis efectiva de los polipéptidos de esta invención puede determinarse fácilmente para el tratamiento de cada indicación deseada. La cantidad de principio activo (p. ej., polipéptidos) que se administrará en el tratamiento de una de estas condiciones puede variar en gran medida, en función de consideraciones tales como el polipéptido específico y la unidad posológica empleada, el modo de administración, el período de tratamiento, la edad y el sexo del paciente tratado, y la naturaleza y la extensión de la condición tratada.

[108] Por lo general, la cantidad total de principio activo que se administrará puede oscilar entre aproximadamente 0,00001 mg/kg y 1 mg/kg, y preferentemente entre aproximadamente 0,0001 mg/kg y 0,1 mg/kg de peso corporal por día. Una unidad posológica puede contener entre aproximadamente 0,01 mg y 20 mg de principio activo, y puede administrarse una o más veces por semana. La dosis semanal para la administración mediante inyección, incluidas las inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas y parenterales, y el uso de técnicas de infusión puede oscilar entre aproximadamente 0,0001 y 01 mg/kg. El régimen posológico rectal diario puede oscilar entre 0,001 y 1 mg/kg de peso corporal total. La concentración transdérmica puede ser la requerida para mantener una dosis diaria de entre 0,001 y 1 mg/kg.

[109] Por supuesto, el régimen posológico inicial y continuo específico para cada paciente variará en función de la naturaleza y severidad de la condición, según lo determine el médico tratante que realice el diagnóstico, la actividad del polipéptido específico empleado, la edad del paciente, la dieta del paciente, la hora de administración, la vía de administración, la tasa de excreción del fármaco, las combinaciones de fármacos y otros factores similares. El modo de tratamiento deseado y la cantidad de dosis de un polipéptido de la presente invención pueden ser determinados por los especialistas en la materia usando pruebas de tratamiento convencionales.

[110] Los polipéptidos de esta invención pueden utilizarse para lograr el efecto farmacológico deseado mediante la administración a un paciente que los necesita en una composición farmacéutica formulada adecuadamente. A los fines de esta invención, se entiende por paciente un mamífero, incluidos los seres humanos, que necesita tratamiento para una condición o enfermedad específicas. Por lo tanto, la presente invención incluye las composiciones farmacéuticas que están compuestas por un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo que sea relativamente no tóxico e inocuo para un paciente a concentraciones compatibles con la actividad efectiva del principio activo, de forma tal que

167
169

cualquier efecto secundario atribuible al vehículo no contamine los efectos beneficiosos del principio activo. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido es la cantidad que produce un resultado o ejerce una influencia en la condición específica que se está tratando. Los polipéptidos descritos en la presente pueden administrarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable utilizando cualquier forma de unidad posológica convencional efectiva, que incluya, por ejemplo, preparados de liberación inmediata y prolongada, administración por vía oral, parenteral o tópica, u otra forma similar.

[111] Los polipéptidos de esta invención pueden administrarse por vía parenteral, es decir, por vía intravenosa, intramuscular, interperitoneal o preferentemente, por vía subcutánea, como dosis inyectables del polipéptido en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido o una mezcla de líquidos estériles, como agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas; un alcohol, como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico; glicoles como propilenglicol o polietilenglicol; cetales de glicerol, como 2,2-dimetil-1,1-dioxolano-4-metanol; éteres como polietilenglicol 400; un aceite; un ácido graso; un éster o glicérido de ácido graso; o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un surfactante farmacéuticamente aceptable, como un jabón o detergente, un agente de suspensión, como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o un agente emulsionante y otros adyuvantes farmacéuticos.

[112] Algunos ejemplos de aceites que pueden usarse en las formulaciones parenterales de esta invención son aquellos a base de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, el aceite de cacahuete, soja, sésamo, semillas de algodón, maíz u oliva, la vaselina y el aceite mineral. Los ácidos grasos apropiados incluyen el ácido oleico, el ácido esteárico y el ácido isoesteárico. Algunos ésteres de ácidos grasos apropiados son, por ejemplo, el etil oleato y el isopropil miristato. Los jabones apropiados incluyen aquellos de metal alcalino graso, amonio y sales de trietanolamina, y los detergentes apropiados incluyen los detergentes catiónicos, por ejemplo, los halogenuros de dimetil dialquil amonio, halogenuros de alquil piridinio y acetatos de alquilamina; los detergentes aniónicos, por ejemplo, los sulfonatos de alquilo, arilo y olefina; los sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido; y los sulfosuccinatos; los detergentes no iónicos, por ejemplo, los óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxitileno-polipropileno; y los detergentes anfotéricos, por ejemplo, los alquil-beta-aminopropionatos y las sales de 2-alquilimidazolina cuaternaria de amonio, como también mezclas.

[113] Por lo general, las composiciones parenterales de esta invención pueden contener aproximadamente entre el 0,5% y el 25% según el peso del principio activo en la solución. Los conservantes y las soluciones amortiguadoras también pueden usarse de forma ventajosa. A fin de minimizar o eliminar la irritación en el lugar de inyección, es posible que dichas composiciones contengan un surfactante no iónico que tenga un equilibrio hidrófilo-lipófilo (hydrophile-lipophile balance, HLB) de entre 12 y 17 aproximadamente. La cantidad de surfactante presente en dicha formulación oscila aproximadamente entre un 5% y un 15% según el peso. El surfactante puede

ser un componente único que tenga el HLB antes mencionado o puede ser una mezcla de dos o más componentes que tenga el HLB deseado.

[114] Algunos ejemplos de los surfactantes usados en las formulaciones parenterales son la clase de ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polietileno, por ejemplo, el monooleato de sorbitán y los aductos de alto peso molecular del óxido de etileno con una base hidrofóbica, formada por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

[115] Las composiciones farmacéuticas pueden tener la forma de suspensiones acuosas inyectables estériles. Dichas suspensiones pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión apropiados, como por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes que pueden ser una fosfatida presente naturalmente, como la lecitina, un producto de la condensación de un óxido alquileo con un ácido graso, por ejemplo, estearato de polioxietileno, un producto de la condensación de un óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol, un producto de la condensación de un óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol, como el monooleato de sorbitán de polioxietileno, o un producto de la condensación de un óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán de polioxietileno.

[116] La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico. Los diluyentes y solventes que pueden emplearse son, por ejemplo, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles son empleados convencionalmente como solventes o medios de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluidos los monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico pueden usarse en la preparación de formas inyectables.

[117] Una composición de la invención también puede administrarse en forma de supositorios del fármaco para administración rectal. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco (p. ej., polipéptido) con un excipiente no irritante apropiado que sea sólido a temperaturas habituales, pero líquido a la temperatura rectal y que, en consecuencia, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen, por ejemplo, la mantequilla de cacao y el polietilenglicol.

[118] Otra formulación empleada en los métodos de la presente invención emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Dichos parches transdérmicos pueden usarse para proporcionar una infusión continua o discontinua de los polipéptidos de la presente invención en cantidades controladas. La elaboración y el uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos es bien conocida en el campo (ver, p. ej., la Patente estadounidense n.º 5.023.252, que se incluye en la presente por referencia). Dichos parches pueden elaborarse para la administración de agentes farmacéuticos en forma continua, pulsátil o a demanda.

163
162

[119] Es posible que sea deseable o necesario introducir la composición farmacéutica en el paciente a través de un dispositivo de administración mecánico. La elaboración y el uso de dispositivos de administración mecánicos para la administración de agentes farmacéuticos es bien conocida en el campo. Por ejemplo, las técnicas directas para administrar un fármaco directamente en el cerebro, por lo general, implican la colocación de un catéter para la administración del fármaco en el sistema ventricular del paciente, a fin de puentear la barrera hematoencefálica. Uno de tales sistemas de administración implantables que se usan para el transporte de agentes a regiones anatómicas específicas del cuerpo se describe en la Patente estadounidense n.º 5.011.472, que se incluye en la presente por referencia.

[120] Las composiciones de la invención también pueden contener otros ingredientes para composición farmacéuticamente aceptables convencionales, que generalmente se denominan vehículos o diluyentes, según sea necesario o se requiera. Cualquiera de las composiciones de esta invención puede preservarse mediante la adición de un antioxidante, como el ácido ascórbico, o mediante otros conservantes apropiados. Pueden utilizarse los procedimientos convencionales para preparar dichas composiciones en formas galénicas apropiadas.

[121] Los ingredientes farmacéuticos utilizados comúnmente cuyo uso puede ser apropiado para formular la composición para su vía de administración pretendida incluyen: agentes acidificantes, por ejemplo, a mero título enunciativo, ácido acético, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido clorhídrico, ácido nítrico; y agentes alcalinizantes, por ejemplo, a mero título enunciativo, solución de amoníaco, carbonato de amonio, dietanolamina, monoetanolamina, hidróxido de potasio, borato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, trietanolamina, trometamol.

[122] Otros ingredientes farmacéuticos incluyen, a mero título enunciativo, adsorbentes (p. ej., celulosa en polvo y carbón activado); propulsores en aerosol (p. ej., dióxido de carbono, CCl_2F_2 , $\text{F}_2\text{CIC-CClF}_2$ y CClF_3); agentes de desplazamiento de aire (p. ej., nitrógeno y argón); conservantes antimicrobianos (p. ej., ácido benzoico, butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio); conservantes antimicrobianos (p. ej., cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, alcohol benzílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol feniletílico, nitrato de fenilmercurio y timerosol); antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio); materiales de unión (p. ej., polímeros de bloque, caucho natural y sintético, poliacrilatos, poliuretanos, siliconas y copolímeros de estireno-butadieno); agentes amortiguadores (p. ej., metafosfato de potasio, fosfato de potasio monobásico, acetato de sodio, citrato de sodio anhidro y dihidrato de citrato de sodio); vehículos (p. ej., jarabe de acacia, jarabe aromático, elixir aromático, jarabe de cereza, jarabe de cacao, jarabe de naranja, jarabe, aceite de maíz, aceite mineral, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, inyección bacteriostática de cloruro de sodio y agua bacteriostática para inyección); agentes quelantes (p. ej., edetato disódico y ácido edético); colorantes (p. ej., FD&C rojo n.º 3, FD&C rojo n.º 20, FD&C amarillo n.º 6, FD&C azul n.º 2, D&C verde n.º 5, D&C naranja n.º 5, D&C rojo n.º 8, caramelo y rojo óxido férrico); agentes

164
163

clarificantes (p. ej., bentonita); agentes emulsionantes (a mero título enunciativo, acacia, cetomacrogol, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lecitina, monooleato de sorbitán, estearato de polietileno 50); agentes encapsulantes (p. ej., gelatina y ftalato de acetato de celulosa); saborizantes (p. ej., aceite de anís, aceite de canela, cacao, mentol, aceite de naranja, aceite de menta y vainilla); humectantes (p. ej., glicerina, propilenglicol y sorbitol); agentes para levigar (p. ej., aceite mineral y glicerina); aceites (p. ej., aceite de maní, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y aceite vegetal); bases para pomadas (p. ej., lanolina, pomada hidrofílica, pomada de polietilenglicol, vaselina, vaselina hidrofílica, pomada blanca, pomada amarilla y pomada de agua de rosas); elementos que aumentan la penetración (administración transdérmica) (p. ej., monohidroxi o polihidroxi alcoholes, alcoholes grasos saturados o no saturados, ésteres grasos saturados o no saturados, ácidos dicarboxílicos saturados o no saturados, aceites esenciales, derivados de fosfatidilo, cefalina, terpenos, amidas, éteres, cetonas y ureas); plastificantes (p. ej., ftalato de dietilo y glicerina); solventes (p. ej., alcohol, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, glicerina, alcohol isopropílico, aceite mineral, ácido oleico, aceite de cacahuete, agua purificada para inyección, agua estéril para inyección y agua estéril para irrigación); agentes endurecedores (p. ej., alcohol cetílico, cera de ésteres cetílicos, cera microcristalina, parafina, alcohol estearílico, cera blanca y cera amarilla); bases para supositorios (p. ej., mantquilla de cacao y polietilenglicoles (mezclas)); surfactantes (p. ej., cloruro de benzalconio, nonoxinol 10, oxtoxinol 9, polysorbato 80, sulfato láurico de sodio y monopalmitato de sorbitán); agentes de suspensión (p. ej., agar, bentonita, carbómeros, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, caolín, metilcelulosa, tragacanto y Veegum); enduizantes (p. ej., aspartamo, dextrosa, glicerina, manitol, propilenglicol, sacarina sódica, sorbitol y sacarosa); antiadherentes para comprimidos (p. ej., estearato de magnesio y talco); aglutinantes para comprimidos (p. ej., acacia, ácido algínico, carboximetilcelulosa sódica, azúcar compresible, etil celulosa, gelatina, glucosa líquida, metilcelulosa, povidona y almidón pregelatinizado); diluyentes para comprimidos y cápsulas (p. ej., fosfato de calcio dibásico, caolín, lactosa, manitol, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, carbonato de calcio precipitado, carbonato de sodio, fosfato de sodio, sorbitol y almidón); agentes para recubrimiento de comprimidos (p. ej., glucosa líquida, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa y goma laca); excipientes para la compresión directa de comprimidos (p. ej., fosfato de calcio dibásico); desintegrantes de comprimidos (p. ej., ácido algínico, carboximetilcelulosa cálcica, celulosa microcristalina, poliacrilina potásica, alginato de sodio, glicolato de almidón sódico y almidón); deslizantes para comprimidos (p. ej., alícea coloidal, almidón de maíz y talco); lubricantes para comprimidos (p. ej., estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, ácido esteárico y estearato de zinc); opacantes para comprimidos/cápsulas (p. ej., dióxido de titanio); agentes para el pulido de comprimidos (p. ej., cera de Camauba y cera blanca); agentes espesantes (p. ej., cera de abejas, alcohol cetílico y parafina); agentes de tonicidad (p. ej., dextrosa y cloruro de sodio); agentes que aumentan la viscosidad (p. ej., ácido algínico, bentonita, carbómeros, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, povidona, alginato de sodio y tragacanto);

768
164

y agentes humectantes (p. ej., oxicetanol de heptadecaelileno, lecitinas, monooleato de sorbitol de polietileno, monooleato de sorbitol de polioxietileno y estearato de polioxietileno).

[123] Los polipéptidos descritos en la presente pueden administrarse como agentes farmacéuticos únicos o en combinación con uno o más agentes farmacéuticos más, donde la combinación no provoca efectos adversos inaceptables. Por ejemplo, los polipéptidos de esta invención pueden combinarse con agentes contra la obesidad, agentes antidiabéticos o agentes para otras indicaciones conocidos, y agentes similares, como también con mezclas y combinaciones de estos.

[124] Los polipéptidos descritos en la presente también pueden utilizarse, en forma de base libre o en composiciones, con fines de investigación y diagnóstico, o como estándares de referencia analítica, y para otros usos similares. Por lo tanto, la presente invención incluye las composiciones que comprenden un vehículo inerte y una cantidad efectiva de un polipéptido identificado por los métodos descritos en la presente, o una sal o éster de éste. Un vehículo inerte es cualquier material que no interactúa con el polipéptido que será transportado y que proporciona un soporte, un medio de transporte, volumen, un material rastreable, entre otras cosas, al polipéptido que será transportado. Una cantidad efectiva de polipéptido es la cantidad que produce un resultado o ejerce una influencia en el procedimiento específico que se está realizando.

[125] Se sabe que los polipéptidos experimentan hidrólisis, desamidación, oxidación, racemización e isomerización en medios acuosos y no acuosos. La degradación mediante la hidrólisis, desamidación u oxidación, por ejemplo, puede detectarse fácilmente mediante electroforesis capilar, espectrometría de masas o degradación de Edman. Sin perjuicio de la degradación enzimática, los polipéptidos que tienen una vida media plasmática o un tiempo de residencia biológica prolongados deben, como mínimo, ser estables en solución acuosa. Es esencial que el polipéptido exhiba una degradación menor al 10% durante un período de un día a temperatura corporal. Es aún más preferible que el polipéptido exhiba una degradación menor al 5% durante un período de un día a temperatura corporal. Debido a que el paciente diabético crónico recibe tratamiento durante toda su vida, preferentemente, es aún más conveniente administrar estos agentes terapéuticos con poca frecuencia, si se administran por vía parenteral. La estabilidad (es decir, un porcentaje pequeño de degradación) durante un período de semanas a temperatura corporal permitirá la administración de dosis con menos frecuencia. La estabilidad (es decir, un porcentaje pequeño de degradación) a la degradación a través de la proteólisis, en relación con la DPP4 o en plasma durante períodos de días a semanas respaldará aún más la administración de dosis con menos frecuencia. La estabilidad en años a temperatura de refrigeración permitirá al fabricante presentar una formulación líquida y evitar, de este modo, la incomodidad de la reconstitución. Además, la estabilidad en un solvente orgánico permitirá formular el polipéptido en formas galénicas nuevas, como implantes.

966
165

[126] Las formulaciones apropiadas para la administración subcutánea, intravenosa, intramuscular y otras similares; los vehículos farmacéuticos apropiados; y las técnicas para la formulación y administración pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en el campo (ver, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 20^a edición, 2000).

[127] Debe ser evidente para una persona con conocimientos normales en la materia que pueden realizarse cambios y modificaciones a esta invención, sin apartarse del espíritu o alcance de la invención, según lo establecido en la presente.

165
166

EJEMPLOS

[125] A fin de que esta invención pueda comprenderse mejor, se incluyen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos, y no debe interpretarse que limitan el alcance de la invención de ninguna manera. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incluyen en su totalidad por referencia.

Ejemplo 1. Metodología de síntesis peptídica

[126] Para sintetizar algunos de los polipéptidos de la invención se siguieron los siguientes procedimientos generales:

La síntesis peptídica se realizó mediante la estrategia de Fmoc/t-butilo (Pennington y Dunn, *Peptide Synthesis Protocols*, Volumen 35, 1994) en condiciones de flujo continuo, usando resinas de polietilenglicol-poliéstereno de Rapp-Polymere (Rapp-Polymere, Tubingen, Alemania). Al completarse la síntesis, los péptidos fueron clivados de la resina y desprotegidos usando TFA/DTT/H₂O/trisopropil silano (88/5/5/2). Los péptidos fueron precipitados del líquido de clivaje usando dietil éter frío. El precipitado se lavó tres veces con el éter frío y luego se disolvió en ácido acético al 5% antes de la liofilización. Los péptidos fueron verificados mediante cromatografía en fase invertida en una columna YMC-Pack ODS-AQ (YMC, Inc., Wilmington, NC) en un sistema ALLIANCE® de Waters (Waters Corporation, Milford, MA) usando agua/acetonitrilo con TFA al 3% como gradiente de 0% a 100% de acetonitrilo, y mediante la espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (matrix-assisted laser-desorption ionization, MALDI) en un Espectrómetro de masas MALDI VOYAGER DE™ (Modelo 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). La muestra de péptidos se agregó a la solución amortiguadora Matrix (50/50 dH₂O/acetonitrilo con TFA al 3%) en una proporción 1/1. Los péptidos que no cumplieran con los criterios de pureza de >95% fueron purificados mediante cromatografía en fase invertida en un Sistema de HPLC Delta Prep 4000 de Waters (Waters Corporation, Milford, MA).

Ejemplo 2. Acetilación peptídica

[130] Los péptidos fueron sintetizados mediante métodos estándar bien conocidos en el campo. Los péptidos fueron sintetizados con un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A utilizando química Fmoc con activación con HBTU en resina Rink amida, y el N-terminal fue acetilado con anhídrido acético. El péptido fue clivado con TFA al 84,6%, fenol al 4,4%, agua al 4,4%, tioanisol al 4,4% y etanoditioal al 2,2%. Los péptidos fueron precipitados del líquido de clivaje usando éter tertbutilmetílico. El precipitado se lavó con el éter frío y se secó con argón. Los péptidos fueron purificados con cromatografía C18 en fase invertida con gradientes lineales de agua/acetonitrilo con TFA al 0,1%. La identidad de los péptidos se confirmó con la espectrometría de masas MALDI y por electrospray, y con análisis de aminoácidos.

Ejemplo 3. PEGilación peptídica

158
167

[131] La vida media de un péptido in vivo puede aumentarse a través de la unión de una fracción de polietilenglicol (PEG) al péptido, con lo cual se reduce la depuración del péptido por parte del riñón y se reduce la degradación del péptido mediante la proteasa. El uso de un péptido agonista del receptor VPAC2 se ve severamente limitado por su muy corta vida media in vivo; la unión de una fracción de PEG al péptido (PEGilación) prolongó lo suficiente la vida media del péptido como para permitir un tratamiento aplicado entre una vez por día y una vez por semana.

[132] La PEGilación puede realizarse mediante cualquier método conocido para los especialistas en la materia. Sin embargo, en este ejemplo, la PEGilación se realizó mediante la introducción de una mutación en la cisteína única en el péptido, seguida de la PEGilación de la cisteína a través de un enlace tioéter estable entre el sulfhidrilo del péptido y el grupo maleimida del reactivo metoxi-PEG-maleimida (Nektar (Inhale/Shearwater), San Carlos, CA; NOF, Tokio, Japón). La cisteína única puede introducirse en el C-terminal del péptido para minimizar la posible reducción de la actividad mediante la PEGilación.

[133] Como ejemplo, se agregó un exceso molar dos veces mayor de un reactivo mPEG-mal (peso molecular 22kD y 43kD) a 1 mg de péptido (p. ej., ID de SECUENCIA N.º 1 con una mutación en la cisteína en el C-terminal del péptido) y se disolvió en una solución amortiguadora de reacción a pH 8 (fosfato sódico 0,1 M / NaCl 0,1 M / ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 0,1 M). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se terminó con el agregado de un exceso molar dos veces mayor de ditiotretol (DTT) a mPEG-mal. La mezcla reactiva péptido-PEG-mal se aplicó a una columna de intercambio catiónico para remover los reactivos de PEG residuales, seguido de una columna de filtración por gel para remover el péptido libre residual. La pureza, la masa y el número de sitios PEGilados se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Sodium dodecyl sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) y espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (matrix-assisted laser-desorption ionization, MALDI)-tiempo de vuelo (time of flight, TOF). Cuando se unió un PEG de 22 kD a los péptidos de la presente invención, se mantuvo la potente activación del receptor VPAC2. Asimismo, también se mantuvo la selectividad de activación de receptores del VPAC2, en comparación con el VPAC1 y el PAC1. Es posible que la PEGilación con un PEG más pequeño (p. ej., un PEG lineal de 22 kD) tenga menos probabilidades de reducir la actividad del péptido, mientras que un PEG de mayor tamaño (p. ej., un PEG ramificado de 43kD) tendrá más probabilidades de reducir la actividad. Sin embargo, el PEG de mayor tamaño aumentará aún más la vida media plasmática, de forma tal que sea posible administrar una inyección por semana (Harris, et al., Clin. Pharmacokinet. 40:539-551, 2001).

Ejemplo 4. Composición farmacéutica: formulaciones IV y SC

[134] Una formulación inyectable IV estéril se prepara con 4 mg de un polipéptido de ID de SECUENCIA N.º 1, o un polipéptido derivatizado que tenga un contenido equivalente a 4 mg de polipéptido, y 1 L de solución salina estéril, utilizando cualquier proceso de fabricación bien conocido en el campo. Para la formulación subcutánea (SC), pueden utilizarse concentraciones

269
168

más altas del polipéptido. En el caso del polipéptido identificado como ID de SECUENCIA N.º 1, o de un polipéptido derivatizado, se disuelven 4 mg en 100 mL de solución salina o dimetilsulfóxido (DMSO), y se rellenan con la composición viales estériles previamente sometidos a filtración aséptica.

Ejemplo 5. Análisis de péptidos mediante espectrometría de masas

[135] Se diluyeron con agua alícuotas de cuarenta pmol/2 µl de péptidos hasta 10 µl. La solución amortiguadora de ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etanosulfónico (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethanesulfonic Acid, HEPES) fue removida mediante la aplicación del 50% de la muestra (20 pmol/5 µl) a un C18 ZipTip acondicionado de Millipore, según las instrucciones del fabricante. La muestra fue eluida del ZipTip con una matriz (10 mg/ml de ácido alfa-cianohidroxibenzámico en acetonitrilo (ACN) al 50%, TFA al 0,1%) directamente en la placa MALDI. Las muestras fueron analizadas en un sistema Voyager DE-PRO MALDI de Applied Biosystems operado en el modo reflector de iones. Los datos se recopilaron en el rango de 500 a 4000 Da, y las masas resultantes se compararon con las teóricas mediante cálculos manuales.

Ejemplo 6. Análisis de péptidos de Edman

[136] Se suministraron muestras de péptidos para la degradación de Edman a 1 nmol/10 µl en HEPES 10 mM, pH 7,4, TFA al 5%. Antes del análisis de Edman, se removió la sal de la solución amortiguadora de HEPES usando un cartucho de muestra ProSorb de Applied Biosystems, según las instrucciones del fabricante. Brevemente, la muestra se aplicó a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Polyvinylidene difluoride, PVDF) y se lavó con TFA al 0,1%; luego se removió la membrana y se insertó en el secuenciador de proteínas para la degradación de Edman. La degradación de Edman se llevó a cabo en un sistema de secuenciación de proteínas Procise 494HT de Applied Biosystems, utilizando el método en fase líquida pulsante, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las determinaciones de secuencias se realizaron manualmente.

Ejemplo 7. Estabilidad de los péptidos.

[137] Las formulaciones descritas en el Ejemplo 4 se colocaron en una cámara de estabilidad constante. Los péptidos también fueron analizados con respecto a su estabilidad a la degradación en soluciones de DPP4 y en plasma. Periódicamente, se removieron muestras para análisis mediante electroforesis capilar, espectrometría de masas, degradación de Edman, ELISA y ensayos de actividad peptídica, que son métodos sensibles para detectar la degradación del polipéptido. Se sumó el área de varios picos y el área del pico del polipéptido precursor se divide por el área pico total. El cociente es la pureza porcentual. Dado que hay impurezas presentes en el polipéptido nuevo, el cambio en la pureza se normaliza dividiendo la pureza en diferentes puntos en el tiempo por la pureza inicial. Para medir la estabilidad al DPP4 y en plasma, los péptidos a 20 pmol/µl se incubaron a 37°C en presencia de DPP-IV 300 pM en HEPES 100 mM, pH 7,4 (Figura 2a). En diversos puntos en el tiempo, la reacción (alícuota de 2 µl) se terminó mediante la adición del inhibidor de la DPP-IV 1 µM y el congelamiento. Para el análisis de espectrometría de masas MALDI, se evaluaron los siguientes puntos en el tiempo: T = 0 h, 1 h, 5

170
169

h y 24 h. Los resultados se graficaron como porcentaje de péptidos o derivados de péptidos intactos, en comparación con los productos de degradación.

Ejemplo 8. Unión de los péptidos a los receptores PACAP1 y VPAC1 y VPAC2

[138] Se cultivaron hasta la confluencia células de CHO con una sobreexpresión de los receptores PAC1, VPAC1 y VPAC2, luego fueron raspadas de sus matraces y peletizadas por centrifugación suave en tubos de 50 ml. Los pellets fueron resuspendidos en una solución amortiguadora de homogeneización a base de tris y homogeneizados en un triturador de tejidos Dounce con 30-40 golpes manuales en hielo. La suspensión se centrifugó en una ultracentrifugadora, lo cual produjo la peletización de las membranas. Este pellet se resuspendió en una pequeña cantidad de solución amortiguadora de homogeneización y se determinó una concentración de proteínas a través del uso de un kit BCA de Pierce.

[139] Una reacción de unión que contenga una proteína de membrana de 10 µg, ^{125} I-PACAP 27 0,1 nM y una curva de dosis del compuesto a ser evaluado se incubó en una placa de 96 pocillos a 37°C durante 20 minutos. La reacción se detuvo al colocar la placa en hielo durante 20 minutos. La reacción se agregó a una placa de filtro preincubada con polietilénimina (polyethylenimine, PEI) al 0,1% para evitar la unión no específica, se procesó con un colector de vacío y se lavó varias veces con una solución de lavado a base de albúmina sérica bovina (bovine serum albumina, BSA). La placa de filtro se secó, se agregó centelleador y se leyó en un contador MicroBeta. Los datos fueron analizados y presentados en gráficos Prism.

Ejemplo 9. Elevación del cAMP en respuesta a los péptidos

[140] Las células de CHO que expresaban los péptidos VPAC2 se colocaron en placas de 96 pocillos a razón de 8×10^4 células/pocillo y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas en α MEM, nucleósidos, glutamina (Gibco/BRL, Rockville, MD), suero bovino fetal (fetal bovine serum, FBS) al 5%, Pen/Strep 100 µg/mL, higromicina 0,4 mg/mL y Geneticin 1,5 mg/mL (Gibco/BRL). Los medios se removieron y las placas se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (phosphate buffered saline, PBS). Las células se incubaron con un péptido (en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2,5 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, NaHCO_3 25 mM (pH 7,4) con BSA al 1% y 100 µM IBMX) durante 15 minutos a 37 °C. El AMP cíclico de los extractos celulares se cuantificó utilizando el sistema de ensayo con cribado directo del ensayo de proximidad por centelleo (scintillation proximity assay, SPA) del cAMP (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ,). La cantidad de cAMP presente en los lisados se determinó siguiendo las instrucciones provistas con este kit. La cantidad de cAMP (en pmol) producida a cada concentración del péptido se graficó y analizó mediante regresión no lineal utilizando el software Prism para determinar la mediana de la concentración efectiva (median effective concentration, EC_{50}) para cada péptido.

[141] En forma alternativa, la elevación del cAMP en respuesta a la activación del receptor puede medirse en una línea celular indicadora, como la de CHO, que no sólo expresa el receptor

125
170

deseado, sino que también expresa un indicador, como la luciferasa, unido a un elemento de respuesta al cAMP (cAMP response element, CRE). Dichas células se colocan en placas de 96 pocillos a razón de 10^4 células por pocillo y se cultivan a 37 °C durante 48 horas en α MEM, nucleósidos, glutamina (Gibco/BRL, Rockville, MD), FBS al 5%, Pen/Strep 100 μ g/mL, higromicina 0,4 mg/mL y Geneticin (Gibco/BRL) 1,5 mg/mL. Luego las células se incuban con un péptido durante 6 horas, se remueven los medios y se agrega el reactivo Bright-Glo (Promega). La señal se detecta usando un contador de centelleo.

[142] Los polipéptidos de esta invención están diseñados sobre la base del VIP, que se ha demostrado que carece de actividad en el PAC1 (Vaudry, et al., Pharmacol. Rev. 52:289-324, 2000). Por lo tanto, se cree que los polipéptidos de esta invención no poseen actividad considerable en el PAC1.

[143] En la Figura 3 se muestran los resultados de este ensayo con polipéptidos representativos de esta invención. Los péptidos identificados como ID de SECUENCIA N.º 1 y 112 son potentes agonistas del receptor VPAC2, y activan el receptor al 100% del nivel máximo de activación del receptor lograda por el péptido endógeno PACAP-27. Asimismo, los péptidos identificados como ID de SECUENCIA N.º 1, 112, 152 y 154 son agonistas selectivos del receptor VPAC2 y poseen una actividad agonista muy débil con respecto al VPAC1. El PACAP-27 es un potente agonista del VPAC1.

Ejemplo 10. Secreción de Insulina de células de los Islotes de ratas dispersas

[144] La secreción de insulina de Islotes de ratas dispersas mediada por una serie de péptidos de la presente invención se midió como se describe a continuación. Se digirieron los Islotes de Langerhans, aislados de ratas SD (200-250 g), utilizando colagenasa. Las células de los Islotes dispersas fueron tratadas con tripsina, sembradas en placas de 96 pocillos con fondo en V y peletizadas. Luego las células se cultivaron durante la noche en medios con o sin péptidos de esta invención. Los medios fueron aspirados, y las células fueron preincubadas con solución amortiguadora de Krebs-Ringer-HEPES que contenía glucosa 3 mM durante 30 minutos a 37°C. La solución amortiguadora de preincubación se removió, y las células se incubaron a 37°C con solución amortiguadora de Krebs-Ringer-HEPES que contenía la concentración apropiada de glucosa (p. ej., 8 mM), con o sin péptidos, durante un período apropiado. En algunos estudios, también se incluyó una concentración apropiada de GLP-1. Se removió una porción del sobrenadante y se midió su contenido de insulina mediante SPA. Los resultados se expresaron como "cantidad de veces mayor que el control" (fold over control, FOC).

[145] En este ensayo, un aumento en la secreción de insulina de células de los Islotes de ratas dispersas se definió como un aumento de al menos 1,4 veces. El componente agonista del receptor VPAC2 de los polipéptidos de esta invención produjo un aumento en la secreción de insulina de las células de los Islotes dispersas de, al menos, entre 1,4 veces y aproximadamente 1,7 veces.

172
171

Ejemplo 11. Generación de anticuerpos específicos contra los péptidos y medición de los péptidos mediante ELISA

[146] Se generaron anticuerpos policlonales específicos contra los polipéptidos de la presente invención mediante la síntesis de un fragmento específico de un polipéptido de esta invención utilizando un sintetizador de péptidos ABI 433A. Luego, el péptido fue clivado de la resina y purificado en un sistema de HPLC analítica y preparativa System Gold de Beckman. Se utilizó un sistema de espectrofotómetro de masas MALDI Perspective para identificar el producto correcto. El péptido se secó utilizando un liofilizador. Luego, el péptido (2 mg) fue conjugado con hemocianina de lapa californiana (keyhole limpet hemocyanin, KLH) a través del grupo sulfhidrilo libre de la Cys.

[147] Conejas blancas de Nueva Zelanda fueron inmunizadas el Día 0, 14, 35, 56 y 77. El Día 0, a cada coneja se le administró una inyección subcutánea de 250 µg del péptido y el adyuvante de Freund completo. Las inmunizaciones posteriores utilizaron 125 µg del péptido por coneja. Las sangrías se iniciaron el Día 21 y continuaron a intervalos de 21 días en lo sucesivo. La purificación de los anticuerpos contra el péptido se realizó pasando el suero crudo por una columna de purificación por afinidad específica peptídica. La titulación de anticuerpos se determinó mediante ELISA.

[148] Una placa Immulon 4HBX de 96 pocillos se cubrió con un anticuerpo F(ab) C-terminal de Morphosys, específico contra los péptidos de la presente invención y se dejó incubar durante la noche a 4 °C. Luego la placa se bloqueó para impedir la unión no específica. Luego, los estándares de péptidos (2500 ng/mL-160 pg/mL) se diluyeron en plasma al 33%, y las muestras se diluyeron en una proporción 1:3 en solución amortiguadora, seguida de incubación durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubó en la placa un anticuerpo N-terminal policlonal específico contra los péptidos de esta invención, durante una hora. A continuación, se agregó el anticuerpo de burro-anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase, HRP), y las muestras y los estándares fueron incubados durante una hora más. La detección se evaluó después de la incubación con solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), y la placa se lee a una densidad óptica de OD₄₅₀ (Figura 4a).

[149] En forma alternativa, la placa Immulon 4HBX de 96 pocillos se cubrió con un anticuerpo N-terminal policlonal, específico contra los péptidos de la presente invención, y se dejó incubar durante la noche a 4 °C. Luego la placa se bloqueó para impedir la unión no específica. Luego, los estándares de péptidos (2500 ng/mL-160 pg/mL) se diluyeron en plasma al 50%, y las muestras se diluyeron en una proporción 1:2 en solución amortiguadora, seguida de incubación durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubó durante una hora en la placa un anticuerpo anti-PEG monoclonal específico contra los péptidos de esta invención. A continuación, se agregó el anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), y las muestras y los estándares fueron incubados durante una hora más. La detección se evaluó

después de la incubación con solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), y la placa se lee a OD₄₅₀ (Figura 4b).

Ejemplo 12. Farmacocinética de los péptidos después de la administración de dosis IV y subcutáneas

[150] Las muestras de plasma se transfieren a un tubo microcentrífugo y se agrega un volumen equivalente de acetonitrilo a la muestra (concentración final del 50%). La muestra se mezcla en vórtex durante aproximadamente 5 minutos y se deja reposar en hielo durante 10 minutos. La muestra se mezcla vigorosamente en vórtex nuevamente durante aproximadamente 1 minuto, y luego se centrifuga durante 30 minutos en un tubo microcentrífugo (4 °C) a la velocidad máxima (aproximadamente 15.000 x g).

[151] Después de la centrifugación, la fase acuosa se transfiere cuidadosamente a un tubo centrífugo limpio, y la muestra se centrifuga durante 5 minutos en un tubo microcentrífugo (4 °C) a la velocidad máxima (aproximadamente 15.000 x g). La muestra extraída se seca al vacío usando un Speed Vac SC110 (Savant) con la temperatura intermedia hasta que se seque. La muestra se resuspende en un volumen apropiado de agua estéril y se mantiene a 4 °C. Luego, la muestra se homogeniza con ultrasonido en un baño ultrasónico durante 10 minutos a temperatura ambiente antes del análisis. La concentración peptídica se determina utilizando el ensayo indicador según lo descrito en el Ejemplo 9.

[152] Usando este método, las propiedades farmacocinéticas de la ID de SECUENCIA N.° 112 se compararon con las de la ID de SECUENCIA N.° 154 (Figura 5a). La acetilación peptídica presente en la ID de SECUENCIA N.° 112 demuestra mejores propiedades farmacocinéticas, y se detecta a las 24 y 48 horas, mientras que el péptido no acetilado de la ID de SECUENCIA N.° 154 se detecta únicamente a las 6 horas. Estudios posteriores que compararon los dos péptidos demostraron que la ID de SECUENCIA N.° 112 tenía una vida media de 10,9 horas en la rata, mientras que la de la ID de SECUENCIA N.° 154 no acetilada era de aproximadamente 6 horas (Figura 5b).

[153] Las concentraciones peptídicas plasmáticas también pueden medirse utilizando el ensayo ELISA, según lo descrito en el Ejemplo 11. Utilizando esta metodología, se caracterizó aún más la farmacocinética de la ID de SECUENCIA N.° 112 (Figura 5c). En el perro, la ID de SECUENCIA N.° 112 sigue estando presente a una concentración detectable durante una semana.

Ejemplo 13. Efecto de los péptidos PEGilados en la tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratas

[154] Se examinó en ratas la actividad in vivo de los péptidos PEGilados de esta invención, administrados por vía subcutánea. Ratas que habvan ayunado durante la noche recibieron una inyección subcutánea de control o péptido PEGilado (1-100 µg/kg). Tres horas más tarde, se midió el nivel de glucosa en sangre basal, y las ratas recibieron 2 g/kg de glucosa por vía intraperitoneal. El nivel de glucosa en sangre se midió nuevamente al cabo de 15, 30 y 60

174
193

minutos. Un péptido PEGilado de esta invención redujo significativamente los niveles de glucosa en sangre en relación con el vehículo después de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, IPGTT), con una reducción del 17%-28% en el área bajo la curva (area under the curve, AUC) de glucosa (Figuras 6a-6d). Esto demuestra que el péptido PEGilado tiene una prolongada actividad de disminución de la glucosa in vivo. Además de la actividad de disminución de la glucosa de los péptidos PEGilados de la presente invención, también indica que el péptido tiene una vida media in vivo prolongada. El PACAP-27 tiene una vida media muy corta in vivo (< 10 minutos). La capacidad de los péptidos PEGilados de la invención para disminuir el nivel de glucosa en sangre al cabo de 24 (Figura 6b), 41 (Figura 6c), 65 (Figura 6c) y 72 (Figura 6d) horas después de la administración del péptido es una clara indicación de que el péptido está presente en la circulación en este punto en el tiempo y en consecuencia, tiene una vida media prolongada en relación con el PACAP-27 (Figura 6c). Asimismo, los péptidos de la ID de SECUENCIA N.º 112 demuestran mayor potencia y eficacia en puntos en el tiempo más prolongados, en comparación con los péptidos de la ID de SECUENCIA N.º 154 y 155 (Figuras 6b y 6d).

[155] La demostración de la actividad de los polipéptidos de la presente invención puede lograrse a través de ensayos in vitro, ex vivo e in vivo que son bien conocidos en el campo. Por ejemplo, pueden usarse los siguientes ensayos para demostrar la eficacia de un agente farmacéutico para el tratamiento de la diabetes y de trastornos relacionados, como el síndrome X, la intolerancia a la glucosa, la alteración de la glucosa en ayunas y la hiperinsulinemia; la enfermedad aterosclerótica y trastornos relacionados, como la hipertrigliceridemia y la hipercolesterolemia; y la obesidad.

Método para medir los niveles de glucosa en sangre

[156] Se les extrae sangre (de una vena del ojo o la cola) a ratones db/db (obtenidos de Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), y los ratones son agrupados de acuerdo con los niveles de glucosa en sangre medios equivalentes. Se les administra una dosis oral (mediante gavage en un vehículo farmacéuticamente aceptable) del polipéptido de prueba una vez por día durante 14 días. En ese momento, se les vuelve a extraer sangre a los animales, de una vena del ojo o la cola, y se determinan los niveles de glucosa en sangre. En cada caso, los niveles de glucosa se miden con un glucómetro Elite XL (Bayer Corporation, Elkhart, IN).

Método para medir un efecto en los parámetros cardiovasculares

[157] También se evalúan los parámetros cardiovasculares (p. ej., frecuencia cardíaca y presión arterial). Se administra a ratas SHR una dosis oral del vehículo o del polipéptido de prueba una vez por día durante 2 semanas. La presión arterial y frecuencia cardíaca se determinan utilizando un método que implica colocar un manguito en la cola, según se describe en Grinsell, et al., (Am. J. Hypertens. 13:370-375, 2000). En los monos, se monitorean la presión arterial y la frecuencia cardíaca, según se describe en Shen, et al., (J. Pharmacol. Exp. Therap. 278:1435-1443, 1996).

Método para medir los niveles de triglicéridos

175
174

[158] Se les extrae sangre (de una vena del ojo o la cola) a ratones hApoA1 (obtenidos de Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), y los ratones son agrupados de acuerdo con los niveles de triglicéridos en suero medios equivalentes. Se les administra una dosis oral (mediante gavage en un vehículo farmacéuticamente aceptable) del polipéptido de prueba una vez por día durante 8 días. Se les vuelve a extraer sangre a los animales, de la vena del ojo o la cola, y se determinan los niveles de triglicéridos en suero. En cada caso, los niveles de triglicéridos se miden utilizando un Autoanalizador Technicon Axon (Bayer Corporation, Tarrytown, NY).

Método para medir los niveles de colesterol HDL

[159] Para determinar los niveles plasmáticos de colesterol HDL, se les extrae sangre a ratones hApoA1 y se los agrupa de acuerdo con los niveles plasmáticos de colesterol HDL medios equivalentes. Se administra a los ratones una dosis oral del vehículo o del polipéptido de prueba una vez por día durante 7 días, y luego se les vuelve a extraer sangre el día 8. Se analiza el plasma para determinar el colesterol HDL utilizando el Sistema Clínico Synchron (CX4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Método para medir los niveles de colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos y glucosa

[160] En otro ensayo in vivo, se les extrae sangre a monos obesos, luego se les administra una dosis oral del vehículo o del polipéptido de prueba una vez por día durante 4 semanas, y luego se les vuelve a extraer sangre. El suero se analiza para determinar los niveles de colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos y glucosa, utilizando el Sistema Clínico Synchron (CX4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El análisis de subclases de lipoproteínas se realiza mediante la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (nuclear magnetic resonance, NMR) según se describe en Oliver, et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 98:5306-5311, 2001).

[161] Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la especificación anterior se incluyen en la presente por referencia. Diversas modificaciones y variaciones de las composiciones y los métodos de la invención descritos resultarán evidentes para los especialistas en la materia, sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención. Si bien la invención ha sido descrita en relación con aplicaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal como se la reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas aplicaciones específicas. En efecto, se pretende que diversas modificaciones de los modos antes descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para los especialistas en el campo de la bioquímica y otros campos relacionados, se incluyan dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Los especialistas en la materia reconocerán o podrán determinar, con solo realizar experimentos de rutina, muchos equivalentes a las aplicaciones particulares de la invención descrita en la presente.

178
175

Reivindicamos:

1. Un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148, y los fragmentos, derivados y variantes de este funcionalmente equivalentes.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde dicho polipéptido es seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1, 2, 3, 4, 5, 112, 113, 114, 115 y 116.
3. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 1.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
5. El anticuerpo de la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. Un anticuerpo que se une específicamente al polietilenglicol.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
8. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
9. Un método para detectar un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148 en una muestra que implica:
 - a. poner la muestra en contacto con un anticuerpo de la reivindicación 3 o la reivindicación 6,
 - b. detectar dicho anticuerpo, y
 - c. establecer una correlación entre la detección del anticuerpo y la cantidad de polipéptido presente en la muestra.
10. Un método para detectar un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148 en una muestra que implica:
 - a. poner la muestra en contacto con un primer anticuerpo de la reivindicación 3 o la reivindicación 6,
 - b. poner la muestra en contacto con un segundo anticuerpo marcado, donde el segundo anticuerpo se une al primer anticuerpo,
 - c. detectar el marcador, y
 - d. establecer una correlación entre la detección del marcador y la cantidad de polipéptido presente en la muestra.
11. Un kit para detectar un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148 en una muestra que implica: un primer anticuerpo de la reivindicación 3 o la reivindicación 6, y un segundo anticuerpo, donde el segundo anticuerpo se une al primer anticuerpo.

177
170

12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o fragmentos, derivados y variantes de este funcionalmente equivalentes, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, donde dicho polipéptido es seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1, 2, 3, 4, 5, 112, 113, 114, 115 y 116.
14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1, o fragmentos, derivados y variantes de este funcionalmente equivalentes, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y uno o más agentes farmacéuticos.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, donde dicho agente farmacéutico es seleccionado del grupo que comprende los ligandos del PPAR, los secretagogos de insulina, las sulfonilureas, los inhibidores de la α -glucosidasa, los sensibilizantes a la insulina, los compuestos que disminuyen la producción de glucosa hepática, la Insulina y los derivados de la Insulina, las biguanidas, los inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-1B, la dipeptidil peptidasa IV y la 11beta-HSD, los fármacos contra la obesidad, los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, el ácido nicotínico, los fármacos que disminuyen los lípidos, los inhibidores de la ACAT, los secuestradores de ácidos biliares, los inhibidores de la recaptación de ácidos biliares, los inhibidores del transporte de triglicéridos microsomales, los derivados del ácido fibrico, los β -bloqueadores, los inhibidores de la ACE, los bloqueadores de los canales de calcio, los diuréticos, los inhibidores de la renina, los antagonistas del receptor de la AT-1, los antagonistas del receptor de la ET, los inhibidores de la endopeptidasa neutra, los inhibidores de la vasopeptidasa y los nitratos.
16. Una composición que comprende una cantidad efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1, o fragmentos, derivados y variantes de este funcionalmente equivalentes, en combinación con un vehículo inerte.
17. Un método para tratar la diabetes, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
18. El método de la reivindicación 17, donde dicha diabetes es seleccionada del grupo que comprende la diabetes tipo 2, la diabetes hereditaria juvenil tipo 2, la diabetes autoinmune latente del adulto y la diabetes gestacional.
19. Un método para tratar el síndrome X, que comprende el paso de administrar a un sujeto que

178
178

lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.

20. Un método para tratar los trastornos relacionados con la diabetes, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
21. El método de la reivindicación 20, donde dicho trastorno relacionado con la diabetes es seleccionado del grupo que comprende la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa, la alteración de la glucosa en ayunas, la dislipidemia, la hipertrigliceridemia y la resistencia a la insulina.
22. Un método para tratar la diabetes, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1, en combinación con uno o más agentes farmacéuticos.
23. El método de la reivindicación 20, donde dicho agente farmacéutico es seleccionado del grupo que comprende los agonistas del PPAR, las sulfonilureas, los secretagogos no sulfonilureas, los inhibidores de la α -glucosidasa, los sensibilizantes a la insulina, los secretagogos de insulina, los compuestos que disminuyen la producción de glucosa hepática, la insulina y los agentes contra la obesidad.
24. El método de la reivindicación 23, donde dicha diabetes es seleccionada del grupo que comprende la diabetes tipo 2, la diabetes de la madurez de inicio en el joven, la diabetes autoinmune latente del adulto y la diabetes gestacional.
25. Un método para tratar el síndrome X, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1, en combinación con uno o más agentes farmacéuticos.
26. El método de la reivindicación 25, donde dicho agente farmacéutico es seleccionado del grupo que comprende los agonistas del PPAR, las sulfonilureas, los secretagogos no sulfonilureas, los inhibidores de la α -glucosidasa, los sensibilizantes a la insulina, los secretagogos de insulina, los compuestos que disminuyen la producción de glucosa hepática, la insulina y los agentes contra la obesidad.
27. Un método para tratar los trastornos relacionados con la diabetes, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1, en combinación con uno o más agentes farmacéuticos.
28. El método de la reivindicación 27, donde dicho trastorno relacionado con la diabetes es seleccionado del grupo que comprende la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa, la alteración de la glucosa en ayunas, la dislipidemia, la hipertrigliceridemia y

179
178

la resistencia a la Insulina.

29. El método de la reivindicación 28, donde dicho agente farmacéutico es seleccionado del grupo que comprende los agonistas del PPAR, las sulfonilureas, los secretagogos no sulfonilureas, los inhibidores de la α -glucosidasa, los sensibilizantes a la Insulina, los secretagogos de Insulina, los compuestos que disminuyen la producción de glucosa hepática, la Insulina y los agentes contra la obesidad.
30. Un método para tratar la diabetes, el Síndrome X o los trastornos relacionados con la diabetes, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1, en combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo que comprende los Inhibidores de la HMG-CoA reductasa, el ácido nicotínico, los fármacos que disminuyen los lípidos, los Inhibidores de la ACAT, los secuestradores de ácidos biliares, los Inhibidores de la recaptación de ácidos biliares, los inhibidores del transporte de triglicéridos microsomales, los derivados del ácido fibrílico, los β -bloqueadores, los Inhibidores de la ACE, los bloqueadores de los canales de calcio, los diuréticos, los Inhibidores de la renina, los antagonistas del receptor de la AT-1, los antagonistas del receptor de la ET, los inhibidores de la endopeptidasa neutra, los Inhibidores de la vasopeptidasa y los nitratos.
31. El método de la reivindicación 30, donde dicho trastorno relacionado con la diabetes es seleccionado del grupo que comprende la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa, la alteración de la glucosa en ayunas, la dislipidemia, la hipertrigliceridemia y la resistencia a la Insulina.
32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 31, donde el polipéptido de la reivindicación 1 y uno o más agentes farmacéuticos se administran como una forma galénica única.
33. Un método para tratar la diabetes o prevenir las causas secundarias de dicha enfermedad, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
34. El método de la reivindicación 33, donde dicha causa secundaria es seleccionada del grupo que comprende el exceso de glucocorticoides, el exceso de la hormona de crecimiento, el feocromocitoma y la diabetes farmacógena.
35. Un método para tratar la diabetes o prevenir las causas secundarias de dicha enfermedad, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1, en combinación con uno o más agentes farmacéuticos.

130
179

36. El método de la reivindicación 35, donde dicho agente farmacéutico es seleccionado del grupo que comprende los agonistas del PPAR, las sulfonilureas, los secretagogos no sulfonilureas, los inhibidores de la α -glucosidasa, los sensibilizantes a la insulina, los secretagogos de insulina, los compuestos que disminuyen la producción de glucosa hepática, la insulina y los agentes contra la obesidad.
37. Un método para tratar la enfermedad respiratoria, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
38. Un método para tratar la obesidad, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
39. Un método para tratar la enfermedad cardiovascular, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
40. El método de la reivindicación 39, donde dicha enfermedad cardiovascular es seleccionada del grupo que comprende la aterosclerosis, la enfermedad cardíaca coronaria, la enfermedad de las arterias coronarias y la hipertensión.
41. Un método para tratar los trastornos del metabolismo de los lípidos y carbohidratos, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
42. Un método para tratar los trastornos del sueño, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
43. Un método para tratar los trastornos reproductivos masculinos, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
44. Un método para tratar los trastornos del crecimiento o de la homeostasis energética, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
45. Un método para tratar las enfermedades inmunitarias, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un

180

polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.

46. Un método para tratar las enfermedades autoinmunes, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
47. Un método para tratar las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
48. Un método para tratar el choque séptico, que comprende el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
49. Un método para estimular la liberación de insulina en una forma dependiente de la glucosa en un sujeto que lo necesite, al administrarle a dicho sujeto un polipéptido de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12.
50. Los polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento y/o la profilaxis de la diabetes y los trastornos relacionados con la diabetes.
51. Un medicamento que contiene al menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en combinación con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y farmacéuticamente seguro.
52. El uso de los polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 1 para fabricar un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la diabetes y los trastornos relacionados con la diabetes.
53. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 51 para el tratamiento y/o la profilaxis de la diabetes.

182
181

RESUMEN

Esta invención proporciona péptidos nuevos que funcionan in vivo como agonistas del receptor VPAC2. Se ha demostrado que estos polipéptidos secretagogos de insulina disminuyen el nivel de glucosa en sangre in vivo al realizar una prueba de tolerancia a la glucosa. Los polipéptidos de esta invención también son estables en la formulación y tienen vidas medias prolongadas. Los péptidos de la presente invención proporcionan una terapia para los pacientes con una reducción de la secreción de insulina endógena, por ejemplo, diabetes tipo 2. La invención también está orientada a un método para tratar una enfermedad metabólica en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de los péptidos.

183
182

ID de SECUENCIA	Secuencia
1	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLSIKQKRY
2	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKRY
3	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLSIKQK
4	Ac-HTEAVFTDQYTRLRKQVAACKYLSIKQKRY
5	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQLAVKKYLDIKQGGT
6	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKR
7	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLOTIKQKRY
8	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLOTIKQKRY
9	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAHKYLSIKQKRY
10	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKHYLSIKQKRY
11	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLSIKQKR
12	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLSIKQKR
13	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMARKKYLSIKQKR
14	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIKQKR
15	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIPQKR
16	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIQQKR
17	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIRQKR
18	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQRR
19	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKA
20	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKF
21	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKH
22	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKI
23	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKK
24	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKL
25	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKM
26	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKP
27	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKQ
28	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKS
29	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKT
30	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKV
31	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKW
32	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKY
33	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLSIKQRI
34	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLSIKQRI
35	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIKQRI
36	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIPQRI
37	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIRQRI

FIG. 1a

184
183

ID de SECUENCIA	Secuencia
38	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
39	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKRY
40	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQK
41	Ac-HTEAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
42	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLQDIKGGT
43	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKR
44	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLQTIKQKRY
45	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQTIKQKRY
46	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAAHKYLQSIKQKRY
47	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKHYLQSIKQKRY
48	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLQSIKQKR
49	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQKR
50	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLQSIKQKR
51	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLQSIKQKR
52	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIPOKR
53	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIQOKR
54	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIROKR
55	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQRR
56	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKA
57	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKF
58	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKH
59	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKI
60	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKK
61	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKL
62	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKM
63	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKP
64	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKQ
65	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKS
66	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKT
67	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKV
68	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKW
69	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKY
70	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLQSIKQRI
71	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQRI
72	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLQSIKQRI
73	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIPORI
74	Ac-HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLQSIRORI

FIG. 1b

285
184

ID de SECUENCIA	Secuencia
75	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLQSIKNKRY
76	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKRY
77	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLQSIKNK
78	Ac-HTEAVFTDQYTRLRKQVAACKYLQSIKNKRY
79	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQLAVKKYLQDIKNGGT
80	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKR
81	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLQTIKNKRY
82	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQTIKNKRY
83	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAHKKYLQSIKNKRY
84	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKHYLQSIKNKRY
85	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLQSIKNKR
86	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKKYLQSIKNKR
87	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMARKKYLQSIKNKR
88	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIKNKR
89	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIIPNKR
90	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIQNKR
91	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIRNKR
92	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNRR
93	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKA
94	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKF
95	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKH
96	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKI
97	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKK
98	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKL
99	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKM
100	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKP
101	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKQ
102	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKS
103	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKT
104	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKV
105	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKW
106	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKY
107	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLQSIKNRI
108	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKKYLQSIKNRI
109	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIKNRI
110	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIIPNRI
111	Ac-HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIRNRI

FIG. 1c

186
185

ID de SECUENCIA	Secuencia
112	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQVAACKYLSIKQKRYC-PEG
113	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKRYC-PEG
114	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQVAACKYLSIKQKRC-PEG
115	Ac-HTEAVFTDQYTLRKQVAACKYLSIKQKRYC-PEG
116	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQLAVKKYLQDIKQGGTC-PEG
117	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKRC-PEG
118	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQLAACKYLQTIKQKRYC-PEG
119	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLQTIKQKRYC-PEG
120	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAAHKYLSIKQKRYC-PEG
121	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAAKHYLSIKQKRYC-PEG
122	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAGKKYLSIKQKRC-PEG
123	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLSIKQKRC-PEG
124	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMARKKYLSIKQKRC-PEG
125	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLSIKQKRC-PEG
126	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIPQKRC-PEG
127	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIQQKRC-PEG
128	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIRQKRC-PEG
129	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQRRRC-PEG
130	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKAC-PEG
131	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKFC-PEG
132	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKHC-PEG
133	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKIC-PEG
134	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKKC-PEG
135	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKLC-PEG
136	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKMC-PEG
137	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKPC-PEG
138	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKQC-PEG
139	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKSC-PEG
140	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKTC-PEG
141	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKVC-PEG
142	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKWC-PEG
143	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIKQKYC-PEG
144	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAGKKYLSIKQRIC-PEG
145	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLSIKQRIC-PEG
146	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLSIKQRIC-PEG
147	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAACKYLSIPQRIC-PEG
148	Ac-HSDAVFTDQYTLRKQMAKKYLSIRQRIC-PEG

FIG. 1d

185
186

ID de SECUENCIA	Secuencia
149	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVK NK (PACAP38)
150	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL (PACAP27)
151	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYL N SIL N (VIP)
152	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQSIKQKRY
153	Ac-HTDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQSIKQKRY
154	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQSIKQKRYC-PEG
155	Ac-HTDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQSIKQKRYC-PEG

FIG. 1e

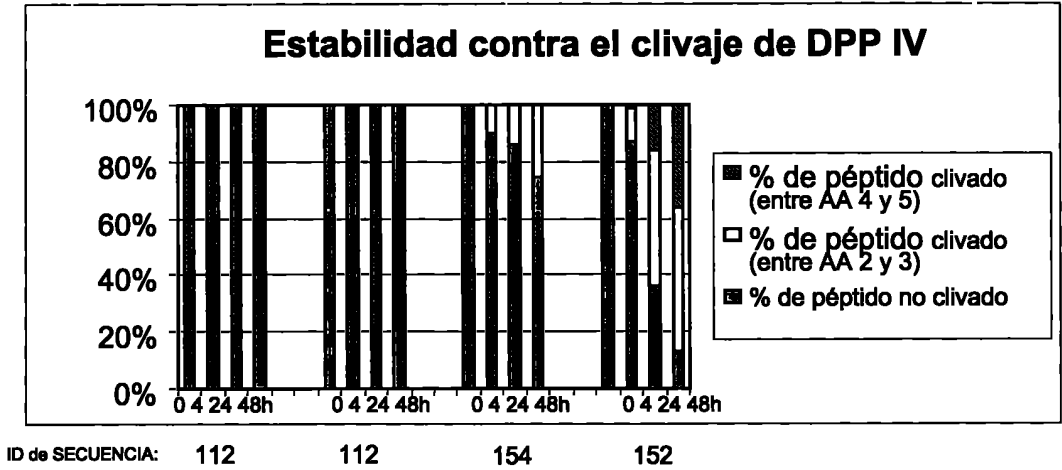
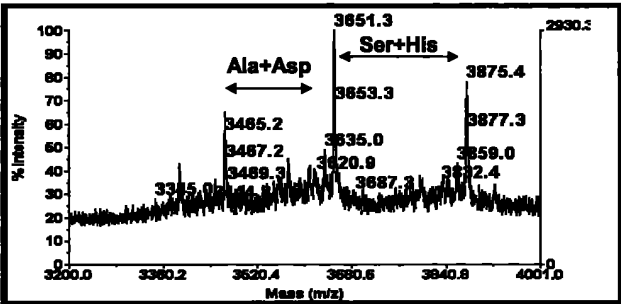
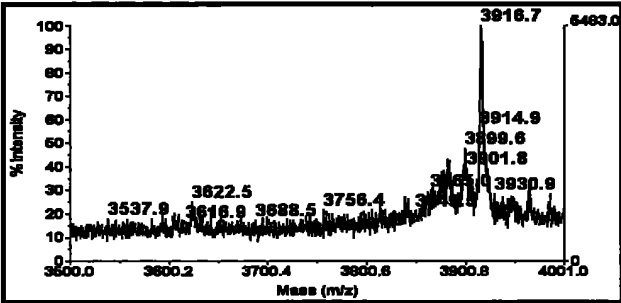


Figura 2a



ID de SECUENCIA: 152
clivada por la DPPIV



ID de SECUENCIA: 1 no
clivada por la DPPIV

Figura 2b

152

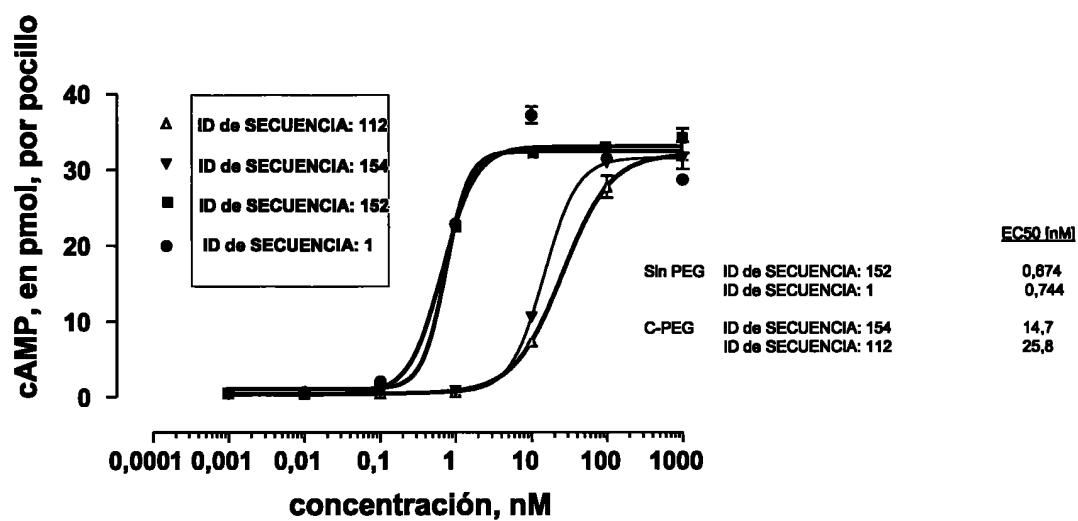


Figura 3

190

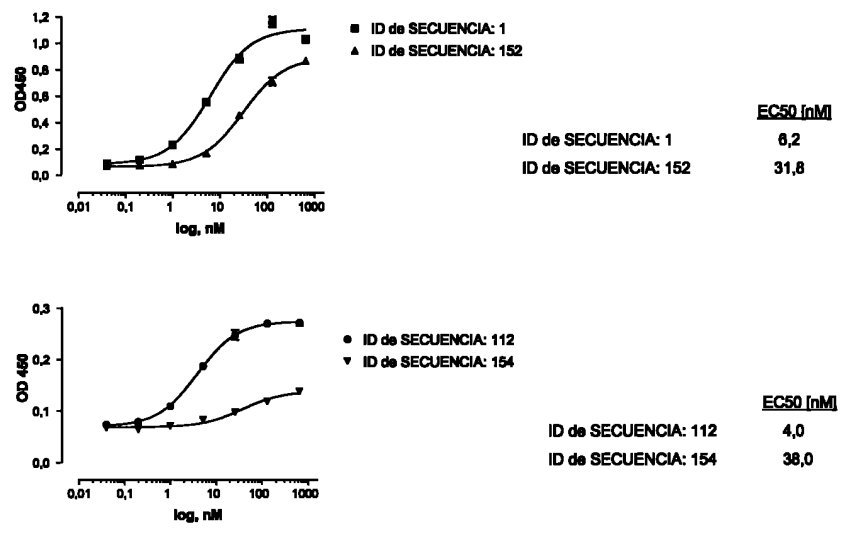
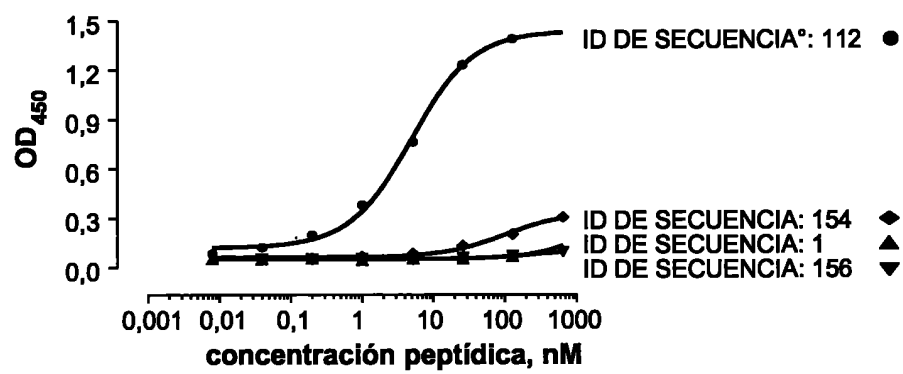


Figura 4a



ID de SECUENCIA:	112	1	156	154
EC50 (nM)	4,972	5834	332,6	103,3

Figura 4b

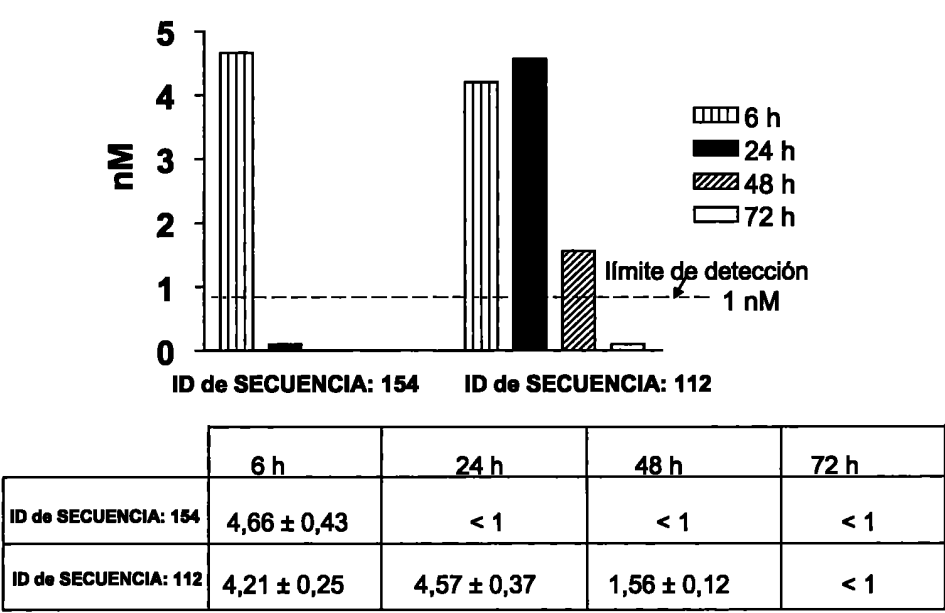


Figura 5a

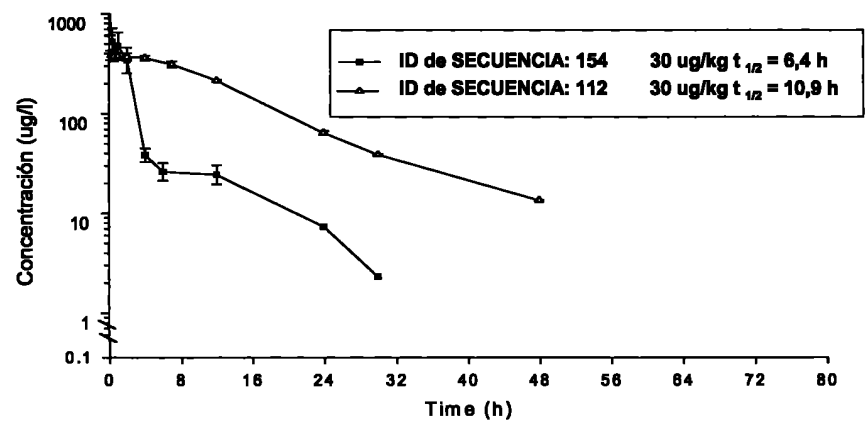


Figura 5b

193

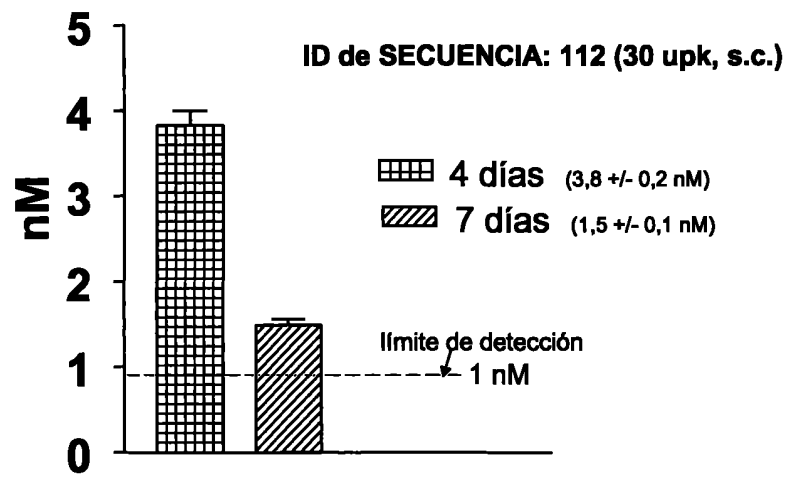


Figura 5c

PK (ensayo con indicador luciferasa CRE)

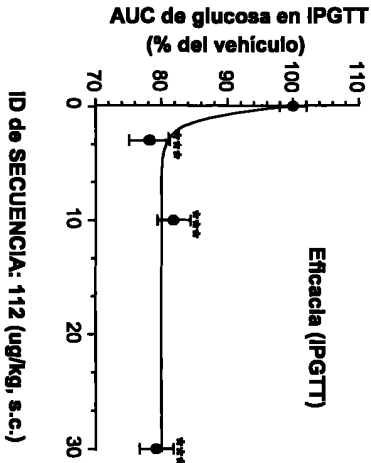
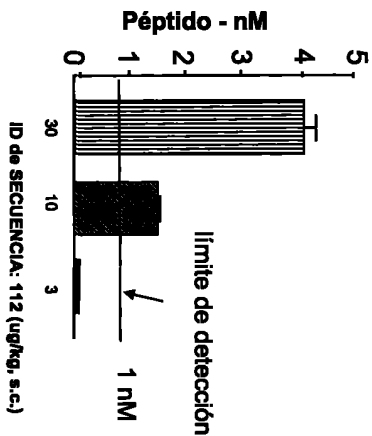


Figura 6a

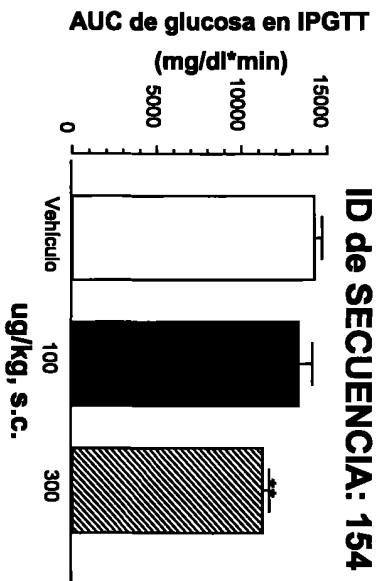
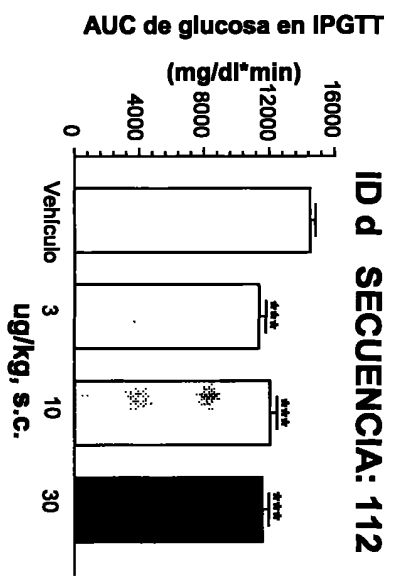


Figura 6b

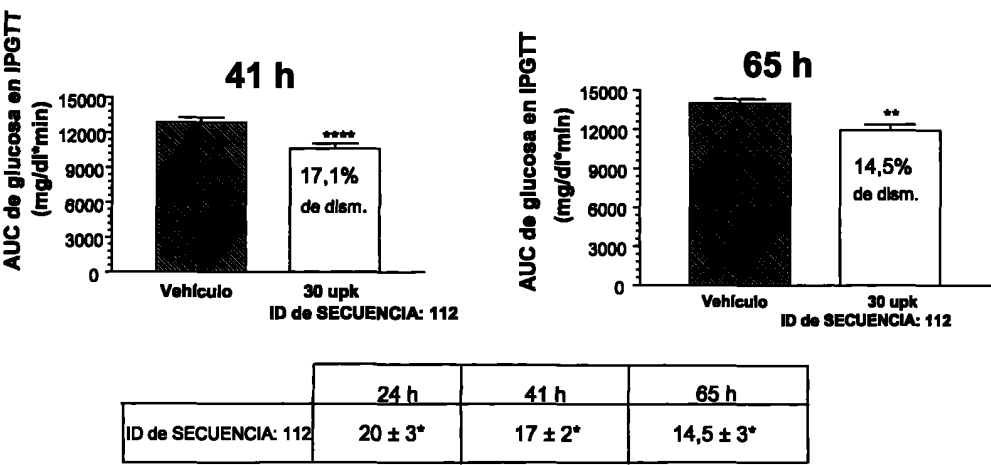


Figura 6c

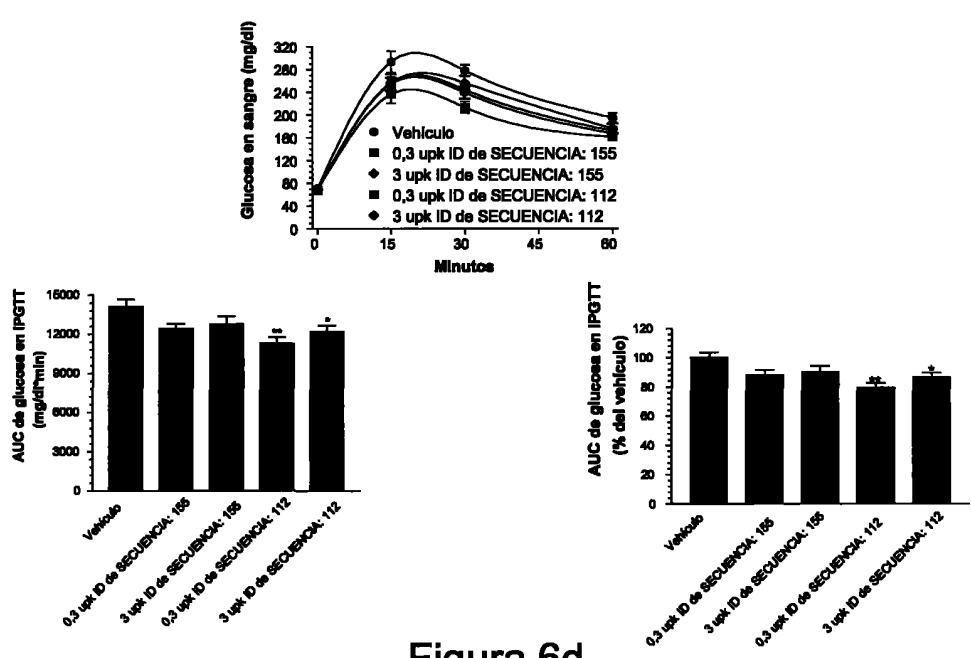


Figura 6d

200
199

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer Pharmaceuticals Corporation
Clairmont, Kevin
Lumb, Kevin
Buckholz, Thomas
Salhanick, Arthur

<120> PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING PEPTIDE (PACAP) RECEPTOR
(VPAC2) AGONISTS AND THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF USE

<130> 5189

<150> US 60/539,550
<151> 2004-01-27

<150> US 60/566,499
<151> 2004-04-29

<160> 155

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 1

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 2
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 2

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

201
200

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(29)
<223> ACETYLATION

<400> 3

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys
20 25

<210> 4
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 4

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 5
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 5

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

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr
20 25 30

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

202
291

<400> 6

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 7

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30<210> 8
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 8

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30<210> 9
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 9

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

203
202

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 10

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

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 11
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 11

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
 20 25 30

<210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 12

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
 20 25 30

<210> 13

204
293

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 13

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

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 14

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 15

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg
20 25 30

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

<220>

205
204

<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 16

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 17
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 17

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 18
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 18

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Arg
20 25 30

<210> 19
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 19

206
285

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala
20 25 30

<210> 20
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 20

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe
20 25 30

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 21

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His
20 25 30

<210> 22
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 22

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile
20 25 30

297
296

<210> 23
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 23

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys
20 25 30

<210> 24
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 24

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Leu
20 25 30

<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 25

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Met
20 25 30

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

208
207

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 26

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Pro
20 25 30

<210> 27
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 27

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln
20 25 30

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 28

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser
20 25 30

<210> 29
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

209
208

<400> 29

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Thr
20 25 30<210> 30
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 30

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Val
20 25 30<210> 31
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 31

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Trp
20 25 30<210> 32
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 32

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

240
209

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Tyr
20 25 30

<210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 33

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 34

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 35
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 35

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 36

212
219

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

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 36

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 37

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 38
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 38

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 39
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

212
211

<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 39

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 40
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(29)
<223> ACETYLATION

<400> 40

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys
20 25

<210> 41
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 41

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 42
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 42

273
212

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr
20 25 30

<210> 43
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 43

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 44
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 44

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 45
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 45

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

214
213

<210> 46
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 46

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 47
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 47

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 48
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 48

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 49
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

218
214

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 49

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 50

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 51
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

<400> 51

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 52
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLTATION

216
215

<400> 52

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 53

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 53

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

<210> 54

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 54

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

<210> 55

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 55

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

217
216

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Arg
20 25 30

<210> 56
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 56

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala
20 25 30

<210> 57
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 57

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe
20 25 30

<210> 58
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 58

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His
20 25 30

<210> 59

218
218

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 59

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile
20 25 30

<210> 60
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 60

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys
20 25 30

<210> 61
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 61

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Leu
20 25 30

<210> 62
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

218

<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 62

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Met
20 25 30

<210> 63
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 63

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Pro
20 25 30

<210> 64
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 64

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln
20 25 30

<210> 65
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 65

280
219

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser
20 25 30

<210> 66
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 66

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Thr
20 25 30

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 67

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Val
20 25 30

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 68

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Trp
20 25 30

221
220

<210> 69
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 69

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Tyr
20 25 30

<210> 70
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 70

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 71
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 71

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 72
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

222
221

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 72

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 73

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 74
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 74

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 75
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

223
222

<400> 75

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 76
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 76

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 77
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(29)
<223> ACETYLATION

<400> 77

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys
20 25

<210> 78
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 78

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

224
223

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 79
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 79

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

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Asn Gly Gly Thr
20 25 30

<210> 80
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 80

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
20 25 30

<210> 81
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 81

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

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 82

225
224

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

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 82

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 83
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 83

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

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 84
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 84

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

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 85
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

226
225

<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 85

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
20 25 30

<210> 86
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 86

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
20 25 30

<210> 87
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 87

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

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
20 25 30

<210> 88
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 88

227
226

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 89
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 89

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 90
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 90

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 91
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 91

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Asn Lys Arg
 20 25 30

208
227

<210> 92
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 92

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Arg
20 25 30

<210> 93
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 93

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ala
20 25 30

<210> 94
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(30)
<223> ACETYLATION

<400> 94

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Phe
20 25 30

<210> 95
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

228
228

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 95

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys His
 20 25 30

<210> 96
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 96

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ile
 20 25 30

<210> 97
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 97

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Lys
 20 25 30

<210> 98
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

230
229

<400> 98

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

<210> 99

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 99

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

<210> 100

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 100

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Pro
20 25 30

<210> 101

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(30)

<223> ACETYLATION

<400> 101

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

281
230

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Gln
 20 25 30

<210> 102
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 102

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ser
 20 25 30

<210> 103
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 103

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Thr
 20 25 30

<210> 104
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 104

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Val
 20 25 30

<210> 105

282
231

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

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 105

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Trp
 20 25 30

<210> 106
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 106

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Tyr
 20 25 30

<210> 107
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 107

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
 20 25 30

<210> 108
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

233
232

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 108

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
 20 25 30

<210> 109
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 109

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
 20 25 30

<210> 110
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 110

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Asn Arg Ile
 20 25 30

<210> 111
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 111

224
233

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Asn Arg Ile
20 25 30

<210> 112
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 112

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 113
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 113

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 114
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(30)

285
234

<223> Cysteine at position 30 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(30)
 <223> ACETYLATION

<400> 114

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Cys
 20 25 30

<210> 115
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(32)
 <223> ACETYLATION

<400> 115

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
 20 25 30

<210> 116
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(32)
 <223> ACETYLATION

<400> 116

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

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr Cys
 20 25 30

226
235

<210> 117
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 117

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
20 25 30

<210> 118
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 118

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

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 119
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 119

237
236

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 120
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 120

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

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 121
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLATION

<400> 121

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

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 122
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE

238
237

<222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 122

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

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
 20 25 30

<210> 123
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 123

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

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
 20 25 30

<210> 124
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 124

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

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
 20 25 30

239
238

<210> 125
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 125

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys
20 25 30

<210> 126
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 126

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg Cys
20 25 30

<210> 127
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

240
239

<400> 127

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

<210> 128

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLTATION

<400> 128

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

<210> 129

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLTATION

<400> 129

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

<210> 130

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

24
240

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLTATION

<400> 130

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala Cys
 20 25 30

<210> 131
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLTATION

<400> 131

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe Cys
 20 25 30

<210> 132
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLTATION

<400> 132

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His Cys
 20 25 30

242
241

<210> 133
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 133

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile Cys
20 25 30

<210> 134
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 134

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys Cys
20 25 30

<210> 135
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

243
242

<400> 135

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

<210> 136

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 136

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

<210> 137

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 137

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

<210> 138

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

244
243

20

25

30

<210> 141
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 141

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Val Cys
20 25 30

<210> 142
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 142

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Trp Cys
20 25 30

<210> 143
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)

245
244

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 138

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln Cys
20 25 30

<210> 139
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 139

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser Cys
20 25 30

<210> 140
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLATION

<400> 140

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Thr Cys
Page 45

2846
245

<223> ACETYLATION

<400> 143

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

<210> 144

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 144

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

<210> 145

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(31)

<223> ACETYLATION

<400> 145

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

<210> 146

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

247
246

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 146

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

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile Cys
 20 25 30

<210> 147
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 147

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

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile Cys
 20 25 30

<210> 148
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> Cysteine at position 31 is PEGylated.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(31)
 <223> ACETYLATION

<400> 148

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

248
247

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile Cys
 20 25 30

<210> 149
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149

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

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
 20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys
 35

<210> 150
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 150

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

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
 20 25

<210> 151
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 151

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
 20 25

<210> 152
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 152

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 153

249
248

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(31)
<223> ACETYLTATION

<400> 153

His Thr Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 154
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<400> 154

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

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

<210> 155
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(32)
<223> ACETYLTATION

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(32)
<223> Cysteine at position 32 is PEGylated.

<400> 155

His Thr Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys
20 25 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/02609

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) : A61K 38/00, 38/16 US CL : 530/300, 324 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) U.S. : 530/300, 324 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	EP 0536741A2 (Bolin et al) 14 April 2003 (14.04.93), p. 16, lines 22-23; p.29, lines 39-40; p.128.	1, 2, 12-16, 37																		
X	WO 01/23420 A2 (Pan et al) 05 April 2001 (05.04.2001), entire document especially p.5, line 1; p.33, line 3; p.16, line 35 - p.17, line 21; p.23; p.38	1-4, 9, 12-18, 20-24, 27-29, 32, 33, 37, 39, 43, 47, 49, and 51-53																		
X	WO 03/068805 A2 (Wang et al) 21 August 2003 (21.08.2003), entire document.	1, 2, 12-28, 30-36, 38-41, and 49-53																		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																				
<table border="0"><tr><td>* Special categories of cited documents:</td><td>"I"</td><td>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</td></tr><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"X"</td><td>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</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td><td>"Y"</td><td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td></tr><tr><td>"L" document which may throw doubts on priority date(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td><td>"A"</td><td>document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td></td><td></td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td><td></td></tr></table>			* Special categories of cited documents:	"I"	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	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority date(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"A"	document member of the same patent family	"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		
* Special categories of cited documents:	"I"	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																		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																		
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
"L" document which may throw doubts on priority date(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"A"	document member of the same patent family																		
"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																				
Date of the actual completion of the international search 19 December 2005 (19.12.2005)		Date of mailing of the international search report 09 MAR 2006																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1490 Alexandria, Virginia 22313-1490 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Gregory S. Emswiler Telephone No. (571) 472-1600																		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/02609

28
250

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.: 6-8
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:
There was a lack of antecedent basis in the claims, i.e., the claims are drawn to "the polyethylene glycol."
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:

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 additional fees, this Authority did not invite payment of any 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/US05/02609

252
251

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
A_Genbank databases, USPTO databases: Published_Applications_AA, PIR databases, UniProt databases,
SEQ ID NOs: 1-5 and 112-116



REVINDICACIONES

- REIVINDICACIONES**

 1. Un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148, y los fragmentos, derivados y variantes de este funcionalmente equivalentes.
 2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde dicho polipéptido es seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1, 2, 3, 4, 5, 112, 113, 114, 115 y 116.
 3. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 1.
 4. El anticuerpo de la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
 5. El anticuerpo de la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
 6. Un anticuerpo que se une específicamente al polietilenglicol.
 7. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
 8. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
 9. Un método para detectar un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148 en una muestra que implica:
 - a. poner la muestra en contacto con un anticuerpo de la reivindicación 3 o la reivindicación 6,
 - b. detectar dicho anticuerpo, y
 - c. establecer una correlación entre la detección del anticuerpo y la cantidad de polipéptido presente en la muestra.
 10. Un método para detectar un polipéptido seleccionado del grupo que comprende las ID de SECUENCIA N.º 1 a 148 en una muestra que implica:
 - a. poner la muestra en contacto con un primer anticuerpo de la reivindicación 3 o la reivindicación 6,
 - b. poner la muestra en contacto con un segundo anticuerpo marcado, donde el segundo anticuerpo se une al primer anticuerpo,
 - c. detectar el marcador, y
 - d. establecer una correlación entre la detección del marcador y la cantidad de polipéptido presente en la muestra.

254
253

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-078328- -00000-0000
Fec: 2006-06-09 17:36:24 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Cve: 379 FASCNACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 264

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 53,916
FECHA : JULIO 17 DE 2006

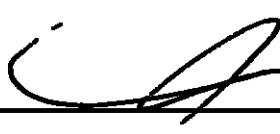
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55272326	17/07/2006	30,131,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo 14125-841-011-9



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-078328-00000-0000
Fec: 2006-06-09 17:36:24 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Cve: 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 284

254

REQUISITOS MINIMOS PARA ADICION A TRAZADO
PCT

PATENTE DE INVENCION [/]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [/]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [/]
- ◆ Descripción de la invención [/]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [/]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [/]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

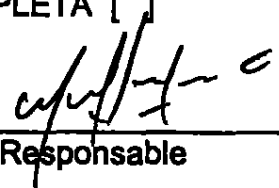
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha 09 AGO. 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 August 2005 (11.08.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/072385 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 38/00 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/002609

(22) International Filing Date: 27 January 2005 (27.01.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date:
60/539,550 27 January 2004 (27.01.2004) US
60/566,499 29 April 2004 (29.04.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER
PHARMACEUTICALS CORPORATION [US/US];
400 Morgan Lane, West Haven, Connecticut 06516 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CLAIRMONT,
Kevin [US/US]; 80 Merwin Circle, Cheshire, Connecticut
06410 (US). LUMB, Kevin, J. [US/US]; 520 Granite
Road, Guilford, Connecticut 06437 (US). BUCKHOLZ,
Thomas [US/US]; 10 Morehouse Avenue, Milford, Con-
necticut 06460 (US). SALHANICK, Arthur, L. [US/US];
430 Bellevue Road, New Haven, Connecticut 06511 (US).

(74) Agents: GREENMAN, Jeffrey, M. et al.; Bayer Phar-
maceuticals Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven,
Connecticut 06516 (US).

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

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, 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))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
8 June 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PITUITARY ADENYLATE CYCLASE ACTIVATING PEPTIDE (PACAP) RECEPTOR (VPAC2) AGONISTS AND
THEIR PHARMACOLOGICAL METHODS OF USE

(57) Abstract: This invention provides novel peptides that function in vivo as agonists of the VPAC2 receptor. These insulin
secretagogue polypeptides are shown to lower blood glucose in vivo upon glucose challenge. The polypeptides of this invention
are also stable in formulation and have long half-lives. The peptides of the present invention provide a therapy for patients with
decreased endogenous insulin secretion, for example, type 2 diabetics. The invention is also directed to a method of treating a
metabolic disease in a mammal comprising administering a therapeutically effective amount of the peptides to said mammal.

WO 2005/072385 A3

2557
256

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
BAYER PHARMACEUTICALS CORPORATION

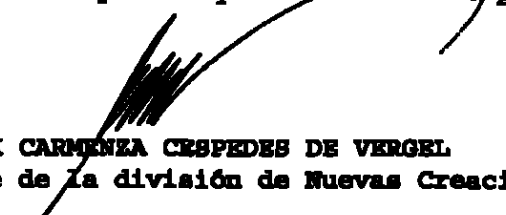
REFERENCIA	Radicación No.	6 78328
	Solicitud internacional	US2005/002609
	Fecha inicio fase nacional	27/08/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	11120

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT. En caso de no tener copia y/o anexos del examen preliminar se debe anexar copia del formato PCT/IPEA/402, emitido por la autoridad competente.

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

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


ALIX CARMONA CRESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29-SET-2006
adpal