



Organizacion CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGACION DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

07-79239

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: AGONISTAS DE PYY Y SUS USOS

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC.

DIRECCION: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 E.U.A

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTA, 2 de Agosto de 2007

P22007000113

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIEDMAN



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-079239-00000-0000

Fecha: 2007-08-02 16:30:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 167

PETITORIO - FORMULARIO UN PATENTE PC ENTRADA EN FASE NA SOLICITUD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-079239-00000-0000

Fecha: 2007-08-02 16:30:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 167

1

☒

Patente de Invención.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

Sept 4/2007

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC

Dirección: Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/000270

Fecha Enero 30, 2006

Publicación Internacional No. WO 2006/082517

Fecha Agosto 10, 2006

6

Título (54) AGONISTAS DE PYY Y SUS USOS

Clasificación Internacional (51) C07K 14/575, A61K 47/48, A61K 38/22.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Febrero 4, 2005

Noviembre 4, 2005

(31) Número de Solicitud

60/650.366

60/733.656

9

Comprobante de pago No. 07 - 60.712

Fecha 26 de Julio de 2007

10

ANEXOS

☒

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

☐

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

☒

Poderes, si fuere el caso.

☒

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 internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

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

☐

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

☐

Arte final 12 x 12.

☐

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

☒

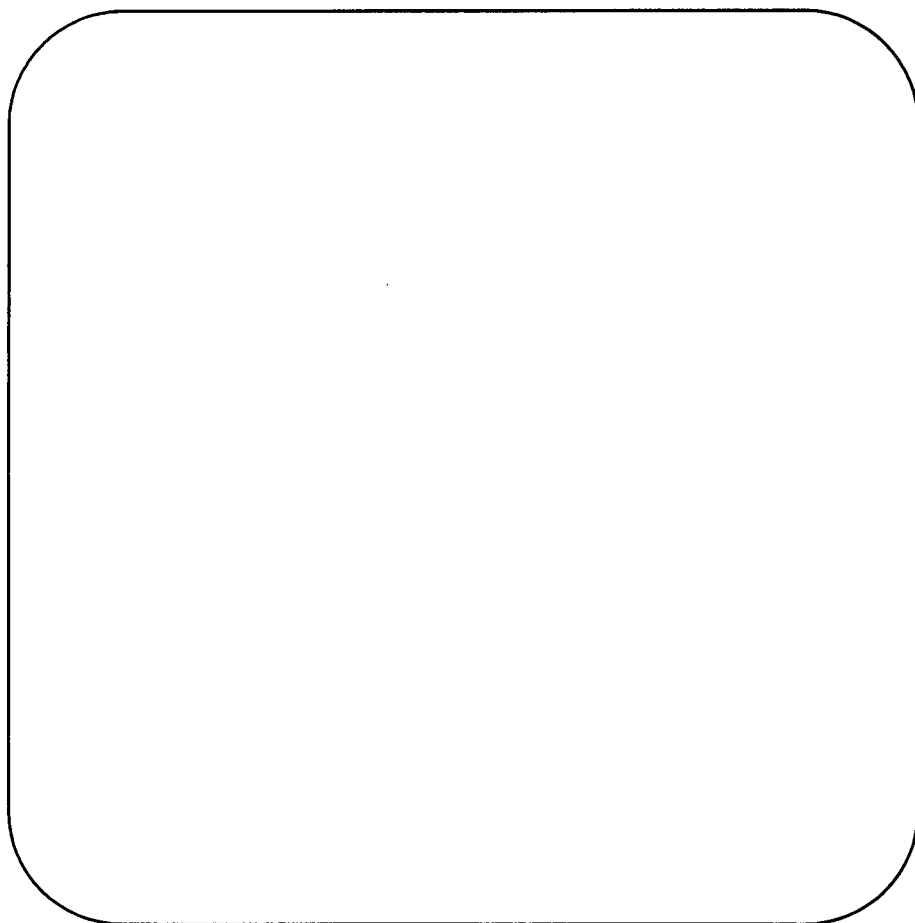
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Bta T.P. 74.295

3

LISTA DE INVENTORES PCT/IB2006/000270

Rory Francis FINN,

700 Chesterfield Parkway West,
Chesterfield, MO 63017-1732
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Ned Roger SIEGEL,

700 Chesterfield Parkway West,
Chesterfield, MO 63017-1732
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Neena Lynne SUMMERS,

1203 Saddlemaker Drive,
St. Charles, MO 63304-2423
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Nancy Ann NARDONE,

Eastern Point Road,
Groton, CT 06340
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 60,712
FECHA : JULIO 26 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-079239-00000-0000

Fecha: 2007-08-02 16:30:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 167

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-079239-00000-0000

Fecha: 2007-08-02 16:30:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 167

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBECK	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	67532137	26/07/2007	4,866,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
TOTAL :			\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

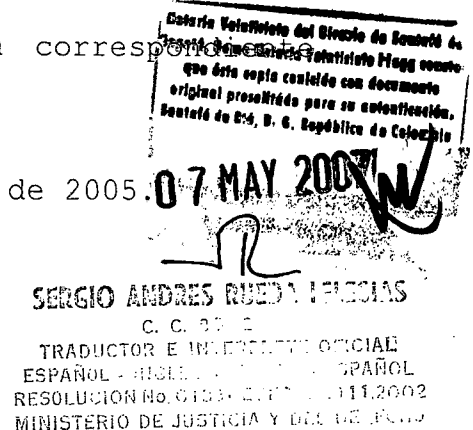
Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por **PFIZER PRODUCTS, INC.**, a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por Grover F. Fuller, Jr. el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de **Grover F. Fuller, Jr.**, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por Susan Z. Killian, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mi el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian



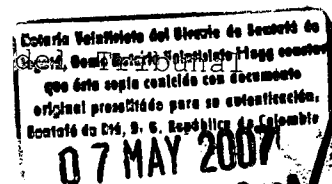
6

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.



SERGIO ANDRÉS RUEDA
C. C. 3. 1. 773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCIÓN No. 0138 DE FEBRERO 11 DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

7

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Fue firmado por: Norman Goodman

3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado

4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

Se certificó:

5. En Nueva York, Nueva York

6. El 22 de noviembre de 2005

7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York

8. Bajo el Número **NYC-10404952A**

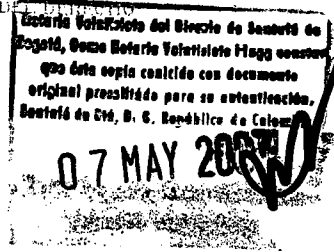
9. Aparece Sello del Estado de Nueva York

10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
REGISTRACION No. 0138 DI FEBRERO 11, 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

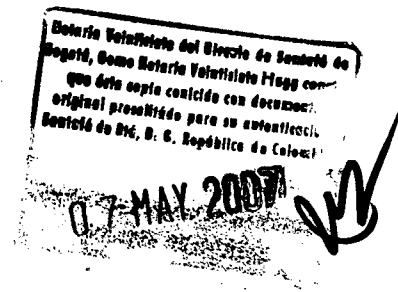
1. Country: **United States of America**
- This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York 6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp 10. Signature

James Bizzarri

James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State



Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
Zaava Ravid
Jacqueline Chaparro
Jose Luis Londoño
Camilo Alvarez
Felipe Mendoza
Camilo Rodríguez
Santiago Pardo

Of Counsel
Guillermo Chahín
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

PFIZER PRODUCTS INC.,

Signature/Firma:

By:

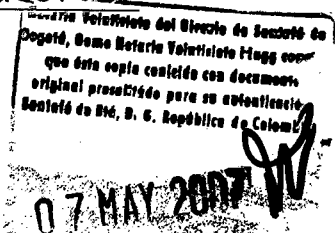
Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In- Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

City/Country/Ciudad,País: New York, NY USA



10

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street
City New York
State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of **PFIZER PRODUCTS INC.**

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

3. That **PFIZER PRODUCTS INC.**, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. Que con sede principal ubicada en

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

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

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

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan Z. Killian



SUSAN Z. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01KI6116521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
this 17 day of Nov. 2005
Susan Z. Killian

Notario Voluntario del Estado de Colombia
Declaro, Como Notario Voluntario Pagar la
que esta copia concide con documento
original presentado para su autenticación
Notario de Nro. D. C. República de Colombia
07 MAY 2007

Sébase que Yo, GREGORY JOHN TAYLOR, 37 Meadway, Ashford, Middlesex, TW15 2TJ, Reino Unido, un Notario Publico debidamente autorizado

Certifico que el documento anexo a la presente, llamado

CESION, firmado por RORY FRANCIS FINN, NED ROGER SIEGEL Y NEENA LYNNE SUMMERS

Ha sido presentado ante mi en esta fecha por los Servicios Consulares de Blair en nombre de su cliente Pfizer Products Inc, y que los mencionados Servicios Consulares de Blair Limitada, han representado ante mi como presentación de dicho cliente ha representado a ellos con base en un documento original con firmas debidamente autenticas.

Firmado y sellado en 37 Meadway, Ashford, Middlesex, TW15 2TJ, Reino Unido, el 30 de Mayo de 2007.

[Firmado y sellado]

Gregory John Taylor
Notario Público
37 Meadway,
Ashford, Middlesex, TW15 2TJ,
Reino Unido
30-05-2007

12

Apostille

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

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público ha sido firmado por: Gregory John Taylor
3. obrando en su condición de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

- | | |
|--|---|
| 5. en Londres | 6. el 31 de Mayo de 2007 |
| 7. por: Secretario Principal de Estado de su Majestad para Asuntos Extranjeros | |
| 8. No. H404016 | |
| 9. Sello / Estampilla
[Sellado] | 10. Firma: Christopher Jones
[Firmado] |

CESIÓN

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros **PFIZER PRODUCTS INC.**, sociedad constituida en virtud de las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América, cuya dirección postal completa es Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 E.U.A., por medio del presente vendemos y traspasamos a la citada PFIZER PRODUCTS INC, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en AGONISTAS DE PPYY Y SUS USOS, en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, de conformidad con esta cesión.

En fe de lo cual firmamos el presente el día de hoy.

(Fdo), Rory Francis Finn

Chesterfield, MO – USA – 3 de marzo de 2006 - RORY FRANCIS FINN

(Fdo) Ned Roger Siegel

Chesterfield, MO – USA – 3 de marzo de 2006 - NED ROGER SIEGEL

(Fdo) Neena Lynne Summers

Chesterfield, MO – USA – 3 de marzo de 2006 - NEENA LYNNE SUMMERS

14

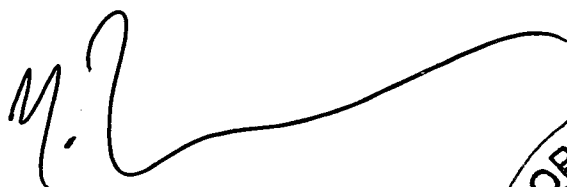
BE IT KNOWN that I, **GREGORY JOHN TAYLOR** of 37 Meadway, Ashford, Middlesex TW15 2TJ, United Kingdom, a duly authorised Notary Public

CERTIFY ONLY that the document annexed hereto, namely:

ASSIGNMENT signed by RORY FRANCIS FINN, NED ROGER SIEGEL and NEENA LYNNE SUMMERS

has this day been presented to me by Blair Consular Services Limited on behalf of their client Pfizer Products Inc , and that the said Blair Consular Services Limited have represented to me by such presentation that their said client has represented to them that the said annexed document is an authentic original document.

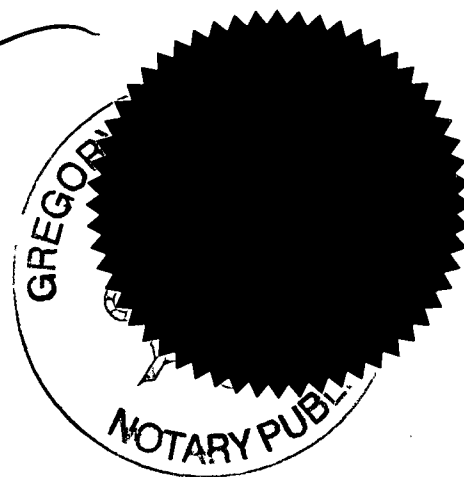
SIGNED AND SEALED at 37 Meadway, Ashford, Middlesex TW15 2TJ, United Kingdom, on 30th May 2007.



Gregory John Taylor
Notary Public

GREGORY JOHN TAYLOR
NOTARY PUBLIC
37 MEADWAY
ASHFORD, MIDDLESEX TW15 2TJ
UNITED KINGDOM

30-05-07



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Gregory John Taylor**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté

6. the/le **31 May 2007**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H404016**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **Christopher Jones**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER PRODUCTS INC.** a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America**, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER PRODUCTS INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **PYY AGONISTS AND USES THEREOF** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER PRODUCTS INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

Charleston, MO 3/3/06 Rory Francis Finn
Place, date and signature - Rory Francis FINN

Charleston, MO. 3/3/06 Ned Roger Siegel
Place, date and signature - Ned Roger SIEGEL

St Charles, MO USA 1-30-06 Neena Lynne Summers
Place, date and signature - Neena Lynne SUMMERS

Sébase que Yo, GREGORY JOHN TAYLOR, 37 Meadway, Ashford, Middlesex, TW15 2TJ, Reino Unido, un Notario Publico debidamente autorizado

Certifico que el documento anexo a la presente, llamado

CESION, firmado por NANCY NARDONE

Ha sido presentado ante mi en esta fecha por los Servicios Consulares de Blair en nombre de su cliente Pfizer Products Inc, y que los mencionados Servicios Consulares de Blair Limitada, han representado ante mi como presentación de dicho cliente ha representado a ellos con base en un documento original con firmas debidamente autenticas.

Firmado y sellado en 37 Meadway, Ashford, Middlesex, TW15 2TJ, Reino Unido, el 30 de Mayo de 2007.

[Firmado y sellado]

Gregory John Taylor
Notario Público
37 Meadway,
Ashford, Middlesex, TW15 2TJ,
Reino Unido
30-05-2007

16

Apostille

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

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público ha sido firmado por: Gregory John Taylor
3. obrando en su condición de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

- | | |
|--|---|
| 5. en Londres | 6. el 31 de Mayo de 2007 |
| 7. por: Secretario Principal de Estado de su Majestad para Asuntos Extranjeros | |
| 8. No. H404017 | |
| 9. Sello / Estampilla
[Sellado] | 10. Firma: Christopher Jones
[Firmado] |

17

PC32768A

CO-1

CESIÓN

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros **PFIZER PRODUCTS INC.**, sociedad constituida en virtud de las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América, cuya dirección postal completa es Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 E.U.A., por medio del presente vendemos y traspasamos a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en AGONISTAS DE PPYY Y SUS USOS, en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, de conformidad con esta cesión.

En fe de lo cual firmamos el presente el día de hoy.

(Fdo), Nancy NARDONE

Groton, CT – USA – 27 de enero de 2006 - Nancy NARDONE

BE IT KNOWN that I, **GREGORY JOHN TAYLOR** of 37 Meadway, Ashford, Middlesex TW15 2TJ, United Kingdom, a duly authorised Notary Public

CERTIFY ONLY that the document annexed hereto, namely:

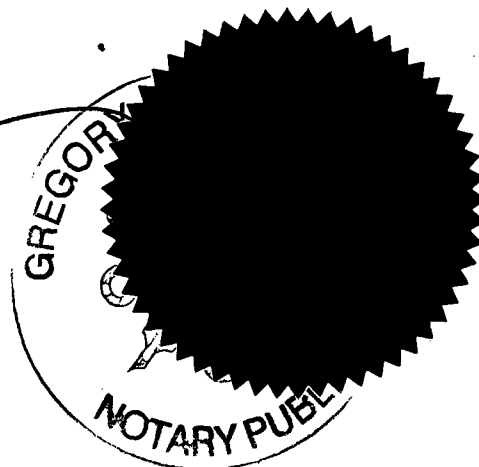
ASSIGNMENT signed by NANCY NARDONE

has this day been presented to me by Blair Consular Services Limited on behalf of their client Pfizer Products Inc , and that the said Blair Consular Services Limited have represented to me by such presentation that their said client has represented to them that the said annexed document is an authentic original document.

SIGNED AND SEALED at 37 Meadway, Ashford, Middlesex TW15 2TJ, United Kingdom, on 30th May 2007.



Gregory John Taylor
Notary Public



GREGORY JOHN TAYLOR
NOTARY PUBLIC
37 MEADWAY
ASHFORD, MIDDLESEX TW15 2TJ
UNITED KINGDOM

30-05-07

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Gregory John Taylor**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres
6. Certified/Attesté
the/le **31 May 2007**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H404017**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **Christopher Jones**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER PRODUCTS INC.** a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America**, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER PRODUCTS INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **PYY AGONISTS AND USES THEREOF** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER PRODUCTS INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this



Nancy Nardone

Place, date and signature - Nancy NARDONE

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 August 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/082517 A1

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/575 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
- (74) Agents: FULLER, Grover, F., Jr. et al.; c/o
LAWRENCE, Jackie, Pfizer Inc. MS8260-1615, Eastern
Point Road, Groton, CT 06340 (US).
- (21) International Application Number:
PCT/IB2006/000270
- (22) International Filing Date: 30 January 2006 (30.01.2006)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/650,366 4 February 2005 (04.02.2005) US
60/733,656 4 November 2005 (04.11.2005) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER
PRODUCTS INC.** [US/US]; Eastern Point Road, Groton,
CT 06340 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **FINN, Rory,
Francis** [US/US]; Pfizer Global Research and Devel-
opment, 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield,
MO 63017-1732 (US). **SIEGEL, Ned, Roger** [US/US];
Pfizer Global Research and Development, 700 Chester-
field Parkway West, Chesterfield, MO 63017-1732 (US).
SUMMERS, Neena, Lynne [US/US]; 1203 Saddlemaker
Drive, St. Charles, MO 63304-2423 (US). **NARDONE,
Nancy, Ann** [US/US]; Pfizer Global Research and Devel-
opment, Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, 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, LV, 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).
- Published:**
— with international search report
- 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: PYY AGONISTS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The invention provides PYY₃₋₃₆ variants and pegylated derivatives thereof and compositions and methods useful in the treatment of conditions modulated by an NPY Y2 receptor agonist.

WO 2006/082517 A1

PC32768B

PYY AGONISTS
AND USES THEREOF

Field of the Invention

5 The present invention relates to PYY agonists, more particularly to PYY₃₋₃₆ variants and to pegylated derivatives of PYY₃₋₃₆ and PYY₃₋₃₆ variants, to compositions containing such agonists, isolated nucleic acids encoding such PYY agonists, and to the use of such agonists or compositions in the treatment of obesity and co-morbidities thereof, or to decrease appetite, food intake or caloric intake in a mammal.

Background of the Invention

10 Obesity is a major public health concern because of its increasing prevalence and associated health risks. Moreover, obesity may affect a person's quality of life through limited mobility and decreased physical endurance as well as through social, academic and job discrimination.

15 Obesity and being overweight are generally defined by body mass index (BMI), which is correlated with total body fat and serves as a measure of the risk of certain diseases. BMI is calculated by weight in kilograms divided by height in meters squared (kg/m²). Overweight is typically defined as a BMI of 25-29.9 kg/m², and obesity is typically defined as a BMI of 30 kg/m² or higher. See, e.g., National Heart, Lung, and Blood Institute, Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, The Evidence Report, Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services,
20 NIH publication no. 98-4083 (1998).

 Recent studies have found that obesity and its associated health risks are not limited to adults, but also affect children and adolescents to a startling degree. According to the Center for Disease Control, the percentage of children and adolescents who are defined as overweight has more than doubled since the early 1970s, and about 15 percent of children and adolescents are now overweight. Risk factors for heart
25 disease, such as high cholesterol and high blood pressure, occur with increased frequency in overweight children and adolescents compared with normal-weight subjects of similar age. Also, type 2 diabetes, previously considered an adult disease, has increased dramatically in children and adolescents. Overweight conditions and obesity are closely linked to type 2 diabetes. It has recently been estimated that overweight adolescents have a 70% chance of becoming overweight or obese adults. The probability increases to about
30 80% if at least one parent is overweight or obese. The most immediate consequence of being overweight as perceived by children themselves is social discrimination.

 Overweight or obese individuals are at increased risk for ailments such as hypertension, dyslipidemia, type 2 (non-insulin dependent) diabetes, insulin resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, coronary heart disease, angina pectoris, congestive heart failure, stroke, gallstones,
35 cholecystitis, cholelithiasis, gout, osteoarthritis, obstructive sleep apnea and respiratory problems, gall bladder disease, certain forms of cancer (e.g., endometrial, breast, prostate, and colon) and psychological disorders (such as depression, eating disorders, distorted body image and low self esteem). The negative health consequences of obesity make it the second leading cause of preventable death in the United States and impart a significant economic and psychosocial effect on society. See, McGinnis M, Foege WH., "Actual

Causes of Death in the United States," *JAMA* 270:2207-12, 1993.

Obesity is now recognized as a chronic disease that requires treatment to reduce its associated health risks. Although weight loss is an important treatment outcome, one of the main goals of obesity management is to improve cardiovascular and metabolic values to reduce obesity-related morbidity and mortality. It has been shown that 5-10% loss of body weight can substantially improve metabolic values, such as blood glucose, blood pressure, and lipid concentrations. Hence, it is believed that a 5-10% reduction in body weight may reduce morbidity and mortality.

Currently available prescription drugs for managing obesity generally reduce weight by decreasing dietary fat absorption, as with orlistat, or by creating an energy deficit by reducing food intake and/or increasing energy expenditure, as seen with sibutramine. The search for alternatives to presently available antiobesity agents has taken several paths one of which has focused on certain gut peptides that have been implicated in modulating satiety such as peptide YY (PYY).

PYY is a member of the pancreatic polypeptide (PP) family of hormones (along with PP and neuropeptide Y (NPY)). As with the other family members, PYY is a C-terminally amidated, 36 amino acid peptide. It is a gut endocrine peptide that was initially isolated from porcine intestine (Tatemoto and Mutt, *Nature* 285:417-418, 1980) and was subsequently reported to reduce high-fat food intake in rats after peripheral administration (Okada et al., *Endocrinology Supplement* 180, 1993) and to cause weight loss in mice after peripheral administration (Morley and Flood, *Life Sciences* 41:2157-2165, 1987). Multiple stored and circulating molecular forms of PYY are known to exist (Chen et al., *Gastroenterology* 87:1332-1338, 1984; and Roddy, et al., *Regul Pept* 18:201-212, 1987). One such form, PYY₃₋₃₆, was isolated from human colonic mucosal extracts (Eberlein et al., *Peptides* 10:797-803, 1989), and was found to be the predominant form of PYY in human postprandial plasma (Grandt et al., *Regul. Pept.* 51:151-159, 1994). PYY₃₋₃₆ has been reported to be a high-affinity NPY Y2 receptor (Y2R) selective agonist (Keire et al., *Am. J. Physiol. Gasrointest. Liver Physiol.* 279:G126-G131, 2000). Peripheral administration of PYY₃₋₃₆ has been reported to markedly reduce food intake and weight gain in rats, to decrease appetite and food intake in humans, and to decrease food intake in mice, but not in Y2R-null mice, which was said to suggest that the food intake effect requires the Y2R. In human studies, infusion of PYY₃₋₃₆ was found to significantly decrease appetite and reduce food intake by 33% over 24 hours. Infusion of PYY₃₋₃₆ to reach the normal postprandial circulatory concentrations of the peptide led to peak serum levels of PYY₃₋₃₆ within 15 minutes, followed by a rapid decline to basal levels within 30 minutes. It was reported that there was significant inhibition of food intake in the 12-hour period following the PYY₃₋₃₆ infusion, but there was essentially no effect on food intake in the 12-hour to 24-hour period. In a rat study, repeated administration of PYY₃₋₃₆ IP (injections twice daily for 7 days) reduced cumulative food intake (Batterham, et al., *Nature* 418:650-654, 2002).

Polypeptide-based drugs are frequently covalently attached to polymers such as polyethylene glycols to prolong their half-life *in vivo*. However, this often leads to a drastic loss of biological or pharmacological activity (Shechter et al., *FEBS Letters* 579:2439-2444, 2005; Fuerteges and Abuchowski, *J. Control Release* 11:139-148, 1990; Katre, *Adv. Drug Del. Sys.* 10:91-114, 1993; Bailon and Berthold, *Pharm. Sci. Technol. Today* 1:352-356, 1996; Nucci et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 6, 1991; Delgado et al., *Critical Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9:249-304, 1992; Fung et al., *Polym. Preprints* 38:565-566, 1997; Reddy, *Ann.*

Pharmacother. 34:915-923, 2000; Veronese, *Biomaterials* 22:405-417, 2001). For example, Shechter et al., *supra*, reported that 40 kD pegylation of PYY₃₋₃₆ by standard chemistry, through formation of a stable bond (40 kD PEG-PYY₃₋₃₆), led to its complete inactivation in food intake studies with mice (s.c. injection). They also reported, however, that reversible pegylation of PYY₃₋₃₆ (40 kD PEG-FMS-PYY₃₋₃₆) resulted in an eight-fold increase in functional half-life (24 hrs vs. 3 hrs). See also PCT Pat. Appl. Nos. WO 2004/089279 and WO 03/026591.

Summary of the Invention

The present invention relates to PYY agonists that are variants of PYY₃₋₃₆.

In one aspect of the present invention the PYY agonist is a variant of a mammalian PYY₃₋₃₆ in which residue 10 (glutamic acid) or residue 11 (aspartic acid) has been replaced with an amino acid "X" which is selected from the group consisting of cysteine, lysine, serine, threonine, tyrosine, and unnatural amino acids, having a functionality that is conjugatable with a hydrophilic polymer such as polyethylene glycol (PEG), e.g., a keto, thiol, hydroxyl, carboxyl, or free amino functionality, such variant being designated (E10X)PYY₃₋₃₆ or (D11X)PYY₃₋₃₆ respectively.

The residue "X" is preferably cysteine, and the corresponding variants are, therefore, (E10C)PYY₃₋₃₆ and (D11C)PYY₃₋₃₆.

In a preferred embodiment of the present invention, the PYY agonist is a variant of human PYY₃₋₃₆ (hPYY₃₋₃₆), canine PYY₃₋₃₆, feline PYY₃₋₃₆ or equine PYY₃₋₃₆, more preferably, hPYY₃₋₃₆.

In a preferred embodiment of the invention, the PYY agonist is the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆, having the amino acid sequence IKPEAPGCDASPEELNRYIASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:3], or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In a further preferred embodiment, the PYY agonist is the polypeptide (D11C)hPYY₃₋₃₆ which has the amino acid sequence

IKPEAPGECASPEELNRYIASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:4], or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Most preferably, the agonist is (E10C)hPYY₃₋₃₆.

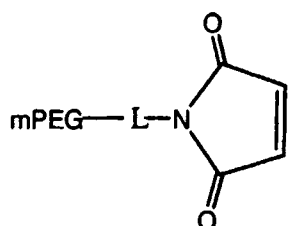
The PYY agonist of the invention are preferably conjugated with a hydrophilic polymer, preferably a PEG. The agonist is preferably monopegylated, i.e., the ratio of agonist to PEG is about 1:1, which is attached at the conjugatable functionality, such as a keto, thiol, hydroxyl, carboxyl, or a free amino functionality, of "X" in (E10X)PYY₃₋₃₆ and (D11X)PYY₃₋₃₆. The PEG may be linear, branched, or pendant; more preferably, linear or branched; most preferably, linear.

In linear PEGs, one terminus of the PEG is capped by a group that is inert under the conditions of coupling the PEG to the agonist, e.g., an ether group, preferably a methoxy group. PEGs terminated in this manner (with a methoxy group) are commonly referred to as mPEGs. The other terminus is activated for coupling with the PYY agonist. Similarly, with branched PEGs useful in the present invention, all termini but one are ether-capped, and the non-ether-capped terminus is activated for coupling. In one embodiment the non-ether-capped terminus of the PEG is capped with a linker moiety ("L") linking the PEG to a functional group that is reactive with the conjugatable functionality of the amino acid X in (E10X)PYY₃₋₃₆ or (D11X)PYY₃₋₃₆.

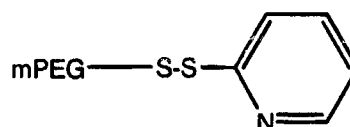
to produce a conjugate having the PEG covalently attached to the conjugatable functionality of X. In a further embodiment, the PEG is attached directly to the reactive group, without inclusion of a linker moiety. Such PEGs are frequently called "linkerless" PEGs.

For the (E10C)PYY₃₋₃₆ and (D11C)PYY₃₋₃₆ polypeptides, the non-ether capped terminus of the PEG is preferably attached to a linker linking the PEG to a maleimide or other group that will react with the thiol of the cysteine residue to produce a conjugate having the PEG covalently attached to the cysteine thiol group.

Suitable reactive PEGs for use with (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)PYY₃₋₃₆ include PEGs of the formulas



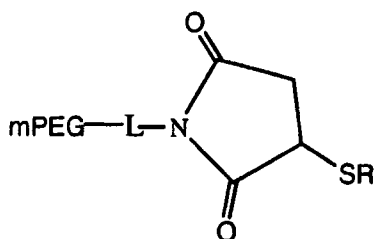
and



10

Preferably, the PEG is the mPEG maleimide depicted above which includes a linker moiety -L-. Linkerless PEG maleimides are also suitable for use in the present invention, particularly with (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)PYY₃₋₃₆. Such linkerless PEG maleimides may be prepared as described in Goodson and Katre, *Bio/Technology* 8:343-346, 1990.

The conjugates produced from coupling the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)PYY₃₋₃₆ polypeptides with the mPEGs shown above are depicted in the following formulas, wherein -SR is the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)PYY₃₋₃₆ polypeptide in which the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group:



and



20

The linker -L- merely serves to link the PEG to the reactive functional group and is therefore not particularly limited, but, preferably, includes an alkylene group containing an ester bond, a urethane bond, an amide bond, an ether bond, a carbonate bond, or a secondary amino group.

In a preferred embodiment, particularly for linear PEGs, the linker is a group of the formula



- 5 in which p is an integer from 1 to 6, preferably, 1 to 3, more preferably, 2 or 3, most preferably, 3, and r is an integer from 1 to 6, preferably, 1 to 3, more preferably, 2 or 3, most preferably, 2.

A preferred linker is the group $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$.

In another preferred embodiment, particularly for branched PEGs, the linker is a group of the formula

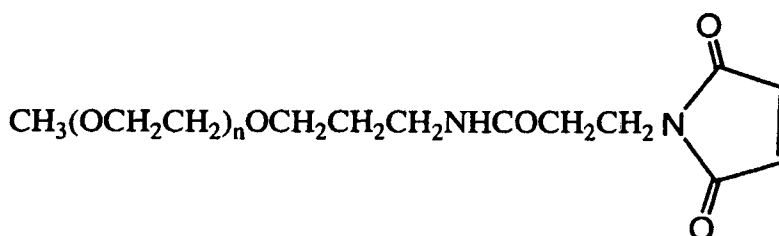


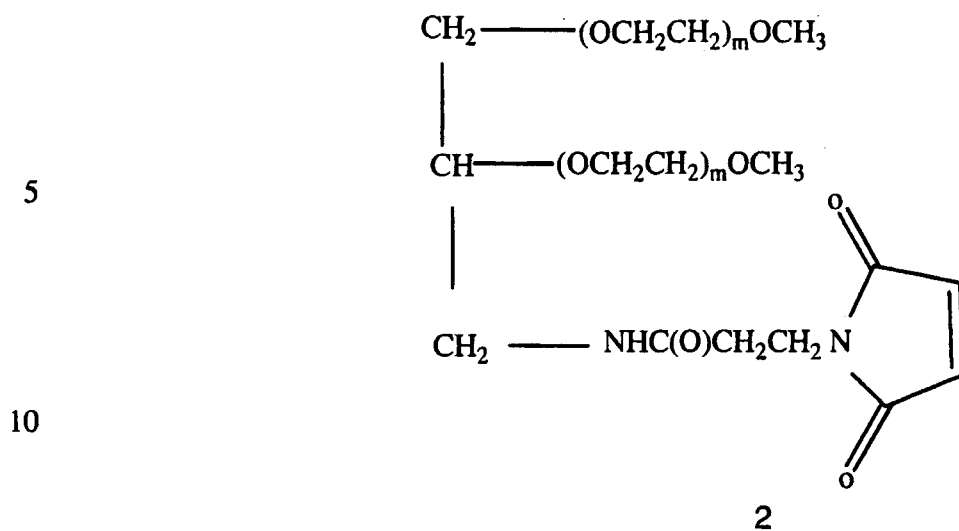
in which s is an integer from 1 to 6, preferably, 1 to 3, more preferably, 2 or 3, most preferably, 2.

A preferred linker is the group $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

- The PEG may be linear or nonlinear, for example, branched or pendant. Preferably, the PEG is
 15 linear or branched, preferably, a linear or branched mPEG maleimide. Glycerol-branched mPEG maleimide is a preferred branched PEG. Preferably, the PEG is a linear mPEG maleimide. The PEG should have a weight-average molecular weight in the range of about 1 kD to about 50 kD. Preferably, the average molecular weight is in the range of about 5 kD to about 45 kD; more preferably, about 10-12 kD to about 40-45 kD, or about 20 kD to about 40-45 kD. Of particular interest is a linear mPEG, such as that shown in
 20 Formula 1, having a weight-average molecular weight of about 20 or about 30 kD. The glycerol-branched mPEG of Formula 2 is also of interest and, preferably, has a weight-average molecular weight of about 20 kD or about 43 kD.

- Preferred PEGs, appropriately activated for conjugation with the cysteine thiol group of (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)PYY₃₋₃₆, are the compounds of Formulas 1 and 2. In the linear mPEG of Formula
 25 1, n is an integer in the range of about 175 to 800; preferably, about 375 to 525 or about 600 to 750, or about 425 to 475 or about 650 to 700, or about 437 to 463 or 675 to 700. In the glycerol-branched mPEG of Formula 2, each m is approximately the same and is an integer in the range of about 150 to 500; preferably, about 160 to 285 or about 400 to 525, or about 200 to 250 or 450 to 500.



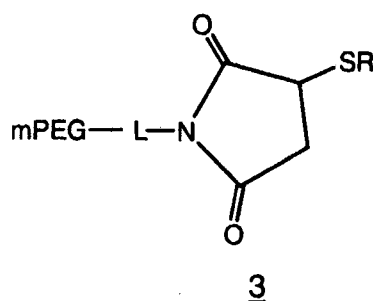


A wide variety of PEGs, appropriately activated for conjugation with target functionalities in the sidechain of peptide amino acids, e.g., keto, thiol, hydroxyl, carboxyl, or free amino functionalities, are commercially available from a number of suppliers, for example, from NOF Corporation, Tokyo, Japan, or Nektar Therapeutics Corporation, Huntsville, AL.

Another aspect of the present invention pertains to conjugates of the present PYY₃₋₃₆ variants and polyethylene glycol.

In one embodiment the conjugate is a compound of Formula 3

20



wherein the mPEG moiety is linear or branched and has a weight-average molecular weight in the range of about 1 kD to 50 kD, preferably, 5 kD to about 45 kD, more preferably, about 10 kD or 12 kD to about 40 or 45 kD, or about 20 kD to about 40 kD or 45 kD,

L is a group of the formula



in which p is an integer from 1 to 6; preferably, 1 to 3; more preferably, 2 or 3; most preferably, 3; (as depicted in Formula 4 below); and r is an integer from 1 to 6; preferably, 1 to 3; more preferably, 2 or 3, most preferably, 2;

or L is a group of the formula

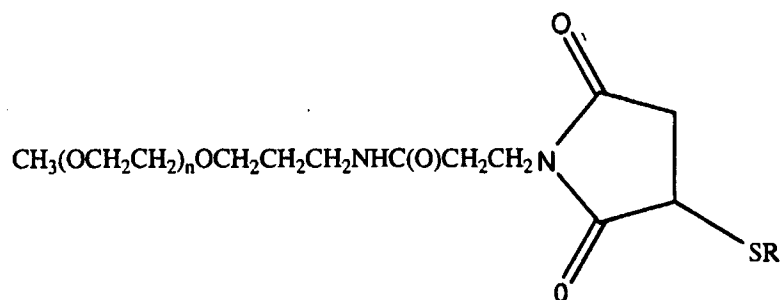


in which s is an integer from 1 to 6; preferably, 1 to 3; more preferably, 2 or 3; most preferably 2; and

-SR is the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ in which S is the sulfur atom of the cysteine thiol

group.

A preferred embodiment of the invention is the linear mPEG-PYY₃₋₃₆ variant conjugate of Formula 4



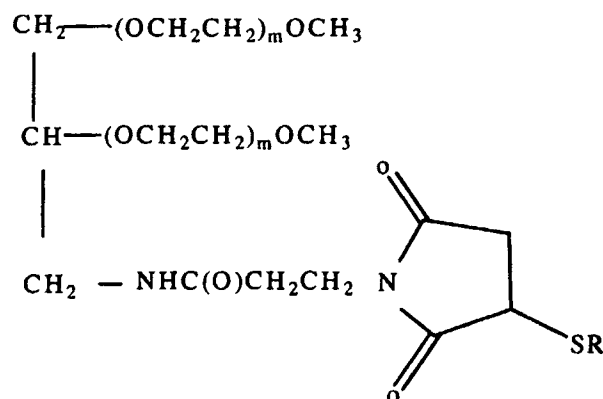
5

4

wherein n is an integer in the range of about 175 to 800; preferably, about 375 to 525 or about 600 to 750, or about 437 to 463 or about 675 to 700; and $-\text{SR}$ is the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ in which S is the sulfur atom of the cysteine thiol group; or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Preferably, the $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ moiety has a weight-average molecular weight of about 20 kD or 30 kD. The conjugate in which $-\text{SR}$ is the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is of particular interest.

A further aspect of the invention pertains to conjugates in which the PEG moiety is branched.

Preferred conjugates in this category comprise a glycerol-branched PEG moiety. Of particular interest is the conjugate of Formula 5



20

25

5

wherein each m is approximately the same and is an integer in the range of about 150 to 550; preferably, about 160 to 285 or about 400 to 525, or about 200 to 250 or about 450 to 500, and $-\text{SR}$ is the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide in which S is the sulfur atom of the cysteine thiol group; or a

30

pharmaceutically acceptable salt thereof. Preferably, each $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ moiety has a weight-average molecular weight in the range of about 9-11 kD or about 20-22 kD. Preferably, the combined weight-average molecular weight of the $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ moieties is about 20 kD or about 43 kD. The conjugate in which -SR is the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is of particular interest.

5 The present invention also provides a monoclonal antibody that specifically binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4. In one embodiment of this aspect of the invention the polypeptide is pegylated at the cysteine residue.

In addition, the present invention provides polynucleotide sequences which encode the polypeptide sequences of the invention, preferably, they encode SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4.

10 In another embodiment of the invention, a pharmaceutical composition is provided which comprises a PYY agonist of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier. In a further embodiment, the composition also comprises at least one additional pharmaceutical agent, which may be an agent useful in the treatment of the primary indication for the composition or a co-morbidity of the primary indication. The additional pharmaceutical agent is preferably an anti-obesity agent. The composition preferably comprises a
15 therapeutically effective amount of a PYY agonist of the invention or a therapeutically effective amount of a combination of a PYY agonist of the invention and an additional pharmaceutical agent.

Also provided is a method of treating a disease, condition or disorder modulated by a Y2R agonist in mammals, which comprises peripherally administering to a mammal in need of such treatment a
20 therapeutically effective amount of a PYY agonist of the invention. The PYY agonist of the invention may be used alone or in combination with at least one additional pharmaceutical agent that is useful in the treatment of the disease, condition or disorder or a co-morbidity of the disease, condition or disorder. Diseases, conditions, or disorders modulated by a Y2R agonist in mammals include obesity and being overweight. Co-morbidities of such diseases, conditions, or disorders would likely be incidentally improved by treatment of such diseases, conditions, or disorders. Further provided is a method of treating obesity in a mammal in
25 need of such treatment, which comprises peripherally administering to the mammal a therapeutically effective amount of a PYY agonist of the present invention.

Also provided is a method of reducing weight or promoting weight loss (including preventing or inhibiting weight gain) in a mammal which comprises peripherally administering to the mammal a weight-controlling or weight-reducing amount of a PYY agonist of the present invention.

30 Also provided is a method of reducing food intake in a mammal which comprises peripherally administering to the mammal a food-intake-reducing amount of a PYY agonist of the present invention.

Also provided is a method of inducing satiety in a mammal which comprises peripherally administering to the mammal a satiety-inducing amount of a PYY agonist of the invention.

Also provided is a method of reducing caloric intake in a mammal which comprises peripherally
35 administering to the mammal a caloric-intake-reducing amount of a PYY agonist of the invention. The PYY agonist may be administered alone or in combination with at least one additional pharmaceutical agent, preferably, an anti-obesity agent.

In each of the methods described herein and in the appendant claims, the PYY agonist may be administered alone or in combination with at least one additional pharmaceutical agent, preferably, an anti-

29

obesity agent.

The present PYY agonists and compositions containing them are also useful in the manufacture of a medicament for the therapeutic applications mentioned herein.

5

Definitions and Abbreviations

The phrase "pharmaceutically acceptable" means that the substance or composition must be compatible chemically and/or toxicologically with the other ingredients comprising a formulation, and/or the mammal being treated therewith.

10 The term "PYY agonist" means any compound that elicits one or more of the effects elicited by PYY, preferably PYY₃₋₃₆, *in vivo* or *in vitro*.

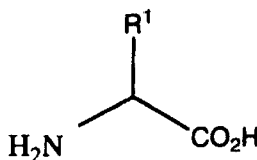
The phrase "therapeutically effective amount" means an amount of a PYY agonist of the present invention that reduces caloric intake, reduces body weight and/or reduces body fat with respect to appropriate control values determined prior to treatment or in a vehicle-treated group.

15 The term "mammal" means humans as well as all other warm-blooded members of the animal kingdom possessed of a homeostatic mechanism in the class Mammalia, e.g., companion mammals, zoo mammals and food-source mammals. Some examples of companion mammals are canines (e.g., dogs), felines (e.g., cats) and horses; some examples of food-source mammals are pigs, cattle, sheep and the like. Preferably, the mammal is a human or a companion mammal. Most preferably, the mammal is a human, male or female.

20 The terms "treating", "treat", or "treatment" embrace both preventative, i.e., prophylactic, and palliative treatment.

The term "peripheral administration" means administration outside of the central nervous system. Peripheral administration does not include direct administration to the brain. Peripheral administration includes, but is not limited to intravascular, intramuscular, subcutaneous, inhalation, oral, sublingual, enteral, 25 rectal, transdermal, or intra-nasal administration.

An unnatural amino acid suitable for use in the present invention is typically any amino acid of the following formula other than the 20 naturally occurring amino acids (Cantor and Shimmel, *Biophysical Chemistry*, Part 1, WH Freeman & Sons, San Fransisco, 42-43, 1980), wherein R¹ is any substituent comprising a keto, thiol, carboxyl, hydroxyl or free amino functionality, such as those disclosed in U.S. Pat. 30 Appl. Publ. No. 2005/0208536, incorporated herein by reference in its entirety.



35 Such unnatural amino acids, for example, include thiotyrosine, ornithine mercaptophenylalanine, 3- or 4-aminophenylalanine, 3- or 4-acetylphenylalanine, 2- or 3-hydroxyphenylalanine (o- or m-tyrosine), hydroxymethylglycine, aminoethylglycine, 1-methyl-1-

3-

30

mercaptoethylglycine, aminoethylthioethylglycine and mercaptoethylglycine. Many of the unnatural amino acids useful in the present invention are commercially available. Others may be prepared by methods known in the art. For example, thiotyrosine may be prepared by the method described by Lu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119:7173-7180, 1997, incorporated herein by reference.

5 The term "human PYY" or "hPYY" means the 36-amino acid C-terminus amidated polypeptide having the following amino acid sequence:

YPIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:1]

The term "hPYY₃₋₃₆" means the C-terminus 34-mer hPYY having the following amino acid sequence:

IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:2]

10 The term "(E10C)hPYY₃₋₃₆" means the C-terminal 34-mer hPYY in which the glutamic acid residue 10 of hPYY is replaced by a cysteine residue, and which has the following amino acid sequence:

IKPEAPGCDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:3].

The term "(D11C)hPYY₃₋₃₆" means the C-terminal 34-mer hPYY in which the aspartic acid residue 11 of hPYY is replaced by a cysteine residue, and which has the following amino acid sequence:

15 IKPEAPGECASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:4].

Brief Description of the Drawings

20 Figure 1 is a reversed phase HPLC tracing of the purified (E10C)hPYY₃₋₃₆ peptide on a Zorbax Eclipse XDB-C8 column.

Figure 2 is a size exclusion HPLC tracing of the linear 30K mPEG maleimide plus (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture on a Shodex 804 SEC column.

25 Figure 3 is a photo of SDS PAGE of fractions from SP Hitrap purification of linear 30K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆. MW= molecular weights standards; L= column load; FT= flow through; 4-23 = elution fractions.

Figure 4 is a reversed phase HPLC tracing of the purified (D11C)hPYY₃₋₃₆ peptide on a Zorbax Eclipse XDB-C8 column.

Figure 5 is a size exclusion HPLC tracing of the linear 30K mPEG maleimide plus (D11C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture on a Shodex 804 SEC column.

30 Figure 6 is a size exclusion HPLC tracing showing the elution profile of the purified linear 30K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ product on a Shodex 804 SEC column.

Figure 7 is a size exclusion HPLC tracing showing the elution profile of the purified linear 30K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ product on a Shodex 804 SEC column.

35 Figure 8 is a size exclusion HPLC tracing of the glycerol-branched 43K mPEG maleimide plus (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture on a Shodex 804 SEC column.

Figure 9 is a size exclusion HPLC tracing showing the elution profile of the purified glycerol-branched 43K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ product on a Shodex 804 SEC column.

Figure 10 is a graph of inhibition of cumulative food intake in fasted mice following intraperitoneal (IP) injection. Figure 10A shows the dose effect of native PYY₃₋₃₆ as compared to the vehicle group. Figure 10B

32

shows the dose effect of linear 30K mPEG maleimide
(E10C)hPYY₃₋₃₆.

Figure 11 shows the food intake effect of IP injection in fasted mice of glycerol-branched 43K mPEG maleimide(E10C)PYY₃₋₃₆ as compared to vehicle and linear 30K mPEG maleimide(E10C)PYY₃₋₃₆. Figure 11A is a line graph showing the response over 6 hours post-injection. Figure 11B is a bar graph comparing the effects over 24 hours post-injection.

Figure 12 shows the effects of IP injection of vehicle, PYY₃₋₃₆, and linear 30K mPEG maleimide(E10C)PYY₃₋₃₆ on spontaneously fed mice. Figure 12A shows the effect on food intake, and Figure 12B shows the effect on body weight.

Figure 13 shows the effects of subcutaneous (SC) injection of vehicle, PYY₃₋₃₆, and linear 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ on spontaneously fed mice. Figure 13A shows the effect on food intake, and Figure 13B shows the effect on body weight.

Figure 14 shows plasma exposure to PYY in mice following 0.1 mg/kg IP injection. Figure 14A demonstrates plasma PYY levels following injection of hPYY₃₋₃₆ and Figure 14B demonstrates plasma PYY levels following injection of linear 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆.

Figure 15 is a graph of concentration response curves for PYY₃₋₃₆ or linear 30K mPEG maleimide (E10C)PYY₃₋₃₆ from the Scintillation Proximity Assay (SPA), in which the ligands compete with ¹²⁵I-PYY₁₋₃₆ for binding to the Y2R expressed on KAN-TS cells.

Figure 16 is a graph of concentration-response curves for PYY₃₋₃₆ or linear 30K mPEG maleimide (E10C)PYY₃₋₃₆ from the GTPgamma[³⁵S] Binding Assay with Y2R expressed on KAN-TS membranes.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to PYY agonists that are variants of PYY₃₋₃₆ and pegylated conjugates thereof, which may have at least one improved chemical or physiological property selected from, but not limited to, decreased clearance rate, increased plasma residency duration, prolonged *in vivo* activity, increased potency, increased stability, improved solubility, and decreased antigenicity.

A preferred PYY₃₋₃₆ variant of the invention is (E10C)hPYY₃₋₃₆. Another preferred variant is (D11C)hPYY₃₋₃₆. These and other variants of the invention may be produced synthetically and by recombinant and other means, as described below and in the Examples herein or by analogous methods.

In addition to the substitutions listed above (e.g., E10C and D11C), the PYY agonists of the invention can also include one or more conservative amino acid substitutions at other amino acid positions. Conservative substitutions may be made, for example, according to the Table below. Aliphatic non-polar, polar-uncharged, and polar-charged amino acids can be substituted for another aliphatic amino acid that is non-polar, polar-uncharged, or polar-charged amino acid respectively. Preferably, such substitutions occur between amino acids in the same line of the third column of the table below. Conservative amino acid substitutions can also be made between aromatic amino acids as listed in the table below.

ALIPHATIC	Non-polar	G A P
		I L V
	Polar - uncharged	C S T M
		N Q
	Polar - charged	D E
		K R
AROMATIC		H F W Y

Synthetic Production

The PYY₃₋₃₆ variants of this invention, e.g., (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆, may be prepared using standard peptide synthesis techniques known in the art, e.g., by solid phase peptide synthesis conducted with an automatic peptide synthesizer (e.g., model 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA) using tBoc or Fmoc chemistry. A summary of the many peptide synthesis techniques available may be found in *Solid Phase Peptide Synthesis* 2nd ed. (Stewart, J.M. and Young, J.D., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1984). See also the book *Solid-phase Organic Synthesis* (Burgess, K., John Wiley & Sons, New York, NY, 2000) and the article Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34, 1989. All of the above references are incorporated herein by reference.

The PYY₃₋₃₆ variants of the invention are preferably conjugated with a PEG. Conjugation reactions, referred to as pegylation reactions, were historically carried out in solution with molar excess of polymer and without regard to where the polymer would attach to the protein. Such general techniques, however, have typically been proven inadequate for conjugating bioactive proteins to non-antigenic polymers while retaining sufficient bioactivity. One way to maintain the bioactivity of the PYY₃₋₃₆ agonist variant after pegylation is to substantially avoid, in the coupling process, the conjugation of any reactive groups of the variant that are associated with binding of the agonist to the target receptor. An aspect of the present invention is to provide a process of conjugating a polyethylene glycol to a PYY₃₋₃₆ variant agonist of the invention at specific reactive sites which do not interfere substantially with receptor binding site(s) in order to retain high levels of activity. Another aspect of this invention is the insertion of reactive residues into PYY₃₋₃₆ to provide the agonist variants thereof for conjugation with a polyethylene glycol with limited alteration of activity.

The chemical modification through a covalent bond may be performed under any suitable conditions generally adopted in a conjugation reaction of a biologically active substance with an activated PEG. The conjugation reaction is carried out under relatively mild conditions to avoid inactivating the PYY₃₋₃₆ variant agonist. Mild conditions include maintaining the pH of the reaction solution in the range of about 3 to 10, and the reaction temperatures in the range of about 0° to 40°C. Non-target functionalities in the PYY₃₋₃₆ variants that are reactive with the activated PEG under the pegylation conditions are preferably protected with an appropriate protecting group that is removable after pegylation at the target functionality. In pegylating free amino groups with reagents such as PEG aldehydes or PEG succinimides, a pH in the range of about 3 to 10, preferably about 4 to 7.5, is typically maintained. The coupling reaction is preferably carried out in a suitable buffer (pH 3 to 10), e.g., phosphate, MES, citrate, acetate, succinate or HEPES, for about 1 to 48 hrs at a temperature in the range of about 4° to 40°C. In pegylating thiol groups using reagents such as PEG maleimides, PEG vinyl sulfones or PEG orthopyridyl disulfides, a pH in the range of about 4 to 8 is preferably



maintained. PEG amines are useful in the pegylation of keto groups, e.g., in *p*-acetylphenylalanine and may be prepared as described by Pillai et al., *J. Org. Chem.* 45:5364-5370, 1980.

The conjugation reactions of the present invention typically provide a reaction mixture or pool containing the desired mono-pegylated PYY₃₋₃₆ variant as well as unreacted PYY₃₋₃₆ variant peptide, unreacted PEG, and usually less than about 20% of high molecular weight species, which may include conjugates containing more than one PEG strand and/or aggregated species. After the unreacted species and high molecular weight species have been removed, compositions containing primarily mono-pegylated PYY₃₋₃₆ variants are recovered. Given that the conjugates often include a single polymer strand, the conjugates are substantially homogeneous.

The desired PEG-PYY₃₋₃₆ variant conjugate may be purified from the reaction mixture by conventional methods typically used for the purification of proteins, such as dialysis, salting-out, ultrafiltration, ion-exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography (HIC), gel chromatography and electrophoresis. Ion-exchange chromatography is particularly effective in removing any unreacted PEG or unreacted PYY₃₋₃₆ variant. Separation of the desired PEG-variant conjugate may be effected by placing the reaction mixture containing the mixed species in a buffer solution having a pH of about 4 to about 10, preferably, lower than 8 to avoid deamidation. The buffer solution preferably contains one or more buffer salts selected from, but not limited to, KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄ and CH₃CO₂Na.

If the buffer system used in the pegylation reaction is different from that used in the separation process, the pegylation reaction mixture is subjected to buffer exchange/diafiltration or is diluted with a sufficient amount of the initial separation buffer.

The fractionation of the conjugates into a pool containing the desired species is preferably carried out using an ion exchange chromatography medium. Such media are capable of selectively binding PEG-PYY₃₋₃₆ variant conjugates via differences in charge, which vary in a somewhat predictable fashion. For example, the surface charge of a PYY₃₋₃₆ variant is determined by the number of available charged groups on the surface of the peptide that are available for interaction with the column support uncompromised by the presence of PEG. These charged groups typically serve as the point of potential attachment of PEG polymers. Therefore, the PEG-PYY₃₋₃₆ variant conjugates will have a different charge from the other species present to allow selective isolation.

Ion exchange resins are especially preferred for purification of the present PEG-PYY₃₋₃₆ variant conjugates. Cation exchange resins such as sulfopropyl resins are used in the purification method of the present invention. A non-limiting list of cation exchange resins suitable for use with the present invention include SP-hitrapp®, SP Sepharose HP® and SP Sepharose® fast flow. Other suitable cation exchange resins, e.g. S and CM resins, can also be used.

The cation exchange resin is preferably packed in a column and equilibrated by conventional means. A buffer having the same pH and osmolality as the solution of the PEG-conjugated PYY₃₋₃₆ variant is used. The elution buffer preferably contains one or more salts selected from, but not limited to, CH₃CO₂Na, HEPES, KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄, and (NH₄)₂CO₃. The conjugate-containing solution is then adsorbed onto the column, with unreacted PEG and some high molecular weight

species not being retained. At the completion of the loading, a gradient flow of an elution buffer with increasing salt concentrations is applied to the column to elute the desired fraction of PEG-conjugated PYY₃₋₃₆ variant. The eluted, pooled fractions are preferably limited to uniform polymer conjugates after the cation exchange separation step. Any unconjugated PYY₃₋₃₆ variant species may then be washed from the column by conventional techniques. If desired, mono and multiply pegylated PYY₃₋₃₆ variant species and higher molecular weight species may be further separated from each other via additional ion exchange chromatography or size exclusion chromatography.

Techniques utilizing multiple isocratic steps of increasing concentration may be used instead of a linear gradient. Multiple isocratic elution steps of increasing concentration will result in the sequential elution of multi-pegylated/aggregated and then mono-pegylated PYY₃₋₃₆ variant conjugates. Elution techniques based on pH gradients may also be used. The temperature range for elution is generally between about 4°C and about 25°C. The elution of the PEG-PYY₃₋₃₆ variant is monitored by UV absorbance at 280 nm. Fraction collection may be achieved through simple time elution profiles.

Recombinant Expression

Nucleic Acid Molecules

The nucleic acid molecules encoding an (E10C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide can comprise one of the following nucleic acid sequences (codon mutation for E10C substitution is underlined):

atcaaaccgaggctcccggtgtgacgcctcgccggaggagctgaaccgctactacgcctccctgcgccactacctaaccctggcaccgggcagcggtat (SEQ ID NO: 5); or

atcaaaccgaggctcccggtgcgacgcctcgccggaggagctgaaccgctactacgcctccctgcgccactacctaaccctggcaccgggcagcggat (SEQ ID NO: 6).

The nucleic acid molecules encoding a (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide can comprise one of the following nucleic acid sequences (codon mutation for D11C substitution is underlined):

atcaaaccgaggctcccgcggaatgtgcctcgccggaggagctgaaccgctactacgcctccctgcgccactacctaaccctggcaccgggcagcggtat (SEQ ID NO: 7); or

atcaaaccgaggctcccgcggaatgcgcctcgccggaggagctgaaccgctactacgcctccctgcgccactacctaaccctggcaccgggcagcggat (SEQ ID NO: 8).

These sequences can also include a stop codon (e.g., tga, taa, tag) at the C-terminal end, and can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, genetic mutation of wild type hPYY polynucleotide sequences obtained from cDNA or genomic library screening, expression library screening, and/or polymerase chain reaction (PCR) amplification of cDNA. Nucleic acid molecules encoding the (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆ variants may be produced using site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate methods, where the primer(s) have the desired point mutations. Recombinant DNA methods and mutagenesis methods described herein are generally those set forth in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). Should it be desired that another non-naturally-occurring amino acid is substituted for E10 or D11, such a peptide can be recombinantly expressed using methods as disclosed in, for example, U.S. Pat.

Appl. Publ. No. 2005/0208536, incorporated herein by reference.

Nucleic acid polynucleotides encoding the amino acid sequence of hPYYs may be identified by expression cloning which employs the detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding of an antibody or other binding partner (e.g., receptor or ligand) to cloned proteins that are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce the (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆ encoding polynucleotides and to express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence that encodes the amino acid sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ variant into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ variant may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers, typically complementary to two separate regions of cDNA encoding the amino acid sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ variant, are then added to the cDNA along with a polymerase such as Taq polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ variant is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716- 34, 1989. These methods include the phosphotriester, phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ will be about one hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length nucleotide sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ gene.

The DNA fragment encoding the amino-terminus of the polypeptide can have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C) LP443-36, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell. The codon encoding isoleucine can also be used as a start site. Other methods known to the skilled artisan may be used as well. In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for optimal expression of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ and the host cell selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a

variety of methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Eco_high.Cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, Wis.). Other useful codon frequency
5 tables include "Celegans_high.cod," "Celegans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod," "Maize_high.cod," and "Yeast_high.cod."

Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation techniques. The vector is typically
10 selected to be functional in the particular host cell employed (i.e., the vector is compatible with the host cell machinery such that amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems) and/or eukaryotic host cells. For a review of expression vectors, see *Meth. Enz.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed., Academic Press, 1990).

Typically, expression vectors used in any of the host cells will contain sequences for plasmid
15 maintenance and for cloning and expression of exogenous nucleotide sequences. Such sequences, collectively referred to as "flanking sequences" in certain embodiments, will typically include one or more of the following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice
20 site, a sequence encoding a leader sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is discussed below.

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, i.e., an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or the (D11C)hPYY₃₋₃₆ coding sequence; the oligonucleotide
25 sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or another "tag" such as FLAG, HA (hemagglutinin influenza virus), or myc for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or the (D11C)hPYY₃₋₃₆ from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently
30 be removed from the purified (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ by various means such as using certain peptidases for cleavage, e.g., enterokinase digestion 3' of a FLAG tag sequence that is upstream of the one of the amino acid sequences as shown in SEQ ID NOs: 3-4.

Flanking sequences may be homologous (i.e., from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (i.e., from a species other than the host cell species or strain), hybrid (i.e., a combination of
35 flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences which normally function to regulate hPYY₃₋₃₆ expression. The source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequence is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

Useful flanking sequences may be obtained by any of several methods well known in the art.

Typically, flanking sequences useful herein, other than the PYY gene flanking sequences, will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with a suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragment from the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of skill in the art.

An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication from the plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria and various origins (e.g., SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitis virus (VSV), or papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment followed by a poly-T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells; (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

Other selection genes may be used to amplify the gene that will be expressed. Amplification is the process wherein genes that are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine

kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure wherein only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the selection gene and the DNA that encodes an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆. As a result, increased quantities of (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ are synthesized from the amplified DNA.

A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to the coding sequence of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (i.e., having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

A leader, or signal, sequence may be used to direct an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or the (D11C)hPYY₃₋₃₆ nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ nucleic acid molecule. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

A nucleotide sequence encoding a native hPYY₃₋₃₆ signal sequence may be joined to an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence may be joined to an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, i.e., cleaved by a signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native hPYY signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native hPYY signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression, the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the hPYY gene especially where the gene used is a full-length genomic sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron may be obtained from another source.



The position of the intron with respect to flanking sequences and the hPYY gene is generally important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ encoding cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site and 5' to the poly-A transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (i.e., 5' or 3') of the cDNA such that it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used, provided that it is compatible with the host cell into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

Expression and cloning vectors will typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆. Promoters are untranscribed sequences located upstream (i.e., 5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes: inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native hPYY₃₋₃₆ promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ nucleic acid molecule. However, a heterologous promoter is preferred, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; *E. coli* T7 inducible RNA polymerase; alkaline phosphatase; a tryptophan (trp) promoter system; and hybrid promoters such as the tac promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence, using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, retroviruses, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, for example, heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling expression of (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bemoist and Chambon, *Nature* 290:304-10, 1981); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous

sarcoma virus (Yamamoto et al, *Cell* 22:787- 97, 1980); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45, 1981); the regulatory sequences of the metallothioneine gene (Brinster et al., *Nature* 296:39-42, 1982); prokaryotic expression vectors such as the beta- lactamase promoter (Villa-Kamaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-31, 1978); or the tac promoter (DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25, 1983).

An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription in higher eukaryotes of a DNA encoding an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10- 300 bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (e.g., globin, elastase, albumin, alpha- feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ encoding nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' to the promoter.

Expression vectors may be constructed from a starting vector such as a commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of the desired flanking sequences. Where one or more of the flanking sequences described herein are not already present in the vector, they may be individually obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

Preferred vectors are those which are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, inter alia, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Appl. Publ. No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids, or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to, plasmids such as Bluescript® plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid, Stratagene), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq- amplified PCR products (e.g., TOPO® TA Cloning® Kit, PCR2.1® plasmid derivatives, Invitrogen), and mammalian, yeast or virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives, Clontech).

After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. The transformation of an expression vector for an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as transfection, infection, electroporation, microinjection, lipofection, DEAE-dextran method, or other known techniques. The method selected will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example, in Sambrook et al., *supra*.

Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast, insect, or vertebrate cell). The host cell, when cultured under appropriate conditions, synthesizes an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide which can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity (such as glycosylation or phosphorylation) and ease of folding into a biologically active molecule.

A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells (CHO), CHO DHFR(-) cells (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4216-20, 1980), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells, or 3T3 cells. The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening, product production, and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines are monkey COS-1 and COS-7 cell lines, and the CV-1 cell line. Further exemplary mammalian host cells include primate cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines include, but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

Similarly useful as suitable host cells are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (e.g., HB101, DH5 α , DH10, and MC1061) are well known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., other *Bacillus* spp., and *Streptomyces* spp. may also be employed in this method.

Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for the expression of (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides. Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized for the expression of (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆. Such systems are described, for example, in Kitts et al., 1993, *Biotechniques* 14:810-17; Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564-72, 1993; and Lucklow et al., *J. Virol.*, 67:4566-79, 1993. Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen).

(E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆ Polypeptide Production

A host cell line comprising an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as necessary for the particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium

22

supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum, as necessary.

Typically, an antibiotic or other compound useful for selective growth of transfected or transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline, and neomycin.

The amount of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

If an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ has been designed to be secreted from the host cell line, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If, however, the polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for gram-negative bacteria host cells).

For an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ situated in the host cell cytoplasm and/or nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the intracellular material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to release the contents of the periplasm/cytoplasm by French press, homogenization, and/or sonication, followed by centrifugation.

If an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The solubilized (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation, or the like. If it is desired to isolate the polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston et al., *Meth. Enz.* 182:264-75, 1990.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

The purification of an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine 9 or other small peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or myc (Invitrogen) at either its carboxyl or amino-terminus, it may be purified in a one-step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel. Thus, an affinity column

23

of nickel (such as the Qiagen® nickel columns) can be used for purification. See, e. g., *Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, 1993).

Additionally, an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide may be purified through the use of a monoclonal antibody that is capable of specifically recognizing and binding to an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or

(D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide.

In situations where it is preferable to partially or completely purify an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide such that it is partially or substantially free of contaminants, standard methods known to those skilled in the art may be used. Such methods include, without limitation, separation by electrophoresis followed by electroelution, various types of chromatography (affinity, immunoaffinity, molecular sieve, and ion exchange), HPLC, and preparative isoelectric focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more purification techniques may be combined to achieve increased purity.

A number of additional methods for producing polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides. See, e.g., Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, 1997, which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. See also, Roberts, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-73, 1999.

Processes for producing peptides or polypeptides are also described in U.S. Pat. Nos.: 5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; and 5,817,483. The process involves producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having the desired activity. Other processes for recombinant peptide expression are disclosed in U.S. Pat. Nos.: 6,103,495, 6,210,925, 6,627,438, and 6,737,250. The process utilizes *E. coli* and the *E. coli* general secretory pathway. The peptide is fused to a signal sequence; thus, the peptide is targeted for secretion.

Another method for producing peptides or polypeptides is described in PCT Pat. Appl. Publ. No. WO 99/15650. The published process, termed random activation of gene expression for gene discovery, involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell which is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

Amidation

Amidation of a peptide, produced either synthetically or recombinantly, is accomplished by an enzyme called peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase (PAM). When producing (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ peptides recombinantly using a bacterial expression system, the peptides can be C-terminal amidated by an *in vitro* reaction using recombinant PAM enzyme. The PAM enzyme source, methods of its production and purification, and methods that can be used to amidate (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ peptides are described, for example, in U.S. Pat. Nos.: 4,708,934, 5,789,234, and 6,319,685.

Selective (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆ Antibodies

Antibodies and antibody fragments that specifically bind (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides, with or without pegylation at the site of cysteine substitution (as described herein), but do not selectively bind native hPYY₃₋₃₆, are within the scope of the present invention. The antibodies may be polyclonal, including monospecific polyclonal; monoclonal; recombinant; chimeric; humanized, such as CDR-grafted; human; single chain; and/or bispecific; as well as fragments; variants; or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody that bind to an epitope on the (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

Polyclonal antibodies directed toward an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide generally are produced in animals (e.g., rabbits or mice) by means of multiple SC or IP injections of (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or a (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-(E10C)hPYY₃₋₃₆ or anti-(D11C)hPYY₃₋₃₆ antibody titer.

Monoclonal antibodies directed toward (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides are produced using any method that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler et al., *Nature* 256:495-97, 1975, and the human B-cell hybridoma method (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001, 1984; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Also provided by the invention are hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies reactive with (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides.

Preferred methods for determining monoclonal antibody specificity and affinity by competitive inhibition can be found in Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); *Current Protocols in Immunology* (Colligan et al., eds., Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, 1993); and Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601, 1988.

Chimeric antibodies of the present invention may comprise individual H and/or L immunoglobulin chains. A preferred chimeric H chain comprises an antigen-binding region derived from the H chain of a non-human antibody specific for an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide which is linked to at least a portion of a human H chain C region (C_H), such as CH₁ or CH₂. A preferred chimeric L chain comprises an antigen-binding region derived from the L chain of a non-human antibody specific for an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide which is linked to at least a portion of a human L chain C region (C_L). Chimeric antibodies and methods for their production are known in the art. See Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3273-77, 1984; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-55, 1984; Boulianne et al., *Nature* 312:643-46, 1984; Neuberger et al., *Nature* 314:268-70, 1985; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*



84:3439-43, 1987; and Harlow and Lane, *supra*.

Selective binding agents having chimeric H chains and L chains of the same or different variable region binding specificity can also be prepared by appropriate association of the individual polypeptide chains, according to methods known in the art. See, e.g., *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, 1994) and Harlow and Lane, *supra*. Using this approach, host cells expressing chimeric H chains (or their derivatives) are separately cultured from host cells expressing chimeric L chains (or their derivatives), and the immunoglobulin chains are separately recovered and then associated. Alternatively, the host cells can be co-cultured and the chains allowed to associate spontaneously in the culture medium, followed by recovery of the assembled immunoglobulin.

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. See U.S. Pat. Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods described in the art (Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann et al., 1998, *Nature* 332:323-27; Verhoeven et al., 1988, *Science* 239:1534-36), by substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region (CDR) for the corresponding regions of a human antibody.

Techniques for creating recombinant DNA versions of the antigen-binding regions of antibody molecules (i.e., Fab or variable region fragments) which bypass the generation of monoclonal antibodies are encompassed within the scope of the present invention. In this technique, antibody-specific messenger RNA molecules are extracted from immune system cells taken from an immunized animal and transcribed into cDNA. The cDNA is then cloned into a bacterial expression system. One example of such a technique suitable for the practice of this invention uses a bacteriophage lambda vector system having a leader sequence that causes the expressed Fab protein to migrate to the periplasmic space (between the bacterial cell membrane and the cell wall) or to be secreted. One can rapidly generate and screen great numbers of functional Fab fragments for those which bind the antigen. Such (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆-binding molecules (Fab fragments with specificity for (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides) are specifically encompassed within the term "antibody" as used herein.

Also within the scope of the invention are techniques developed for the production of chimeric antibodies by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen-specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity (such as the ability to activate human complement and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)). Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-55, 1984; Neuberger et al., *Nature*, 312:604-08, 1984. Selective binding agents such as antibodies produced by this technique are within the scope of the invention.

It will be appreciated that the invention is not limited to mouse or rat monoclonal antibodies; in fact, human antibodies may be used. Such antibodies can be obtained by using human hybridomas. Fully human antibodies that bind (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides are thus encompassed by the invention. Such antibodies are produced by immunizing with an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ antigen (optionally conjugated to a carrier) transgenic animals (e.g., mice) capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. See, e.g., Jakobovits et al.,

26

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2551-55, 1993; Jakobovits et al., *Nature* 362:255-58, 1993; Bruggemann et al., *Year in Immuno.* 7:33-40, 1993.

Also encompassed by the invention are human antibodies that bind (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides. Using transgenic animals (e.g., mice) that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production such antibodies are produced by immunization with an (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide antigen (i.e., having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. See, e.g., Jakobovits et al., 1993 *supra*; Jakobovits et al., *Nature* 362:255-58, 1993; Bruggemann et al., 1993, *supra*. In one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into the genome thereof. Partially modified animals, that is, those having less than the full complement of modifications, are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, e.g., murine) amino acid sequences, including variable regions which are immunospecific for these antigens. See PCT Pat. Appl. Publ. Nos.: WO 96/33735 and WO 94/02602. Additional methods are described in U.S. Pat. No. 5,545,807, PCT Pat. Appl. Publ. Nos.: WO 91/10741 and WO 90/04036, and in EP Patent No. 0 546 073 B1 and PCT Pat. Appl. Publ. No. WO 92/03918. Human antibodies can also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternative embodiment, human antibodies can also be produced from phage-display libraries (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581, 1991). These processes mimic immune selection through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in PCT Pat. Appl. Publ. No. WO 99/10494, which describes the isolation of high affinity and functional agonistic antibodies for MPL- and msk-receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein and known in the art. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (e.g., human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-(E10C)hPYY₃₋₃₆ and anti-(D11C)hPYY₃₋₃₆ antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides, as well as polypeptide purification. The antibodies will bind (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptides with an affinity that is appropriate for the assay method being employed.

The PYY agonists of the invention may be provided in the form of pharmaceutically acceptable acid addition salts for use in the method aspect of the invention. Representative pharmaceutically acceptable acid addition salts of the present compounds include hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, nitrate, sulfate, bisulfate, phosphate, acid phosphate, isonicotinate, acetate, lactate, salicylate, citrate, acid citrate, tartrate,

pantothenate, bitartrate, ascorbate, succinate, maleate, gentisinate, fumarate, gluconate, glucuronate, saccharate, formate, benzoate, glutamate, methanesulfonate, ethanesulfonate, benzenesulfonate, p-toluenesulfonate, pamoate, palmitate, malonate, stearate, laurate, malate, borate, hexafluorophosphate, naphthylate, glucoheptonate, lactobionate and laurylsulfonate salts and the like. Salts of the non-pegylated variants need not be pharmaceutically acceptable where the variant is to be used as an intermediate in the preparation of the PEG-PYY₃₋₃₆ variant conjugate.

The PYY agonists of the present invention will generally be administered in the form of a pharmaceutical composition. The pharmaceutical composition may, for example, be in a form suitable for oral administration (e.g., a tablet, capsule, pill, powder, solution, suspension), for parenteral injection (e.g., a sterile solution, suspension or emulsion), for intranasal administration (e.g., an aerosol drops, etc), for rectal administration (e.g., a suppository) or for transdermal (e.g., a patch). The pharmaceutical composition may be in unit dosage forms suitable for single administration of precise dosages. The pharmaceutical composition will include a conventional pharmaceutical carrier and a PYY agonist of the invention as an active ingredient. In addition, it may include other pharmaceutical agents, adjuvants, etc.

Methods of preparing various pharmaceutical compositions of bioactive peptides are well known in the pharmaceutical sciences art. For example, see U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2005/0009748 (for oral administration); and 2004/0157777, 2005/0002927 and 2005/0215475 (for transmucosal administration, e.g., intranasal or buccal administration). See also *Remington: The Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 20th ed. 2000.

The PYY agonists of this invention may be used in conjunction with other pharmaceutical agents for the treatment of the disease states or conditions described herein. Therefore methods of treatment that include administering compounds of the present invention in combination with other pharmaceutical agents are also provided by the present invention.

Suitable pharmaceutical agents that may be used in combination with the PYY agonists of the present invention include other anti-obesity agents such as cannabinoid-1 (CB-1) antagonists (such as rimonabant), 11 β -hydroxy steroid dehydrogenase-1 (11 β -HSD type 1) inhibitors, MCR-4 agonists, cholecystokinin-A (CCK-A) agonists, monoamine reuptake inhibitors (such as sibutramine), sympathomimetic agents, β_3 adrenergic receptor agonists, dopamine receptor agonists (such as bromocriptine), melanocyte-stimulating hormone receptor analogs, 5HT_{2c} receptor agonists, melanin concentrating hormone antagonists, leptin, leptin analogs, leptin receptor agonists, galanin antagonists, lipase inhibitors (such as tetrahydrolipstatin, i.e. orlistat), anorectic agents (such as a bombesin agonist), neuropeptide-Y receptor antagonists (e.g., NPY Y5 receptor antagonists), thyromimetic agents, dehydroepiandrosterone or an analog thereof, glucocorticoid receptor agonists or antagonists, orexin receptor antagonists, glucagon-like peptide-1 receptor agonists, ciliary neurotrophic factors (such as AxokineTM available from Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY and Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH), human agouti-related protein (AGRP) inhibitors, ghrelin receptor antagonists, histamine 3 receptor antagonists or inverse agonists, neuromedin U receptor agonists, MTP/ApoB inhibitors (e.g., gut-selective MTP inhibitors, such as dirilotapide) and the like.

Preferred anti-obesity agents for use in combination with the PYY agonists of the present invention

include CB-1 receptor antagonists, gut-selective MTP inhibitors, CCKa agonists, 5HT_{2c} receptor agonists, NPY Y₅ receptor antagonists, orlistat, and sibutramine. Preferred CB-1 receptor antagonists for use in the methods of the present invention include: rimonabant (SR141716A also known under the tradename Acomplia™) is available from Sanofi-Synthelabo or can be prepared as described in U.S. Pat. No. 5,624,941;

5 *N*-(piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (AM251) is available from Tocris™, Ellisville, MO; [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichloro-phenyl)-4-ethyl-*N*-(1-piperidinyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide] (SR147778) which can be prepared as described in U.S. Pat. No. 6,645,985; *N*-(piperidin-1-yl)-4,5-diphenyl-1-methylimidazole-2-carboxamide, *N*-(piperidin-1-yl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide, *N*-(piperidin-1-yl)-4,5-di-(4-methylphenyl)-1-

10 methylimidazole-2-carboxamide, *N*-cyclohexyl-4,5-di-(4-methylphenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide, *N*-(cyclohexyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide, and *N*-(phenyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-1-methylimidazole-2-carboxamide which can be prepared as described in PCT Pat. Appl. Publ. No. WO 03/075660; the hydrochloride, mesylate and besylate salt of 1-[9-(4-chloro-phenyl)-8-(2-chloro-phenyl)-9*H*-purin-6-yl]-4-ethylamino-piperidine-4-carboxylic acid amide which

15 can be prepared as described in U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2004/0092520; 1-[7-(2-chloro-phenyl)-8-(4-chloro-phenyl)-2-methyl-pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-yl]-3-ethylamino-azetidine-3-carboxylic acid amide and 1-[7-(2-chloro-phenyl)-8-(4-chloro-phenyl)-2-methyl-pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-yl]-3-methylamino-azetidine-3-carboxylic acid amide which can be prepared as described in U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2004/0157839; 3-(4-chloro-phenyl)-2-(2-chloro-phenyl)-6-(2,2-difluoro-propyl)-2,4,5,6-tetrahydro-pyrazolo[3,4-*c*]pyridin-7-one

20 which can be prepared as described in U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2004/0214855; 3-(4-chloro-phenyl)-2-(2-chloro-phenyl)-7-(2,2-difluoro-propyl)-6,7-dihydro-2*H*,5*H*-4-oxa-1,2,7-triaza-azulen-8-one which can be prepared as described in U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2005/0101592; 2-(2-chloro-phenyl)-6-(2,2,2-trifluoro-ethyl)-3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-2,6-dihydro-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one which can be prepared as described in U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2004/0214838; (S)-4-chloro-*N*-{[3-(4-chloro-phenyl)-4-phenyl-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-methylamino-methylene}-benzenesulfonamide (SLV-319) and (S)-*N*-{[3-(4-chloro-phenyl)-4-phenyl-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-methylamino-methylene}-4-trifluoromethyl-benzenesulfonamide (SLV-326) which can be prepared as described in PCT Pat. Appl. Publ. No. WO 02/076949; *N*-piperidino-5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethylpyrazole-3-carboxamide which can be prepared as described in U.S. Patent No. 6,432,984; 1-[bis-(4-chloro-phenyl)-methyl]-3-[(3,5-difluoro-phenyl)-methanesulfonyl-methylene]-azetidine which can be prepared as described in U.S. Pat. No. 6,518,264; 2-(5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yloxy)-*N*-(4-(4-chlorophenyl)-3-(3-cyanophenyl)butan-2-yl)-2-methylpropanamide which can be prepared as described in PCT Pat. Appl. Publ. No. WO 04/048317; 4-[[6-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-1-benzofuran-3-yl]carbonyl]benzonitrile (LY-320135) which can be prepared as described in U.S. Pat. No. 5,747,524; 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(4-fluorophenyl)-benzo[1,3]dioxole-5-sulfonyl]-piperidine

30 which can be prepared as described in WO 04/013120; and [3-amino-5-(4-chlorophenyl)-6-(2,4-dichlorophenyl)-furo[2,3-*b*]pyridin-2-yl]-phenyl-methanone which can be prepared as described in PCT Pat. Appl. Publ. No. WO 04/012671.

Preferred intestinal-acting MTP inhibitors for use in the combinations, pharmaceutical compositions, and methods of the invention include dirilotapide ((S)-*N*-(2-[benzyl(methyl)amino]-2-oxo-1-phenylethyl)-1-

methyl-5-[4'-(trifluoromethyl)[1,1'-biphenyl]-2-carboxamido]-1*H*-indole-2-carboxamide) and 1-methyl-5-[(4'-trifluoromethyl-biphenyl-2-carbonyl)-amino]-1*H*-indole-2-carboxylic acid (carbamoyl-phenyl-methyl)-amide which can both be prepared using methods described in U.S. Pat. No. 6,720,351; (S)-2-[(4'-trifluoromethyl-biphenyl-2-carbonyl)-amino]-quinoline-6-carboxylic acid (pentylcarbamoyl-phenyl-methyl)-amide, (S)-2-[(4'-tert-butyl-biphenyl-2-carbonyl)-amino]-quinoline-6-carboxylic acid [[[4-fluoro-benzyl)-methyl-carbamoyl]-phenyl-methyl]-amide, and (S)-2-[(4'-tert-butyl-biphenyl-2-carbonyl)-amino]-quinoline-6-carboxylic acid [(4-fluoro-benzylcarbamoyl)-phenyl-methyl]-amide which can all be prepared as described in U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2005/0234099A1, (-)-4-[4-[4-[[[(2*S*,4*R*)-2-(4-chlorophenyl)-2-[[[(4-methyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)sulfanyl]methyl-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazin-1-yl]phenyl]-2-(1*R*)-1-methylpropyl]-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-3-one (also known as Mitratapide or R103757) which can be prepared as described in U.S. Pat. Nos. 5,521,186 and 5,929,075; and implitapide (BAY 13-9952) which can be prepared as described in U.S. Pat. No. 6,265,431. Most preferred is dirilotapide, mitratapide, (S)-2-[(4'-trifluoromethyl-biphenyl-2-carbonyl)-amino]-quinoline-6-carboxylic acid (pentylcarbamoyl-phenyl-methyl)-amide, (S)-2-[(4'-tert-butyl-biphenyl-2-carbonyl)-amino]-quinoline-6-carboxylic acid [[[4-fluoro-benzyl)-methyl-carbamoyl]-phenyl-methyl]-amide, or (S)-2-[(4'-tert-butyl-biphenyl-2-carbonyl)-amino]-quinoline-6-carboxylic acid [(4-fluoro-benzylcarbamoyl)-phenyl-methyl]-amide. Preferred NPY Y5 receptor antagonist include: 2-oxo-N-(5-phenylpyrazinyl)spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidine]-1'-carboxamide which can be prepared as described in U.S. Pat. Appl. Publ. No. 2002/0151456; and 3-oxo-N-(5-phenyl-2-pyrazinyl)-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidine]-1'-carboxamide; 3-oxo-N-(7-trifluoromethylpyrido[3,2-*b*]pyridin-2-yl)-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidine]-1'-carboxamide; N-[5-(3-fluorophenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidine]-1'-carboxamide; *trans*-3'-oxo-N-(5-phenyl-2-pyrimidinyl)] spiro[cyclohexane-1,1'(3*H*)-isobenzofuran]-4-carboxamide; *trans*-3'-oxo-N-[1-(3-quinolyl)-4-imidazolyl]spiro[cyclohexane-1,1'(3*H*)-isobenzofuran]-4-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(5-phenyl-2-pyrazinyl)spiro[4-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-N-[5-(3-fluorophenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[5-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-N-[5-(2-fluorophenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[5-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-N-[1-(3,5-difluorophenyl)-4-imidazolyl]-3-oxospiro[7-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(1-phenyl-4-pyrazolyl)spiro[4-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-N-[1-(2-fluorophenyl)-3-pyrazolyl]-3-oxospiro[6-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(1-phenyl-3-pyrazolyl)spiro[6-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; and *trans*-3-oxo-N-(2-phenyl-1,2,3-triazol-4-yl)spiro[6-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide, all of which can be prepared as described in described in PCT Pat. Appl. Publ. No. WO 03/082190; and pharmaceutically acceptable salts and esters thereof. All of the above recited U.S. patents and publications are incorporated herein by reference.

In the methods aspect of the invention, a PYY agonist of the invention, alone or in combination with one or more other pharmaceutical agents, is peripherally administered to a subject separately or together in any of the conventional methods of peripheral administration known in the art. Accordingly, the PYY agonist or combination may be administered to a subject parenterally (e.g., intravenously, intraperitoneally,



intramuscularly or subcutaneously), intranasally, orally, sublingually, buccally, by inhalation (e.g., by aerosol), rectally (e.g., by suppositories) or transdermally. Parenteral administration is a preferred method of administration, and subcutaneous administration is a preferred method of parenteral administration.

Compositions suitable for parenteral injection generally include pharmaceutically acceptable sterile aqueous or nonaqueous solutions, dispersions, suspensions, or emulsions, and sterile powders for reconstitution into sterile injectable solutions or dispersions. Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers or diluents (including solvents and vehicles) include water, ethanol, polyols (propylene glycol, polyethylene glycol, glycerol, and the like), suitable mixtures thereof, triglycerides including vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate.

These compositions for parenteral injection may also contain excipients such as preserving, wetting, solubilizing, emulsifying, and dispersing agents. Prevention of microorganism contamination of the compositions can be accomplished with various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, for example, sugars, sodium chloride, and the like. Prolonged absorption of injectable pharmaceutical compositions can be brought about by the use of agents capable of delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

The PYY agonists of the present invention will be administered to a subject at a dosage that varies depending on a number of factors, including the mode of administration, the age and weight of the subject, the severity of the disease, condition or disorder being treated, and the pharmacological activity of the PYY agonist being administered. The determination of dosage ranges and optimal dosages for a particular patient is well within the ordinary skill in the art.

For parenteral administration, the PYY agonists of the present invention may be administered to a human subject at dosage levels in the range of about 0.01 µg/kg to about 10 mg/kg/dose in a dosing regimen on a non-pegylated variant basis. For example, for the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆, the parenteral dosing level would be in the range of about 0.01 µg/kg to about 10 mg/kg/dose in a dosing regimen on an (E10C)hPYY₃₋₃₆ basis, preferably in the range of about 0.05 mg/kg to about 1.0 mg/kg/dose, or about 0.05 or 0.1 mg/kg to about 1.0 mg/kg/dose, or about 0.05 or 0.1 mg/kg to about 0.3 or 0.5 mg/kg/dose. For example, a dose of 85 mg of 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆, which has a molecular weight of about 34024 Da (30 k Da PEG plus 4024, the molecular weight of the non-pegylated peptide), is equivalent to 10 mg on a non-pegylated, (E10C)hPYY₃₋₃₆ basis. The dosing regimen may be one or more doses daily, preferably before a meal, or, particularly with the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ or the 20K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆, a dosing regimen of 2 or 3 times a week or once weekly or once every 10-14 days is preferred.

Embodiments of the present invention are illustrated by the following Examples. It is to be understood, however, that the embodiments of the invention are not limited to the specific details of these Examples, as other variations thereof will be known, or apparent in light of the instant disclosure and appendant claims, to one of ordinary skill in the art. All references cited herein are hereby incorporated by reference.

51

EXAMPLES

Example 1

Linear 30K and 20K mPEG and 20 K Maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

This example provides the preparation of substantially homogeneous monopegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ with mPEG (30K or 20K) attached at residue 10.

(a) Preparation of (E10C)hPYY₃₋₃₆

(E10C)PYY₃₋₃₆ was synthesized by solid-phase method using Fmoc strategy with 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate (HBTU) activation (Fastmoc, 0.15 mmol cycles) using an automatic peptide synthesizer (model 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA). The side chain protection groups used were Trt for Asn, Gln, Cys and His; tBu for Ser, Thr, and Tyr; Boc for Lys; OtBu for Asp and Glu; and Pbf for Arg. Cleavage of peptide-resin was completed with a mixture of 9mL of trifluoroacetic acid (TFA), 0.5 g of phenol, 0.5mL of H₂O, 0.5mL of thioanisole and 0.25mL of 1,2-ethanedithiol at room temperature for 4 h. Peptide was precipitated in ice-cold ethyl ether, and washed with ethyl ether, dissolved in DMSO and purified by reverse phase HPLC on a Waters Deltapak C18, 15um, 100Å, 50x300mmID column (Cat # WAT011801, Waters, Milford, MA) using a linear gradient from 100% Solvent A: 0% Solvent B to 70% solvent A : 30% solvent B in 30 minutes at a flow rate of 80 mL /min. Solvent A is an aqueous 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) solution. Solvent B is 0.1% TFA solution in acetonitrile. The molecular mass of the purified peptide was confirmed by ESI-MS (M_{avg}=4024), and purity was assessed by reversed phase HPLC (Figure 1).

(b) Preparation of linear 30K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

Linear mPEG maleimide reagent of approximately 30,000 MW (Sunbright ME-300MA, NOF Corporation, Tokyo, Japan) was selectively coupled to (E10C)hPYY₃₋₃₆ on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 10. Linear 30K mPEG maleimide, dissolved in 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0, or, alternatively, 20mM sodium acetate (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5, was immediately reacted with (E10C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions were carried out in the dark at room temperature for 0.5-24 hours. Reactions in HEPES pH 7.0 were stopped by dilution into 20mM sodium acetate pH 4.5, for immediate purification on cation exchange chromatography. Reactions in 20mM sodium acetate, pH 4.5, were loaded directly onto cation exchange chromatography. Reaction products were assessed by SEC-HPLC (Figure 2).

(c) Purification of linear 30K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

The pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ species was purified from the reaction mixture to >95% using a single ion exchange chromatography step. Mono-pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ was purified from unmodified (E10C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using cation exchange chromatography. A typical linear 30K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (10 mg protein), as described above, was



fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ) equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixture was diluted 7X with buffer A and loaded onto the column at a flow rate of 2.5 mL/min. The column was washed with 5-10 column volumes of buffer A. Subsequently, the various (E10C)hPYY₃₋₃₆ species were eluted from the column in 20 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-100 mM. The eluant was monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions were collected. Fractions were pooled as to extent of pegylation, as assessed by [®]SDS-PAGE (Figure 3). The purified pool was then concentrated to 0.5-5 mg/mL in a Centriprep 3 concentrator (Amicon Technology Corporation, Northborough, MA) or, alternatively, using a Vivaspin 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group, Hannover, Germany). Protein concentration of the purified pool was determined by comparing the RP HPLC peak area to a PYY₃₋₃₆ standard curve (not shown) or, alternatively, the concentration of the purified pool was determined by the absorbance at 280nm using an experimentally derived extinction coefficient. A purified pool of pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ was profiled using SEC-HPLC as shown in Figure 6.

(d) Preparation of linear 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

Linear mPEG maleimide reagent of approximately 20,000 MW (Sunbright ME-200MA, NOF Corporation) was selectively coupled to (E10C)hPYY₃₋₃₆ on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 10. Linear 20K mPEG maleimide, dissolved 20mM sodium acetate (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5, was immediately reacted with (E10C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1.3:1. Reactions were carried out in the dark at room temperature for 60 minutes followed by 16 hours at 4°C. Reactions in 20 mM sodium acetate, pH 4.5, were loaded directly onto cation exchange chromatography. Reaction products were assessed by SEC-HPLC.

(e) Purification of linear 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

The pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ species was purified from the reaction mixture to >95% using a single ion exchange chromatography step. Mono-pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ was separated from free PEG, unmodified (E10C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using cation exchange chromatography. A typical linear 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (20 mg protein), as described above, was fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixture was loaded onto the column at a flow rate of 1.0 mL/min. The column was washed with 4 column volumes of buffer A at a flow rate of 2.5 mL/min. Subsequently, the various (E10C)hPYY₃₋₃₆ species were eluted from the column in 25 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-200 mM at a flow rate of 2.5 mL/min. The eluant was monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions were collected. Fractions were pooled as to extent of pegylation, as assessed by SEC-HPLC. The purified pool was then concentrated to 0.5-5 mg/mL using a Vivaspin 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group). Protein concentration of the purified pool was determined by the absorbance at 280 nm using an experimentally derived extinction coefficient. The total process yield of purified mono 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ was 38 %. The purified pool of



mono 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ was determined to be 96% pure using SEC-HPLC.

Example 2

5 Linear 30K mPEG Maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

This example demonstrates the preparation of substantially homogeneous monopegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ with mPEG attached at residue 11.

(a) Preparation of (D11C)hPYY₃₋₃₆

10 (D11C)PYY₃₋₃₆ was synthesized by solid-phase method using Fmoc strategy with 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate (HBTU) activation (Fastmoc, 0.15 mmol cycles) using an automatic peptide synthesizer (model 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA). The side chain protection groups used were Trt for Asn, Gln, Cys and His; tBu for Ser, Thr, and Tyr; Boc for Lys; OtBu for Asp and Glu; and Pbf for Arg. Cleavage of peptide-resin was completed with a mixture of 9mL of
15 trifluoroacetic acid (TFA), 0.5 g of phenol, 0.5mL of H₂O, 0.5mL of thioanisole and 0.25mL of 1,2 ethanedithiol at room temperature for 4 h. Peptide was precipitated in ice-cold ethyl ether, and washed with ethyl ether, dissolved in DMSO and purified by reverse phase HPLC on a Waters Deltapak C18, 15μm, 100Å, 50x300mmID column (Cat # WAT011801, Waters, Milford, MA) using a linear gradient from 100% Solvent A: 0% Solvent B to 70% solvent A : 30% solvent B in 30 minutes at a flow rate of 80 mL /min.
20 Solvent A is an aqueous 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) solution. Solvent B is 0.1% TFA solution in acetonitrile. The molecular mass of the purified peptide was confirmed by ESI-MS (M_{Avg}=4038), and purity was assessed by reversed phase HPLC (Figure 4).

(b) Preparation of linear 30K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

25 Linear mPEG maleimide reagent of approximately 30,000 MW (Sunbright ME-300MA, NOF Corporation, Tokyo, Japan) was selectively coupled to (D11C)hPYY₃₋₃₆ on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 11. Linear 30K mPEG maleimide, dissolved in 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0 was immediately reacted with (D11C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions
30 were carried out in the dark at room temperature for 0.5-24 hours. Reactions were stopped by dilution into 20mM sodium acetate pH 4.5, for immediate purification on cation exchange chromatography. Reaction products were assessed by SEC-HPLC (Figure 5).

Alternatively, instead of dissolving the linear 30K mPEG maleimide in HEPES as described above, it is dissolved in 20 mM sodium acetate (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4.5, and is immediately reacted
35 with (D11C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions are carried out in the dark at room temperature for 0.5-24 hours. Reactions are loaded directly onto cation exchange chromatography. Reaction products are assessed by SEC-HPLC.

5

(c) Purification of linear 30K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

The pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ species was purified from the reaction mixture to >95% using a single ion exchange chromatography step. Mono-pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ was purified from unmodified (D11C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using cation exchange chromatography. A typical linear 30K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (10 mg protein), as described above, was fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ) equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixtures at pH 7.0 were diluted 7X with buffer A and loaded onto the column at a flow rate of 2.5 mL/min. The column was washed with 5-10 column volumes of buffer A. Subsequently, the various (D11C)hPYY₃₋₃₆ species were eluted from the column in 20 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-100 mM. The eluant was monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions were collected. Fractions were pooled as to extent of pegylation, as assessed by SEC HPLC. The purified pool was then concentrated to 0.5-5 mg/mL in a Vivaspinn 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group). Protein concentration of the purified pool was determined by comparing the RP HPLC peak area to a PYY₃₋₃₆ standard curve (not shown). A purified pool of pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ was profiled using SEC-HPLC as shown in Figure 7.

Alternatively, reactions at pH 4.5, from (b) above, are loaded directly onto the column at a flow rate of 2.5 mL/min and concentration of the purified pool is determined by the absorbance at 280 nm using an experimentally derived extinction coefficient.

Example 3

Branched 43K mPEG Maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

This example demonstrates the preparation of substantially homogeneous monopegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ with mPEG attached at residue 10.

(a) Preparation of branched 43K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

Branched mPEG maleimide reagent of approximately 43,000 MW (Sunbright GL2-400MA, NOF Corporation, Tokyo, Japan) was selectively coupled to (E10C)hPYY₃₋₃₆, prepared as described in Example 1(a), on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 10.

Branched 43K mPEG maleimide, dissolved in 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 7.0, was immediately reacted with (E10C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions were carried out in the dark at room temperature for 0.5-24 hours. Reactions in HEPES, pH 7.0, were stopped by dilution into 20mM sodium acetate, pH 4.5, for immediate purification on cation exchange chromatography. Reaction products were assessed by SEC-HPLC (Figure 8).

Alternatively, branched 43K mPEG maleimide, is dissolved in 20mM sodium acetate (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4.5, and is immediately reacted with (E10C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions are loaded directly onto cation exchange chromatography.

55

(b) Purification of mono pegylated branched 43K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

The mono pegylated branched 43K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ species was separated from unmodified (E10C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using a single cation exchange chromatography step. A typical branched 43K mPEGmaleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (10 mg protein), as described above, was fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixtures at pH 7.0 were diluted 10X with buffer A and loaded onto the column at a flow rate of 2.5 mL/min. The column was washed with 5-10 column volumes of buffer A. Subsequently, the various (E10C)hPYY₃₋₃₆ species were eluted from the column in 20 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-100 mM. The eluant was monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions were collected. Fractions were pooled as to extent of pegylation, as assessed by SEC-HPLC. The purified pool was then concentrated to 0.5-5 mg/mL in a Centriprep 3 concentrator (Amicon Technology Corporation) or, alternatively, using a Vivaspın 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group). Protein concentration of the purified pool was quantitated by amino acid analysis. A purified pool of monopegylated branched 43 K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ was profiled using SEC-HPLC as shown in Figure 9.

Alternatively, protein concentration is determined by comparing the RP HPLC peak area to a PYY₃₋₃₆ standard curve (not shown) or by the absorbance at 280 nm using an experimentally derived extinction coefficient.

Example 4

This example contemplates the preparation of substantially homogeneous monopegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ with linear 12 kD mPEG, or branched 20 kD mPEG, attached at residue 10, and the contemplated preparation of substantially homogeneous monopegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ with linear 20 kD mPEG, linear 12 kD mPEG, or branched 20 kD mPEG, attached at residue 11.

(a) Preparation of linear 12K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

Linear mPEG maleimide reagent of approximately 12,000 MW (Sunbright ME-120MA, NOF Corporation) is selectively coupled to (E10C)hPYY₃₋₃₆ on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 10. Linear 12K mPEG maleimide, dissolved 20mM sodium acetate (Sigma Chemical) pH 4.5, is immediately reacted with (E10C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions are carried out in the dark at room temperature for 0.5 to 24 hours. Reactions in 20 mM sodium acetate, pH 4.5, are loaded directly onto cation exchange chromatography. Reaction products are assessed by SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(b) Purification of linear 12K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

The pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ species is purified from the reaction mixture to >95% using a single ion exchange chromatography step. Mono-pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ is separated from free PEG, unmodified (E10C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using cation exchange chromatography. A typical linear 12K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (10 mg protein), as described above, is

56

fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixture is loaded onto the column at a flow rate of 1.0 mL/min. The column is washed with 4 column volumes of buffer A at a flow rate of 2.5 mL/min. Subsequently, the various (E10C)hPYY₃₋₃₆ species are eluted from the column in 25 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-200 mM at a flow rate of 2.5 mL/min. The eluant is monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions are collected. Fractions are pooled as to extent of pegylation, as assessed by SEC-HPLC. The purified pool is then concentrated to 0.5-5 mg/mL using a Vivaspin 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group). Protein concentration of the purified pool is determined by the absorbance at 280 nm using an experimentally derived extinction coefficient. A purified pool of 12K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is profiled using SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(c) Preparation of branched 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

Branched mPEG maleimide reagent of approximately 20,000 MW (Sunbright GL2-200MA, NOF Corporation) is selectively coupled to (E10C)hPYY₃₋₃₆ on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 10. Branched 20K mPEG maleimide, dissolved in 20 mM sodium acetate (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5, is immediately reacted with (E10C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions are carried out in the dark at room temperature for 0.5 to 24 hours. Reactions in 20 mM sodium acetate, pH 4.5, are loaded directly onto cation exchange chromatography. Reaction products are assessed by SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(d) Purification of branched 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆

The pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ species is purified from the reaction mixture to >95% using a single ion exchange chromatography step. Mono-pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ is separated from free PEG, unmodified (E10C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using cation exchange chromatography. A typical branched 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (10 mg protein), as described above, is fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixture is loaded onto the column at a flow rate of 1.0 mL/min. The column is washed with 4 column volumes of buffer A at a flow rate of 2.5 mL/min. Subsequently, the various (E10C)hPYY₃₋₃₆ species are eluted from the column in 25 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-200 mM at a flow rate of 2.5 mL/min. The eluant is monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions are collected. Fractions are pooled as to extent of pegylation, as assessed by SEC-HPLC. The purified pool is then concentrated to 0.5-5 mg/mL using a Vivaspin 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group). Protein concentration of the purified pool is determined by the absorbance at 280 nm using an experimentally derived extinction coefficient. A purified pool of branched 20K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is profiled using SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(e) Preparation of linear 20K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

Linear mPEG maleimide reagent of approximately 20,000 MW (Sunbright ME-200MA, NOF

57

Corporation) is selectively coupled to (D11C)hPYY₃₋₃₆ on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 11. Linear 20K mPEG maleimide, dissolved in 20 mM sodium acetate (Sigma Chemical) pH 4.5, is immediately reacted with (D11C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions are carried out in the dark at room temperature for 0.5 to 24 hours. Reactions in 20 mM sodium acetate, pH 4.5, are loaded directly onto cation exchange chromatography. Reaction products were assessed by SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(f) Purification of linear 20K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

The pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ species is purified from the reaction mixture to >95% using a single ion exchange chromatography step. Mono-pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ is separated from free PEG, unmodified (D11C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using cation exchange chromatography. A typical linear 20K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (10 mg protein), as described above, is fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixture is loaded onto the column at a flow rate of 1.0 mL/min. The column is washed with 4 column volumes of buffer A at a flow rate of 2.5 mL/min. Subsequently, the various (D11C)hPYY₃₋₃₆ species are eluted from the column in 25 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-200 mM at a flow rate of 2.5 mL/min. The eluant is monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions are collected. Fractions are pooled as to extent of pegylation, as assessed by SEC-HPLC. The purified pool is then concentrated to 0.5-5 mg/mL using a Vivaspinn 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group). Protein concentration of the purified pool is determined by the absorbance at 280 nm using an experimentally derived extinction coefficient. A purified pool of 20K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ is profiled using SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(g) Preparation of linear 12K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

Linear mPEG maleimide reagent of approximately 12,000 MW (Sunbright ME-120MA, NOF Corporation) is selectively coupled to (D11C)hPYY₃₋₃₆ on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 10. Linear 12K mPEG maleimide, dissolved 20mM sodium acetate (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5, is immediately reacted with (D11C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions are carried out in the dark at room temperature for 0.5 to 24 hours. Reactions in 20 mM sodium acetate, pH 4.5, are loaded directly onto cation exchange chromatography. Reaction products are assessed by SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(h) Purification of linear 12K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

The pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ species is purified from the reaction mixture to >95% using a single ion exchange chromatography step. Mono-pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ is separated from free PEG, unmodified (D11C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using cation exchange chromatography. A typical linear 12K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (10 mg protein), as described above, is fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare)

58

equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixture is loaded onto the column at a flow rate of 1.0 mL/min. The column is washed with 4 column volumes of buffer A at a flow rate of 2.5 mL/min. Subsequently, the various (D11C)hPYY₃₋₃₆ species are eluted from the column in 25 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-200 mM at a flow rate of 2.5 mL/min. The eluant is monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions are collected. Fractions are pooled as to extent of pegylation, as assessed by SEC-HPLC. The purified pool is then concentrated to 0.5-5 mg/mL using a Vivaspin 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group). Protein concentration of the purified pool is determined by the absorbance at 280 nm using an experimentally derived extinction coefficient. A purified pool of 12K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ is profiled using SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(i) Preparation of branched 20K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

Branched mPEG maleimide reagent of approximately 20,000 MW (Sunbright GL2-200MA, NOF Corporation) is selectively coupled to (D11C)hPYY₃₋₃₆ on the sulfhydryl group of the cysteine at residue 10. Branched 20K mPEG maleimide, dissolved in 20 mM sodium acetate (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5, is immediately reacted with (D11C)hPYY₃₋₃₆ peptide by direct addition of peptide to yield a 1 mg/mL peptide concentration and a relative mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ molar ratio of about 1:1. Reactions are carried out in the dark at room temperature for 0.5 to 24 hours. Reactions in 20 mM sodium acetate, pH 4.5, are loaded directly onto cation exchange chromatography. Reaction products are assessed by SEC-HPLC or SDS-PAGE.

(j) Purification of branched 20K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆

The pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ species is purified from the reaction mixture to >95% using a single ion exchange chromatography step. Mono-pegylated (D11C)hPYY₃₋₃₆ is separated from free PEG, unmodified (D11C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species using cation exchange chromatography. A typical branched 20K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixture (10 mg protein), as described above, is fractionated on a SP-Sepharose Hitrap column (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrated in 20 mM sodium acetate, pH 4.5 (Buffer A). The reaction mixture is loaded onto the column at a flow rate of 1.0 mL/min. The column is washed with 4 column volumes of buffer A at a flow rate of 2.5 mL/min. Subsequently, the various (D11C)hPYY₃₋₃₆ species are eluted from the column in 25 column volumes of a linear NaCl gradient of 0-200 mM at a flow rate of 2.5 mL/min. The eluant is monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and appropriate size fractions are collected. Fractions are pooled as to extent of pegylation, as assessed by SEC-HPLC. The purified pool is then concentrated to 0.5-5 mg/mL using a Vivaspin 10K concentrator (Vivascience Sartorius Group). Protein concentration of the purified pool is determined by the absorbance at 280 nm using an experimentally derived extinction coefficient. A purified pool of branched 20K mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ is profiled using SEC-HPLC or SDS-PAGE.

59

Example 5

Biochemical Characterization

(E10C)hPYY₃₋₃₆, (D11C)hPYY₃₋₃₆ and pegylated forms of (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)hPYY₃₋₃₆ were characterized by various biochemical methods including Electrospray Mass Spectrometry (ESI-MS), SDS-PAGE, and SEC HPLC and RP HPLC, respectively.

(A) Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was carried out on a 1100 series LC/MSD electrospray mass spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) in the positive mode. (Example 1(a), 2(a)).

(B) Reversed phase chromatography was carried out for analysis of (E10C)hPYY₃₋₃₆ peptide (Figures 1 and 4) on a ZORBAX Eclipse XDB-C8, 4.6X150mm, 5mm column (Cat # 993967-906, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) using a linear gradient from 100 % solvent A, 0 % solvent B to 95% solvent A, 5% solvent B in 3 minutes, then from 95 % Solvent A, 5 % Solvent B to 50% solvent A, 50% solvent B in 12 minutes at a rate of 1.5 ml/minute (Example 1 (a)). Solvent A is an aqueous 0.1% TFA solution. Solvent B is 0.1% TFA solution in acetonitrile.

Reversed phase chromatography for quantitation of pegylated (E10C)hPYY₃₋₃₆ and (D11C)PYY₃₋₃₆ (not shown) was carried out on a Vydac C18 (2.1x250 mm) column (Cat # 218MS552, Vydac, Hesperia, CA) using a linear gradient from 80% solvent A, 20% solvent B to 40% solvent A, 60% solvent B in 48 minutes at a flow rate of 0.2 mL/minute. (Example 1C, 2C) Solvent A is an aqueous, 0.1% TFA solution. Solvent B is 0.085% TFA solution in acetonitrile.

(C) Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC)

The reaction mixtures of linear 30K or branched 43 K mPEG with either (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆, their cation exchange purification pools, and final purified products were assessed using non-denaturing SEC-HPLC (Example 1(b) and (c), 2(b) and (c)). Analytical non-denaturing SEC-HPLC was carried out using a Shodex KW804 or TSK G4000PWXL (Tosohaas) in 20 mM phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl, at a flow rate of 1.0 mL/minute (optionally Superdex 200 7.8 mm X 30 cm, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). Pegylation greatly increases the hydrodynamic volume of the protein resulting in a shift to an earlier retention time. In the 30K mPEG maleimide plus (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixtures, a small peak was observed corresponding to residual unmodified (E10C)hPYY₃₋₃₆, as well as new peaks corresponding to pegylated peptide species (Figure 2). New species were observed in the 30K mPEG (D11C)hPYY₃₋₃₆ and branched 43K mPEG (E10C)hPYY₃₋₃₆ reaction mixtures with very little unmodified (D11C)hPYY₃₋₃₆ or (E10C)hPYY₃₋₃₆ remaining (Figure 5 and 8). These pegylated and non-pegylated species were fractionated by SP-Sepharose chromatography, and the resultant purified mono mPEG (E10C)hPYY₃₋₃₆ and mPEG (D11C)hPYY₃₋₃₆ species were subsequently shown to elute as a single peak on non-denaturing SEC > 95% purity, (Figures 6, 7 and 9). The SP-Sepharose chromatography step effectively removed free mPEG, (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ and larger molecular weight species from the monopegylated linear 30K and branched 43K mPEG(E10C)hPYY₃₋₃₆ or mPEG (D11C)hPYY₃₋₃₆.

(D) SDS PAGE

SDS-PAGE (Example 1 (c)) was also used to assess the reaction, cation exchange purification fractions, (Figure 3), and final purified products. SDS-PAGE was carried out on 1 mm thick 10-NuPAGE gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) under reducing and non-reducing conditions and stained using a Novex Colloidal Coomassie™ G-250 staining kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

5

Biological Assays

The utility of the PYY agonists of the present invention as pharmaceutically active agents in the reduction of weight gain and treatment of obesity in mammals (particularly, humans), may be demonstrated by the activity of the agonists in conventional assays and in the *in vitro* and *in vivo* assays described below.

10 Such assays also provide a means whereby the activities of the present PYY agonists can be compared with the activities of known compounds.

Food Intake Studies

Fasting-induced refeeding assay: C57BL/6J male mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were housed 2 per cage. They were maintained on a 12:12 light:dark cycle (lights on at 5:00 AM, lights off at 5:00 PM), fed pelleted RMH3000 Purina rodent chow (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ), and allowed water ad lib. The mice arrived at 7-8 weeks of age and were acclimated a minimum of 10 days prior to study. On the day of study, mice were 9-12 weeks old. The day prior to starting the study, the mice were placed into cages with fresh bedding and no food, but allowed free access to water. They were fasted overnight (20-24 hrs). The day of the study, mice were dosed IP injection (dose volume = 5 mL/kg), returned to their cage, and pre-weighed food was immediately placed in the cage. The dosing vehicle used was 20 mM Na acetate, pH 4.5, 50 mM NaCl and dose was calculated for the active PYY entity without pegylation. Vehicle control, native PYY, 30K mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆, and 43K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ at three doses (0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, and 1.0 mg/kg) were tested. Food was reweighed at 2, 4, 6, and 24 hours post-dosing. Bedding was checked for spillage, which was weighed and included in the calculations. Cumulative food intake was calculated by subtracting the food weight at each time point from the starting food weight. Percent (%) inhibition was calculated by $(FI_{\text{treat}} - FI_{\text{veh}})/FI_{\text{veh}} * 100$.

Figure 10 shows the 6-hour cumulative intake following the IP injection the three doses of native PYY₃₋₃₆ (Figure 10A) and the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (Figure 10B). Both native PYY₃₋₃₆ and the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ demonstrated a dose-dependent decrease in cumulative food intake over the course of 6 hours.

The 43K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ also produced a dose dependent decrease in 6 hour (Figure 11A) and 24 hour (Figure 11B) cumulative food intake. However, the 43K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ effect to reduce cumulative food intake was not as great as that demonstrated by the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ at the same dose (0.1 mg/kg) after both 6 hours and 24 hours.

The effects of 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ on fasting-induced refeeding following injection of 0.1 mg/kg (SC) were also compared to the effects of 30K maleimide(D11C)hPYY₃₋₃₆. While the 30K mPEG maleimide(D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide did cause reduced cumulative food intake (FI) over the 24 hour time course, as shown in the table below, the effect was not as great as that observed for the 30K

6

maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆.

<u>Treatment</u>		<u>2hr FI</u>	<u>% change</u>	<u>4hr FI</u>	<u>% change</u>	<u>6hr FI</u>	<u>% change</u>	<u>24hr FI</u>	
Vehicle	Mean	2.03	0.00	2.93	0.00	4.06	0.00	10.79	0.00
	SEM	0.16	8.06	0.22	7.46	0.46	11.30	0.67	6.23
E10C	Mean	1.89	-6.99	2.16	-26.21	2.45	-39.62	8.04	-25.48
	SEM	0.27	13.45	0.27	9.09	0.26	6.33	0.88	8.14
D11C	Mean	2.14	5.22	2.56	-12.56	3.09	-24.02	9.08	-15.88
	SEM	0.15	7.30	0.23	7.72	0.27	6.68	0.42	3.88

The effects of linear 20K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ were compared to 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (both of Example 1). In one study in which a dose of 0.1 mg/kg (IP) was injected in male mice, the results are as follows in the table below.

% change in cumulative food intake
versus vehicle-treated

Treatment	2hr FI	4hr FI	6hr FI	24hr FI	48hr FI
30K E10C	-56	-65	-78	-47	-20
20K E10C	-65	-73	-79	-36	-17

Similarly, in a second study comparing the feeding effects of linear 20K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆, following a 0.1 mg/kg dose (SC), the results are as follows in the table below.

% change in cumulative food intake
versus vehicle-treated

Treatment	2hr FI	4hr FI	6hr FI	24hr FI	48hr FI	72hr FI
30K E10C	-13	-24	-29	-20	-12	-2
20K E10C	-45	-55	-58	-28	-14	-5

Plasma PYY concentrations following SC injection were as follows.

Treatment	2hr	4hr	6hr	24hr	30hr	48hr
30K E10C	151±58	204±48	308±29	139±27	79±14	40±6
20K E10C	110±21	186±37	204±14	62±16	45±12	13±3

Spontaneous food intake assay: C57BL/6J male mice (The Jackson Laboratory) were individually housed and allowed 2 weeks acclimation before the study. They were maintained on a 12/12 light/dark cycle, fed powdered chow ad lib, and allowed free access to water. On the day before dosing, the mice were

62

placed in food intake chambers, and allowed 1 day acclimation. The following day, the mice were dosed with IP or subcutaneous (SC) injection just prior to lights out (4:00 PM). Food intake was automatically monitored at 10 minute intervals throughout the entire timecourse and body weights were measured daily. Results are shown for IP injection of native PYY₃₋₃₆ and the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (Figure 12) and for SC injection of native PYY₃₋₃₆ and the 30K PEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (Figure 13). While both native PYY₃₋₃₆ and the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ produced an immediate reduction in cumulative food intake as compared to vehicle-treated mice, the reduced food intake effect caused by the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ was of much longer duration than the effect caused by the native PYY₃₋₃₆. Coupled with a more lasting food intake effect, the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ also demonstrated a prolonged plasma exposure following the single injection (0.1 mg/kg, IP) (Figure 14). While native PYY₃₋₃₆ had a clearance rate of 16 ml/min/kg and a C_{max} of 38 nM, the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ had a clearance rate of 0.2 ml/min/kg and C_{max} of 267 nM. Plasma PYY values were measured in mice for using an hPYY radioimmunoassay kit (Linco Research, Inc., St. Louis, MO).

Mini-pump assay with ob/ob mice: Male ob/ob mice (The Jackson Laboratory), 8-9 weeks of age (n=26), were maintained on normal chow and implanted with 14-day osmotic mini-pumps (Alza Corp., Mountain View, CA) which administered either vehicle (saline), PYY₃₋₃₆ (0.1 mg/kg/day), or 30K PEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (0.03 mg/kg/day). Food weights and body weights were measured daily. Body fat composition was determined on day 0 and day 13. Blood samples were taken at the end of the study. There were no significant differences in food intake, body weight, or body fat composition for these groups. Plasma PYY was determined at termination of the study by radioimmunoassay as previously described. In the native PYY₃₋₃₆ treated group, plasma PYY levels were measured at 15±2 ng/ml; in the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ treated group, plasma PYY levels were 132±22 ng/ml.

In vitro binding studies

SPA for ligand binding:

The SPA for ligand binding measures the competitive displacement of radiolabeled PYY from Y2 receptors and utilizes microspheres containing scintillant (SPA beads) coated with lectin wheat germ agglutinin (WGA) obtained from Amersham Biosciences (Cat. No. RPNQ 0085). Suspensions of KAN-TS human neuroblastoma cells that express Y2 receptors on their surface (Fuhlendorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 182-186, 1990) were prepared using a cell harvesting buffer composed of 50 mM Hepes buffer (pH 7.4), 145 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 0.1% BSA, 5% DMSO and Roche protease inhibitors. SPA assays were performed in 96-well format in triplicate using 50,000 cells/well, ¹²⁵I-PYY (40,000 cpm/ well) and SPA beads (0.5mg/well) in assay buffer composed of 50mM Hepes buffer, pH 7.4, 1mM MgCl₂, 2.5mM CaCl₂, 0.1% (w/v) BSA, 0.025% (w/v) bacitracin and 0.025% sodium azide. Test ligands at various concentrations (0.032 to 500nM) were added to the assay mix which was then incubated for 16-24h at room temperature, while shaking. The plates were allowed to stand for one hour and then counted using a MicroBeta[®] Trilux detector (Perkin Elmer, Boston, MA). Results for hPYY₃₋₃₆ and the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ of Example 1 are shown in Figure 15.

**GTPγ [³⁵S] binding assays at NPY Y2R receptors**

The functional assay is a GTPγ [³⁵S] binding assay run in NEN Flashplates (96-well format).

Membranes were prepared from KAN-TS cells as described in Bass et al., *Mol. Pharm.* 50: 709-715, 1990.

- 5 GTPγ [³⁵S] binding assays were performed in a 96 well FlashPlate™ format in duplicate using 100 pM GTPγ [³⁵S] and 10 μg membrane per well in assay buffer composed of 50 mM Tris HCl, pH 7.4, 3 mM MgCl₂, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 20 mM EGTA, 100 mM NaCl, 5 μM GDP, 0.1 % bovine serum albumin and the following protease inhibitors: 100 μg/mL bacitracin, 100 μg/mL benzamidine, 5 μg/mL aprotinin, 5 μg/mL leupeptin. The assay mix was then incubated with increasing concentrations of test compound (6-point concentration
- 10 curve; log dilutions in the range of 10⁻¹² M to 10⁻⁵ M) for 60 min. at 30° C. The FlashPlates™ were then centrifuged at 2000Xg for 10 minutes. Stimulation of GTPγ [³⁵S] binding was then quantified using a Microbeta™ detector. EC₅₀ and intrinsic activity calculations calculated using Prism by Graphpad. Results for hPYY₃₋₃₆ and the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ of Example 1 are shown in Figure 16. EC₅₀ values for the 30K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ and the 20K mPEG maleimide(E10C)hPYY₃₋₃₆ of Example 1
- 15 were comparable (e.g., 4.3 nM and 4.6 nM when measured in the same assay).

60

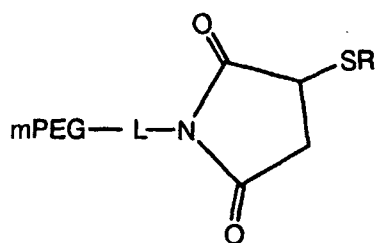
Claims

1. The polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ having the amino acid sequence
 5 IKPEAPGCDASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID No.:3]
 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. The polypeptide (D11C)hPYY₃₋₃₆ having the amino acid sequence
 10 IKPEAPGECASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID No.:4]
 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

3. A conjugate comprising a polyethylene glycol (PEG) and the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆
 or (D11C)hPYY₃₋₃₆.

15 4. The conjugate of claim 3 having Formula 3



3

wherein the PEG is methoxy PEG and is linear or branched and has a weight average molecular weight in the range of about 1 kD to 50 kD,

20 L is a group of the formula



in which each of p and r independently is an integer from 1 to 6,

or L is a group of the formula



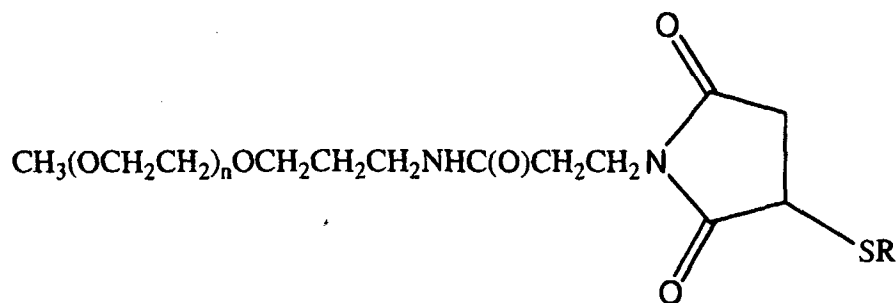
25 In which s is an integer from 1 to 6, and

-SR is the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ or (D11C)hPYY₃₋₃₆ in which the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group.

5. The conjugate of claim 4 wherein the mPEG is linear.

30

6. The conjugate of claim 5 having Formula 4

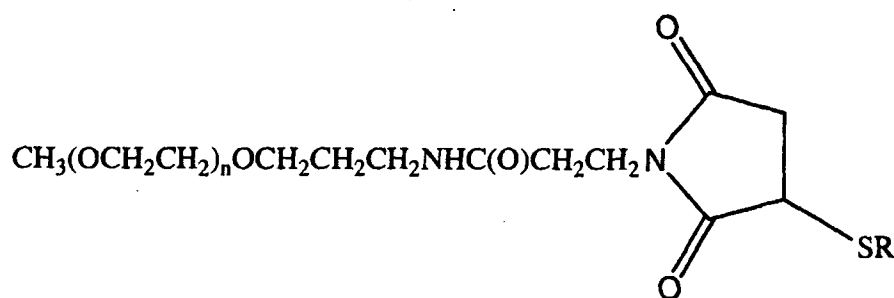
4

wherein n is an integer in the range of about 600 to 750 and $-\text{SR}$ is the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ in which the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group.

5

7. The conjugate of claim 6 wherein the $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ moiety has a weight average molecular weight of about 30 kD.

8. The conjugate of claim 5 having Formula 4

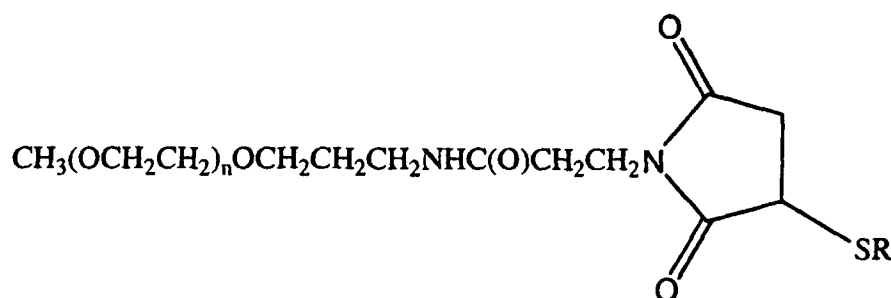
4

wherein n is an integer in the range of about 375 to 525 and $-\text{SR}$ is the polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ in which the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group.

10

9. The conjugate of claim 8 wherein the $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ moiety has a weight average molecular weight of about 20 kD.

10. The conjugate of claim 5 having Formula 4

4

wherein n is an integer in the range of about 600 to 750 and $-\text{SR}$ is the polypeptide (D11C)hPYY₃₋₃₆ in which

20

66

the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group.

11. The conjugate of claim 10 wherein the $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ moiety has a weight average molecular weight of about 30 kD.

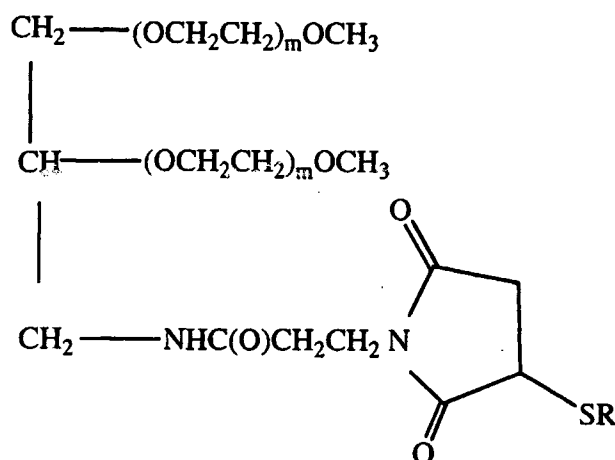
5

12. The conjugate of claim 4 wherein the mPEG is branched.

13. The conjugate of claim 12 wherein the mPEG is a glycerol-branched.

10

14. The conjugate of claim 13 having Formula 5

5

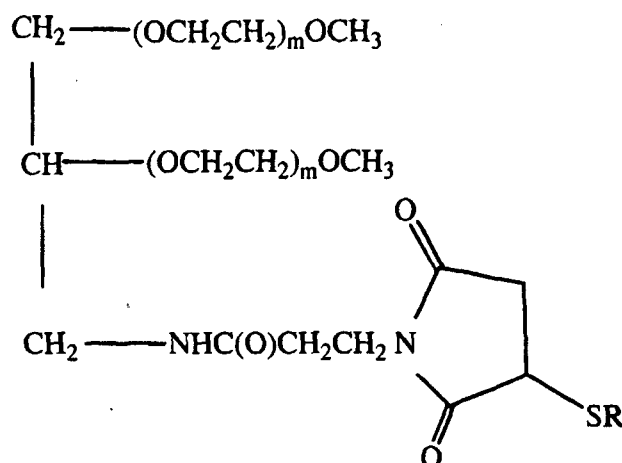
15 wherein each m is approximately the same and is an integer in the range of about 450 to 500 and -SR is the (E10C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide in which the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group.

15. The conjugate of claim 14 wherein each $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ moiety has a weight average molecular weight in the range of about 20 kD to 22 kD.

20

16. The conjugate of claim 13 having Formula 5

67

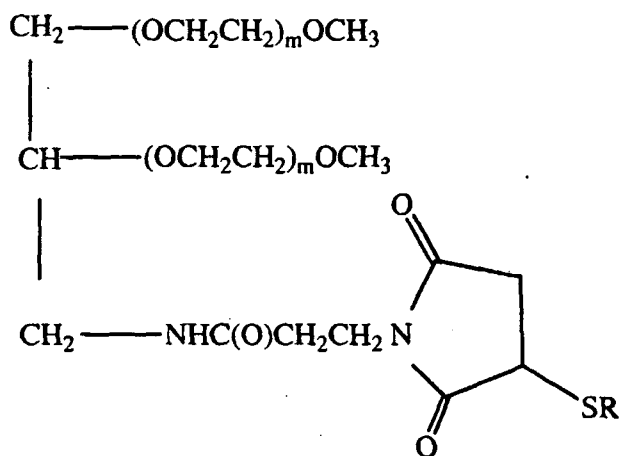
5

wherein each m is same and is an integer in the range of about 450 to 500 and -SR is the (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide in which the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group.

5

17. The conjugate of claim 16 wherein each (OCH₂CH₂)_m moiety has a weight average molecular weight in the range of about 20 kD to 22 kD.

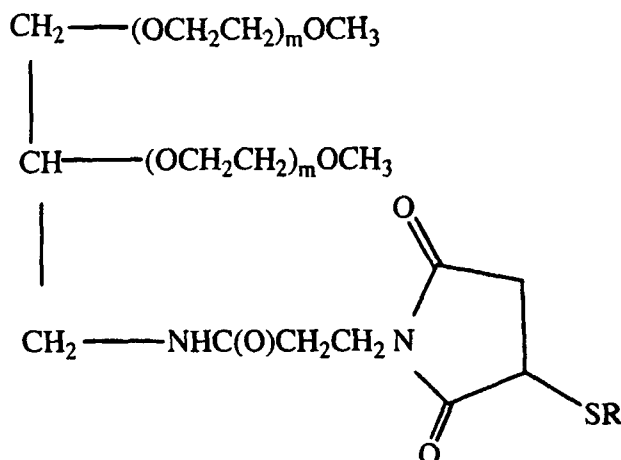
18. A glycerol-branched 43k mPEG maleimide (E10C)hPYY₃₋₃₆ conjugate having Formula 5

5

wherein each m is approximately the same and -SR is the (E10C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide in which the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

10

15 19. A glycerol-branched 43k mPEG maleimide (D11C)hPYY₃₋₃₆ conjugate Formula 5



5

wherein each m is approximately the same and $-\text{SR}$ is the (D11C)hPYY₃₋₃₆ polypeptide in which the S is the sulfur atom of the cysteine thiol group, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5

20. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide of claim 1 or 2 or the conjugate of any one of claims 3-19 or a pharmaceutically acceptable salt thereof and a pharmaceutically acceptable carrier.

10

21. The pharmaceutical composition of claim 20 further comprising a second agent that is an anti-obesity agent.

15

22. A method of treating obesity or a condition of being overweight in a mammal in need of such treatment, which comprises peripherally administering to the mammal a therapeutically effective amount of the polypeptide of claim 1 or 2 or the conjugate of any one of claims 3-19 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

20

23. A method of inhibiting weight gain, reducing food intake or reducing caloric intake in a mammal which comprises peripherally administering to the mammal an amount of the polypeptide of claim 1 or 2 or the conjugate of any one of claims 3-19 or therapeutically effective a pharmaceutically acceptable salt thereof.

25

24. The method of claim 22 or 23 in which the polypeptide, conjugate or salt is administered in combination with a second agent that is an anti-obesity agent.

25. The use of the polypeptide of claim 1 or 2 or the conjugate of any one of claims 3-19 or a pharmaceutically acceptable salt thereof in the manufacture of a medicament for treating obesity or a condition of being overweight in mammals or for inhibiting weight gain, reducing food intake or reducing caloric intake in a mammal.

69

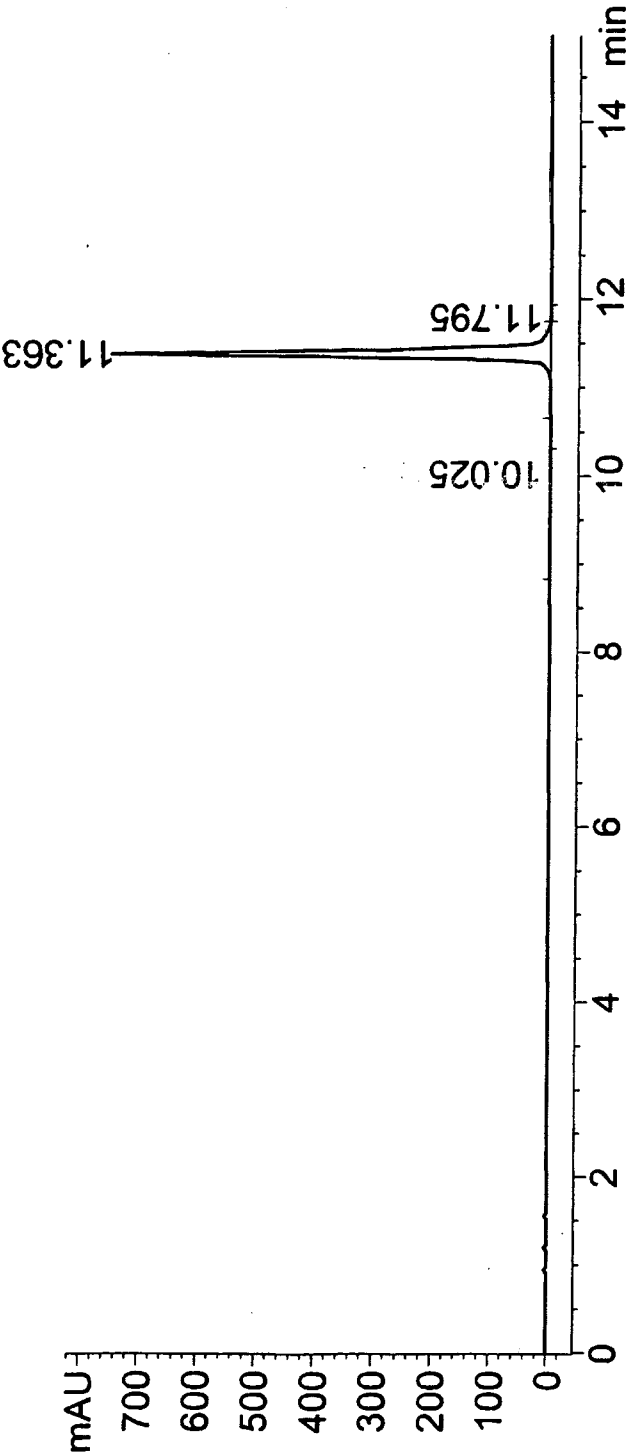
26. A polynucleotide encoding the polypeptide of Claim 1 or 2.

27. A monoclonal antibody that specifically binds to a polypeptide comprising the amino acid
5 sequence as shown in SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4.

28. The monoclonal antibody of claim 27, wherein said polypeptide is pegylated at the cysteine
residue.

Handwritten signature

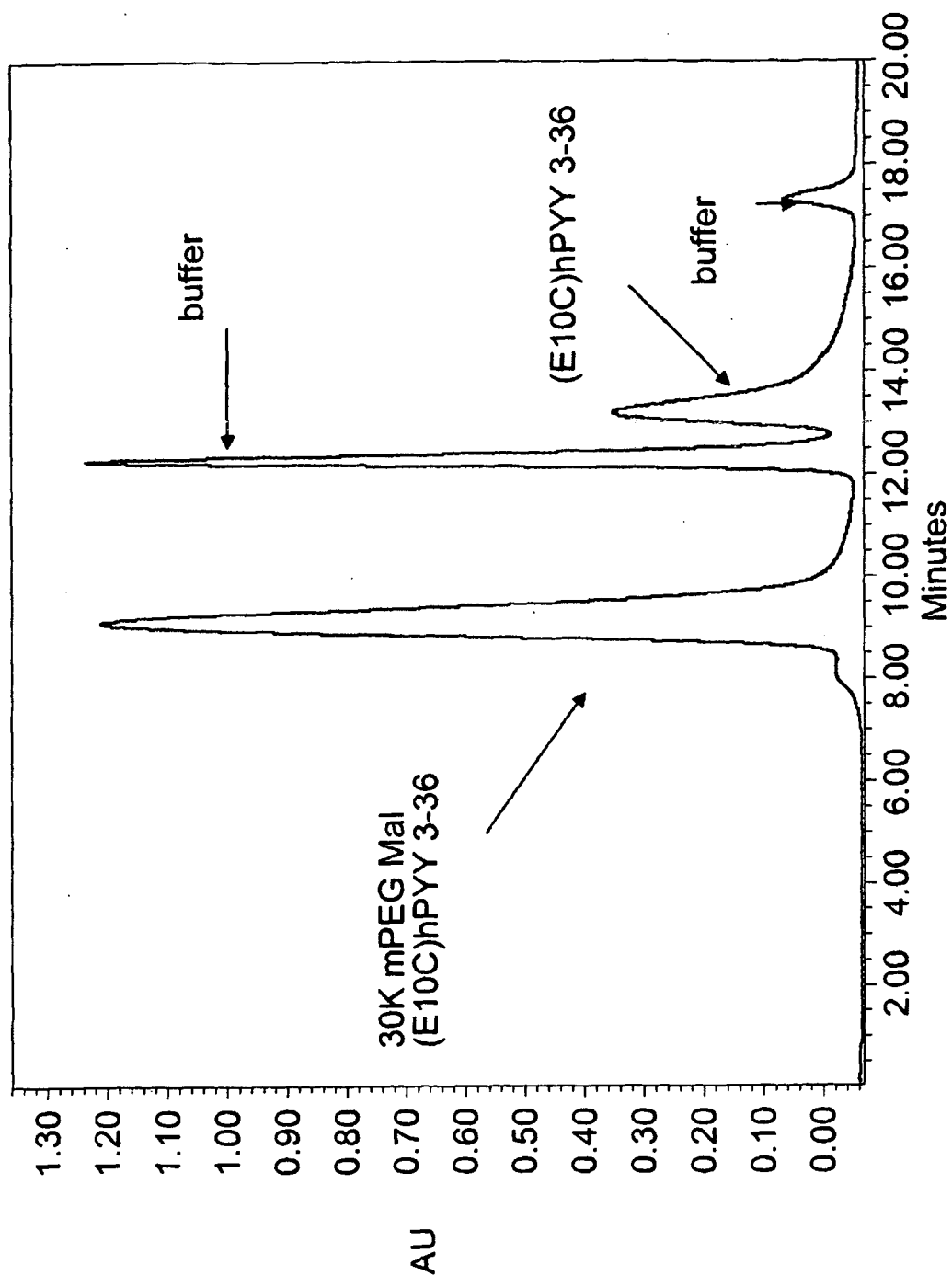
FIG. 1



71

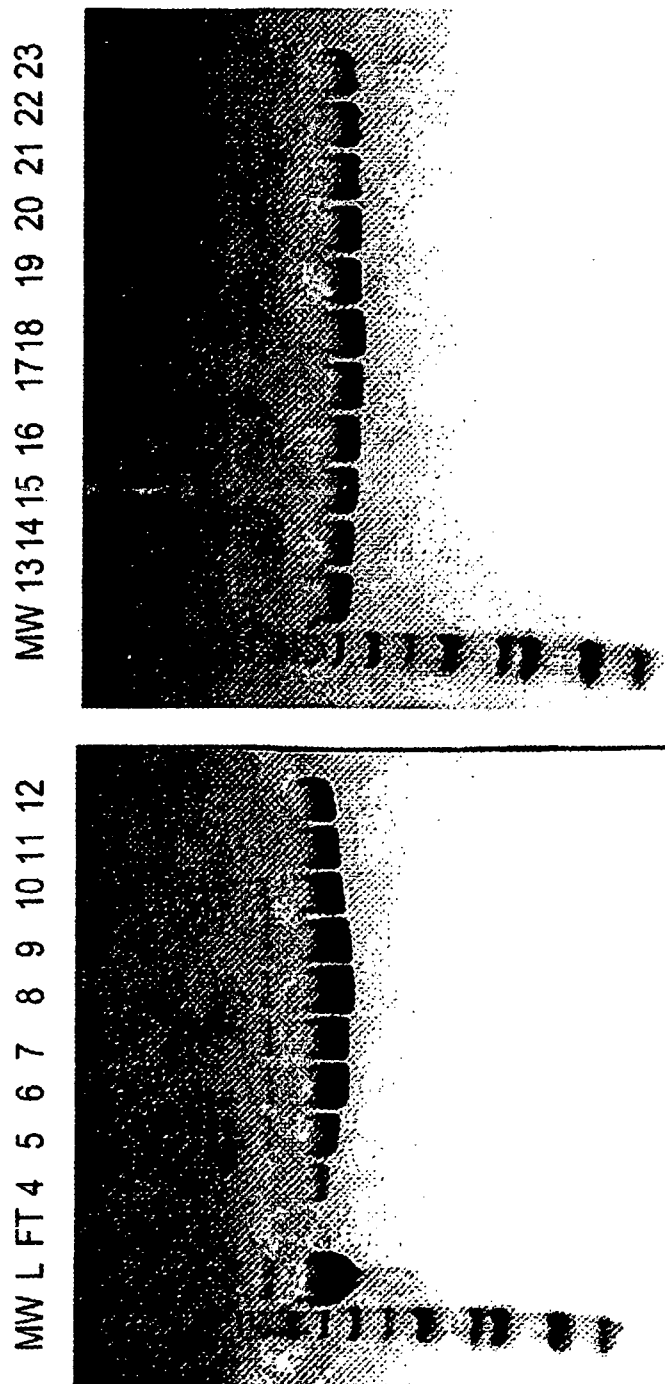
2/16

FIG. 2



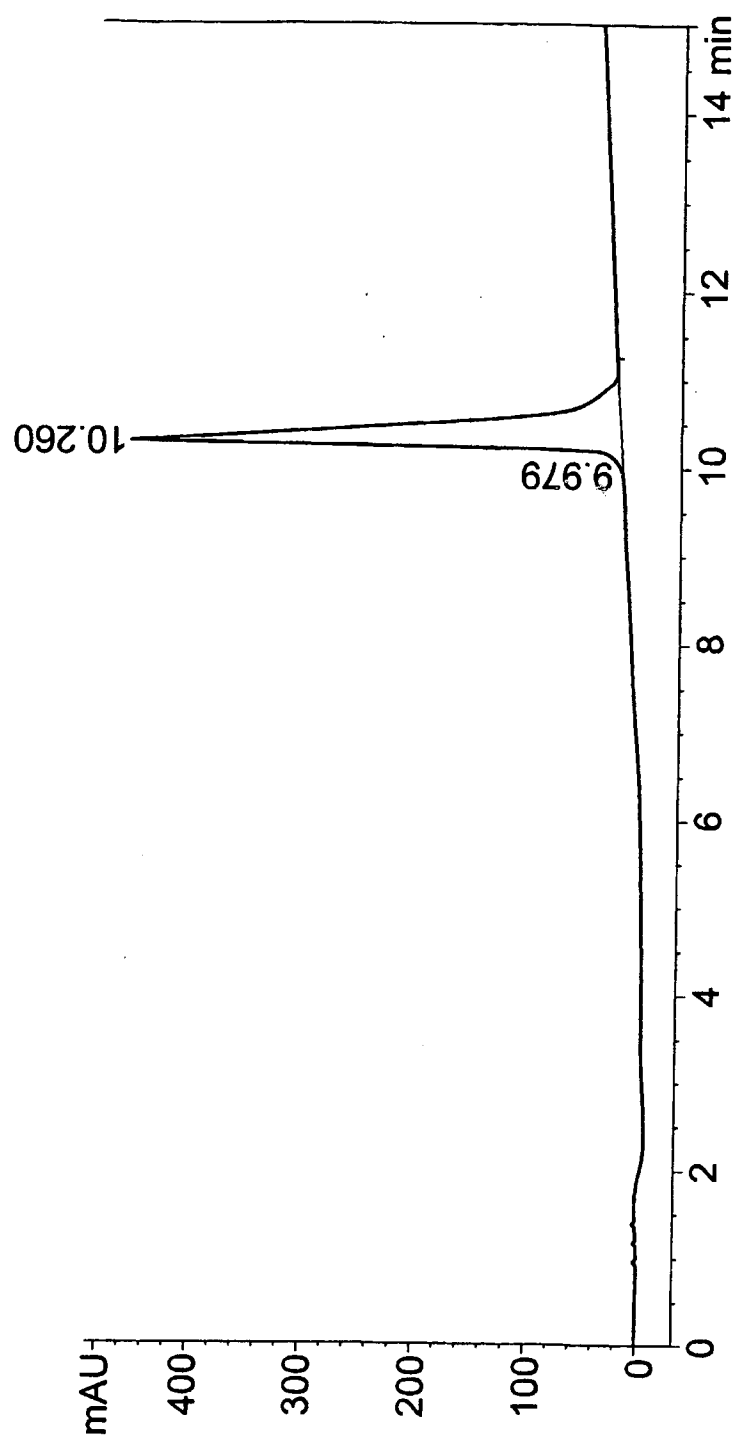
72

FIG. 3



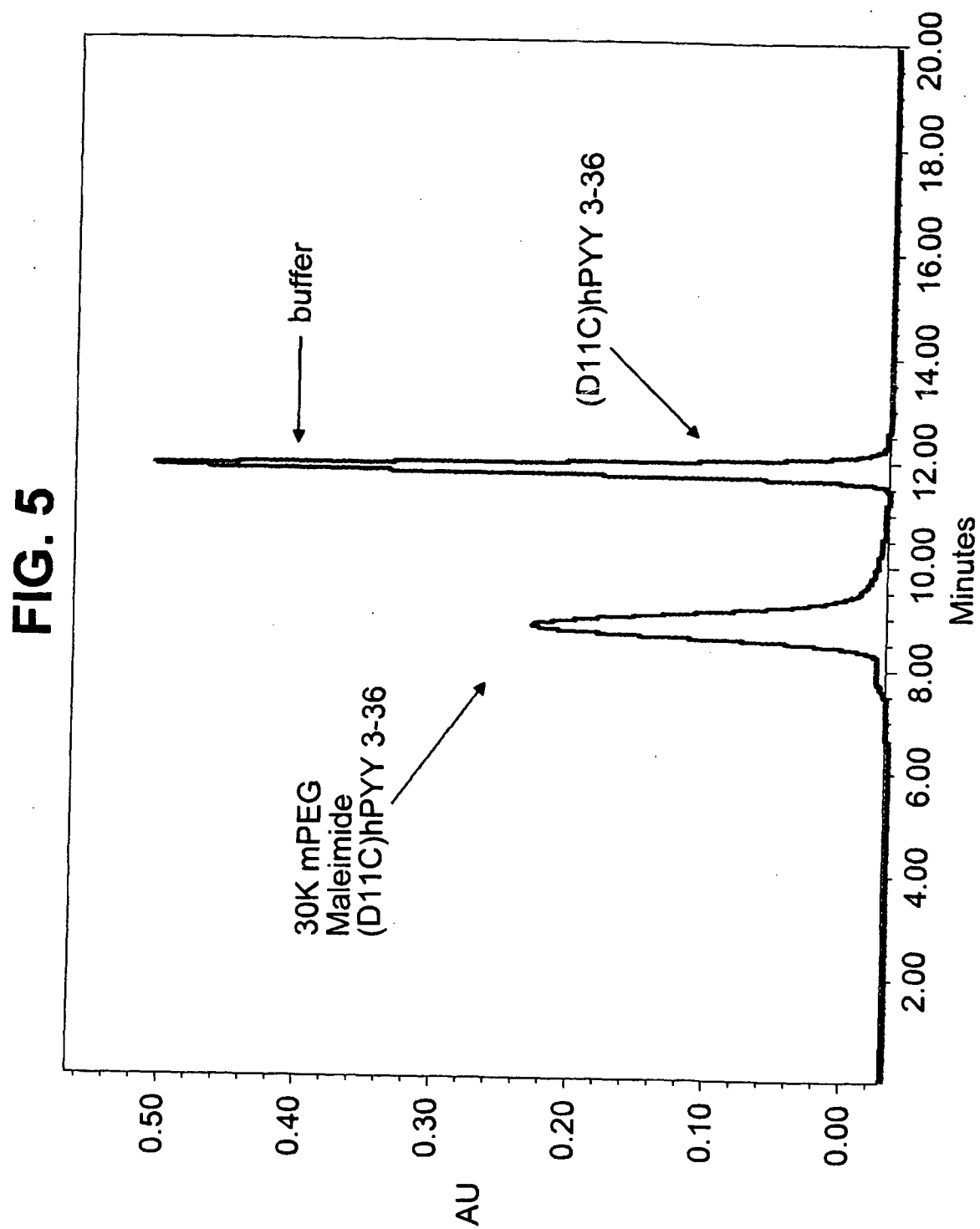
23

4/16

FIG. 4

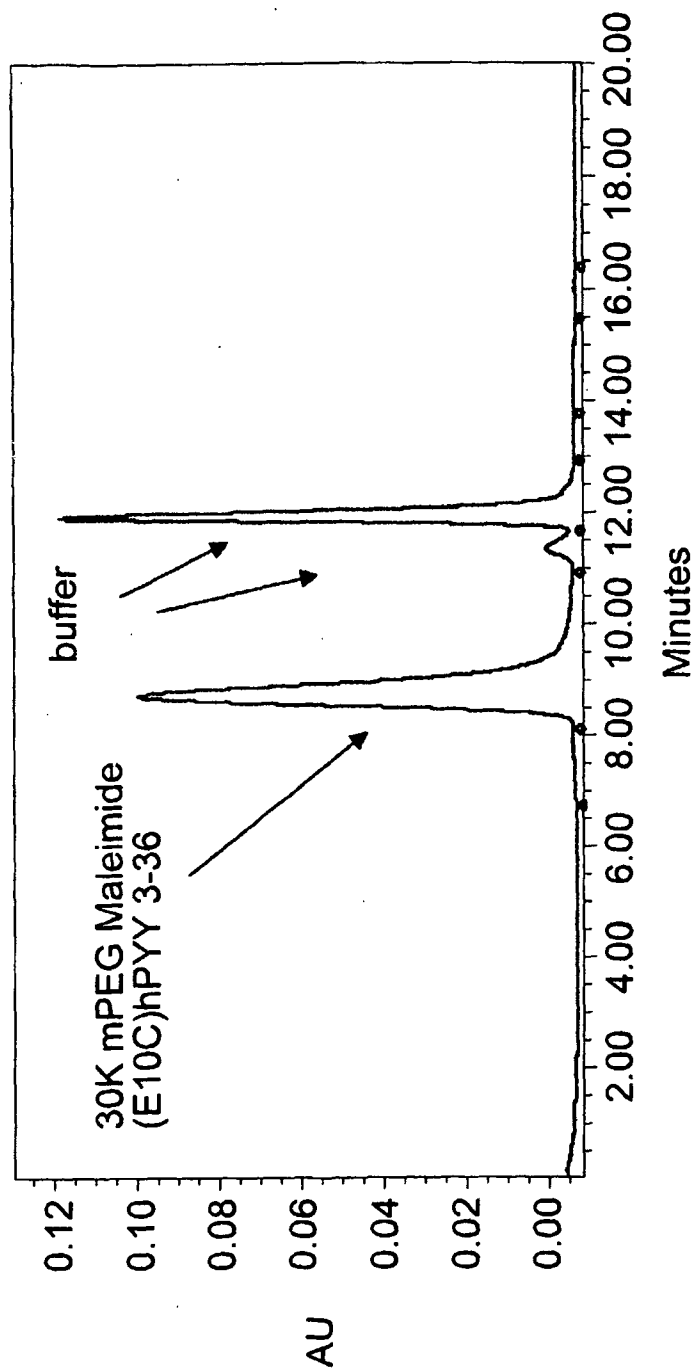
24

5/16



6/16

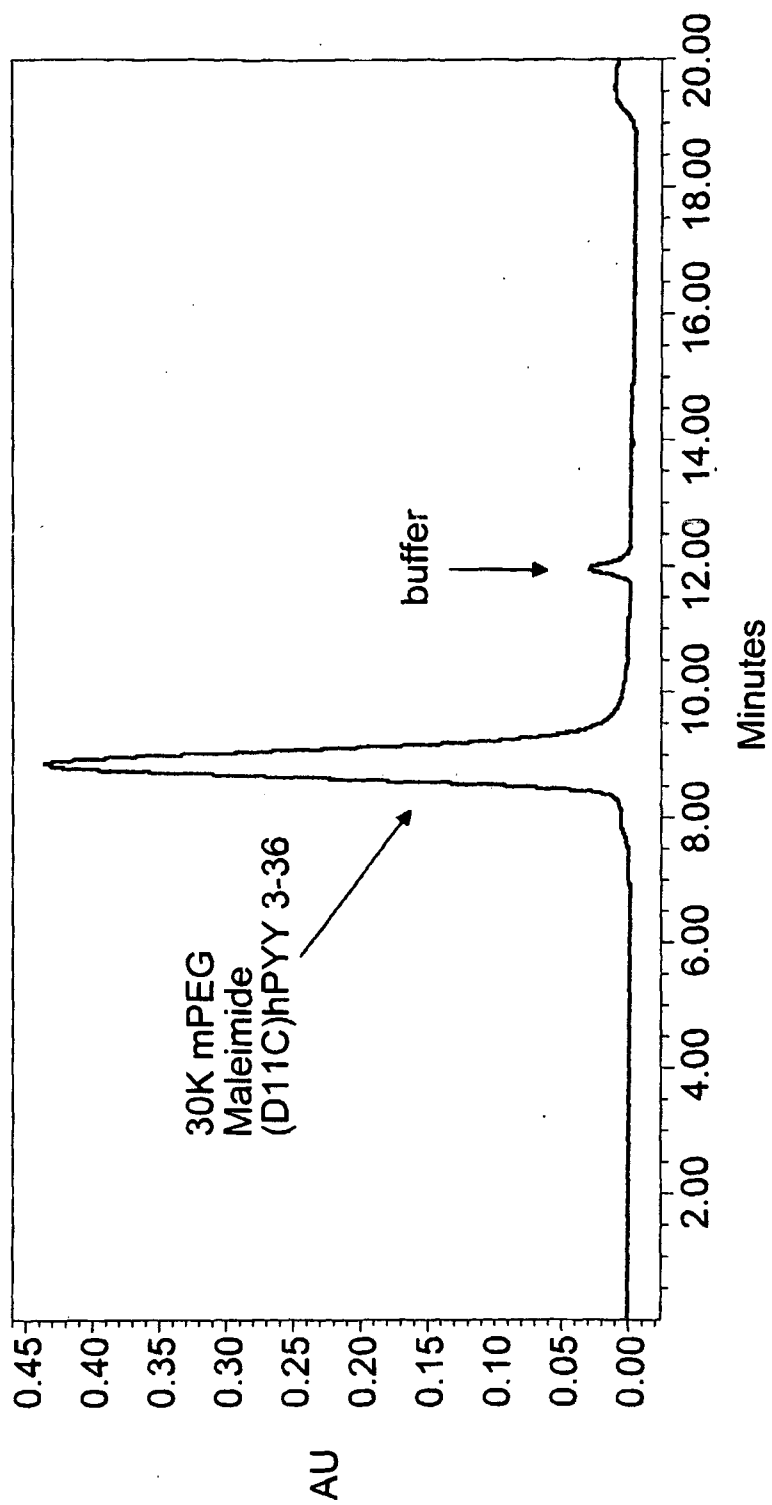
25

FIG. 6

26

7/16

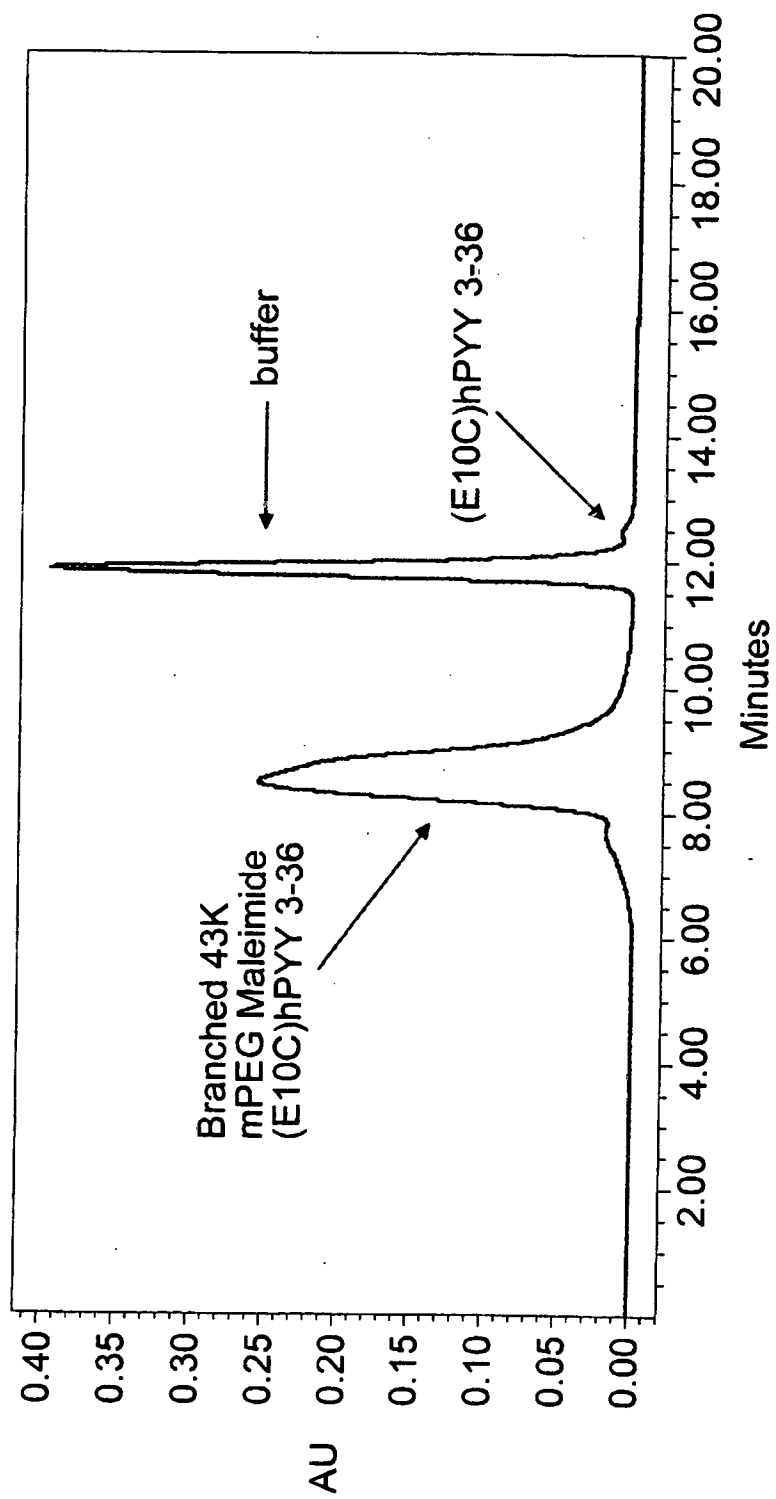
FIG. 7



8/16

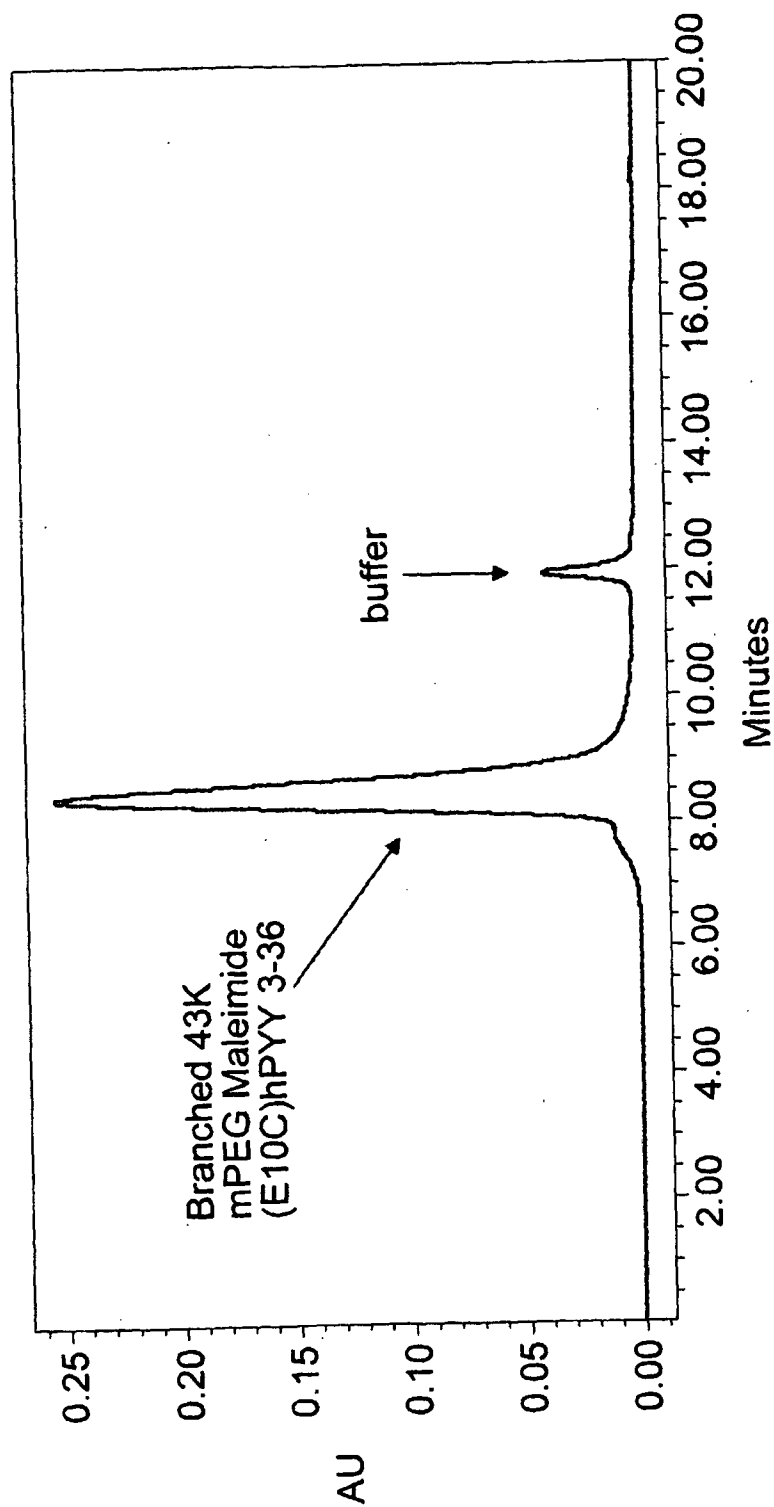
22

FIG. 8



9/16

28

FIG. 9

29

10/16

FIG. 10B

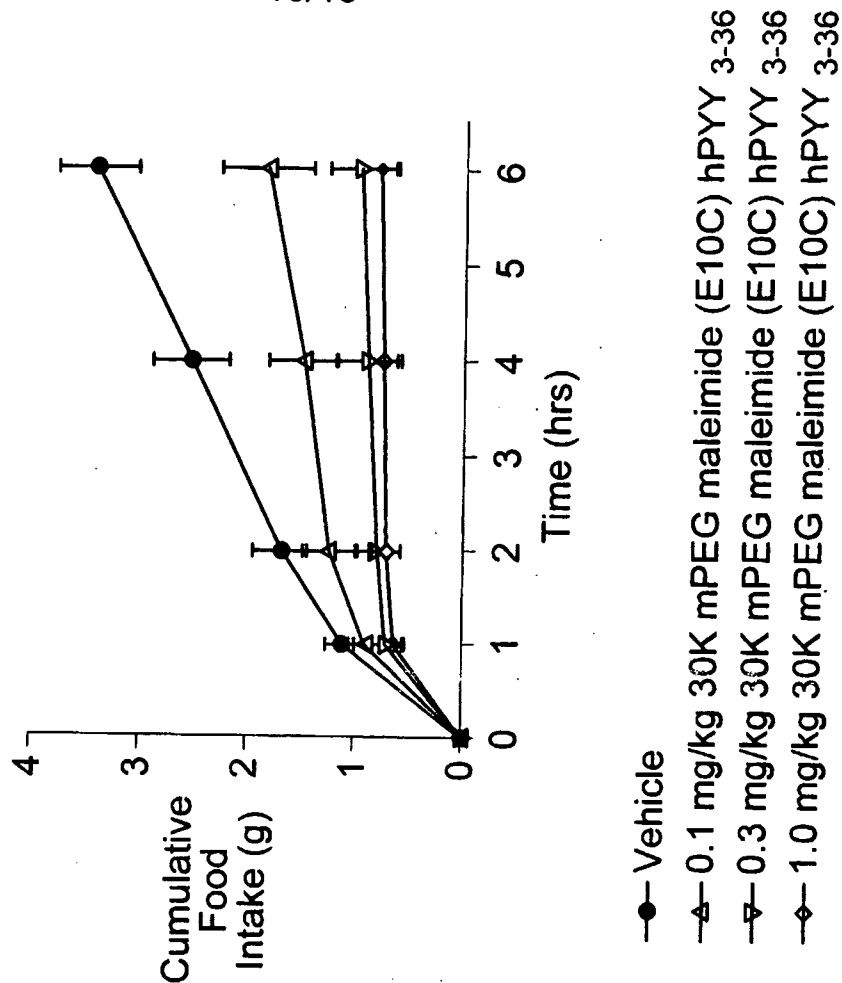
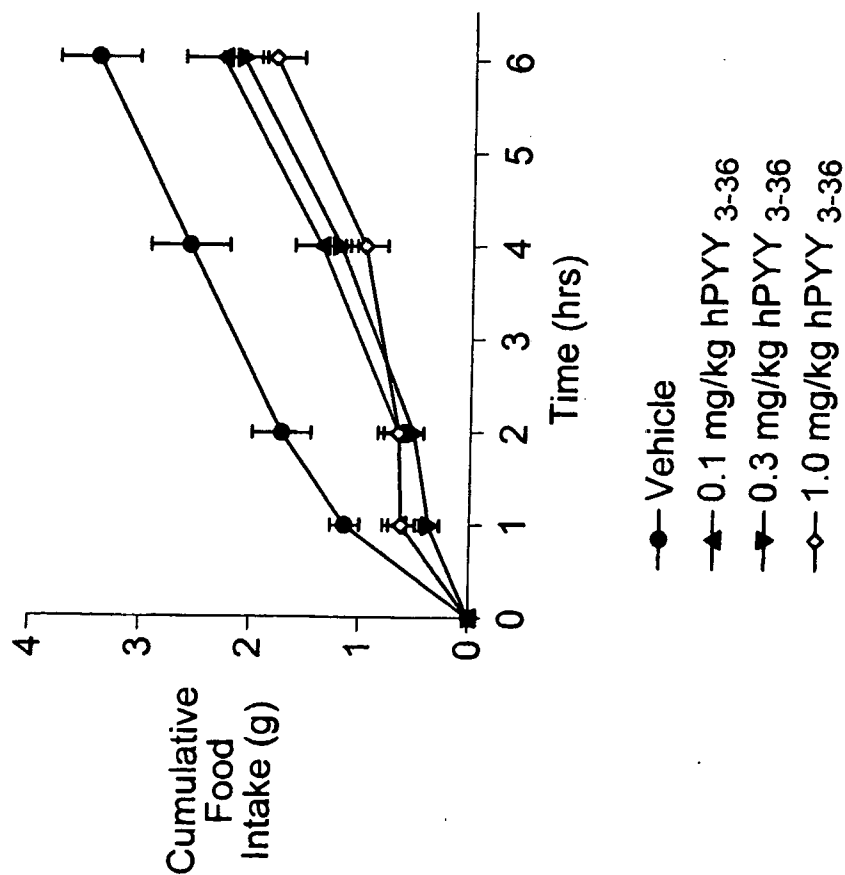


FIG. 10A



86

FIG. 11A

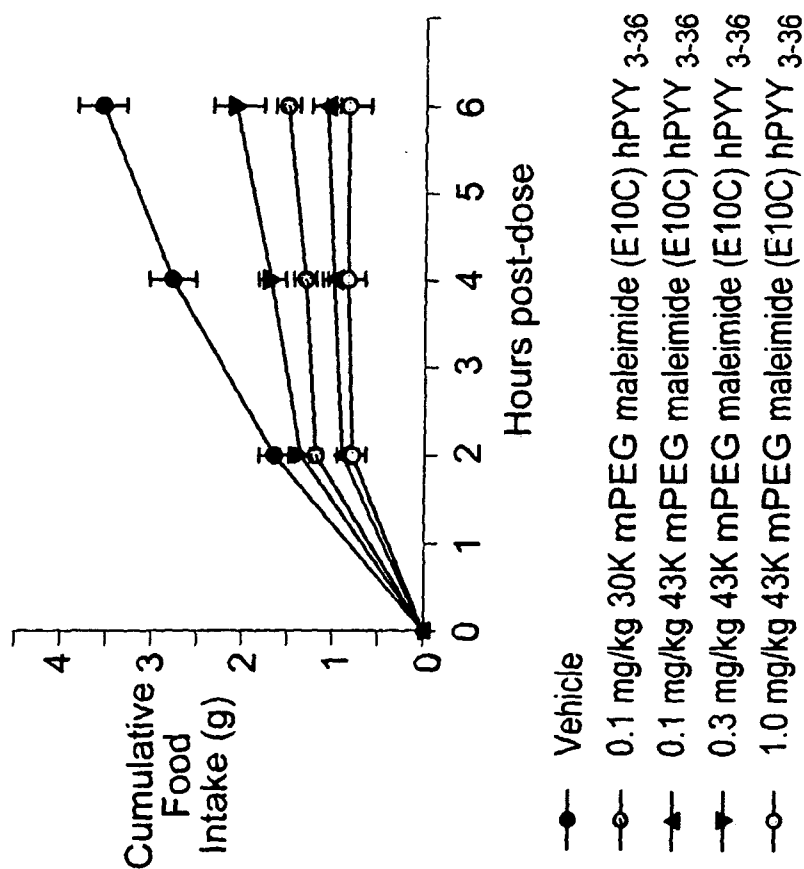
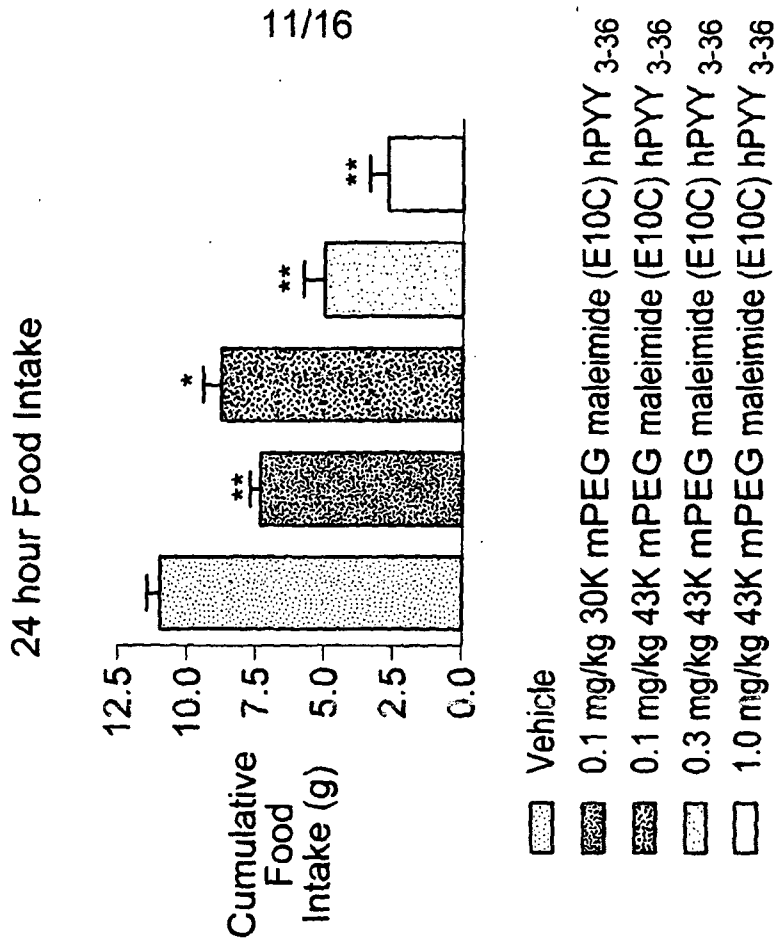


FIG. 11B



12/16

FIG. 12B

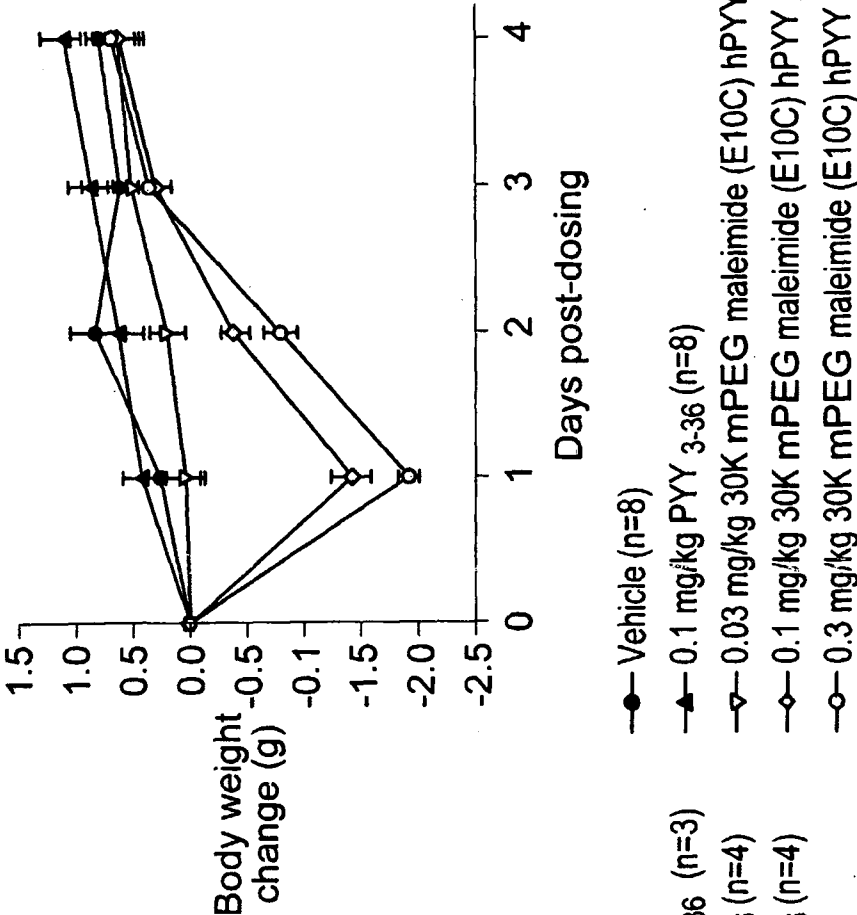
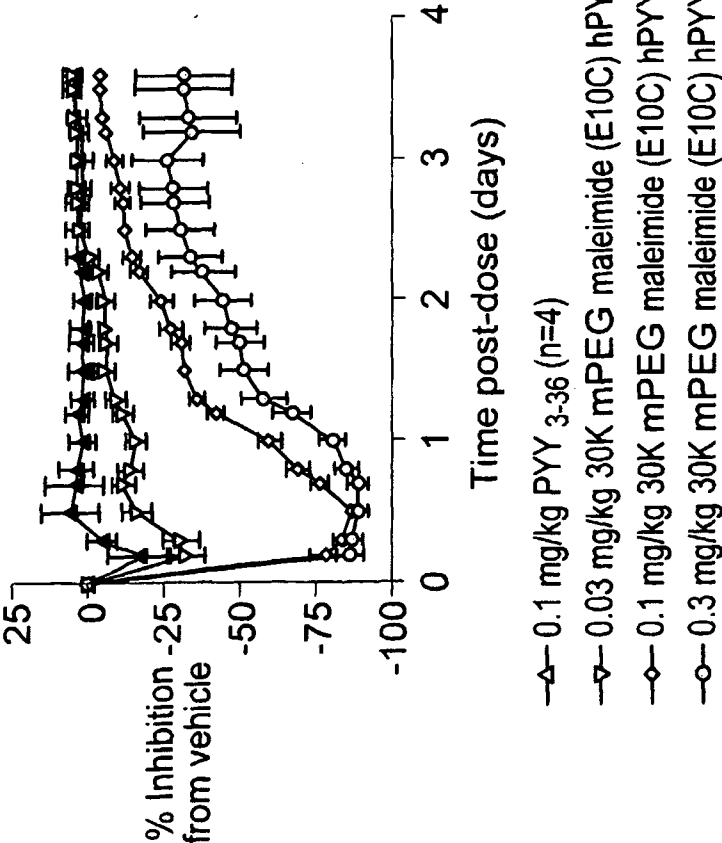


FIG. 12A



97

82

FIG. 13A

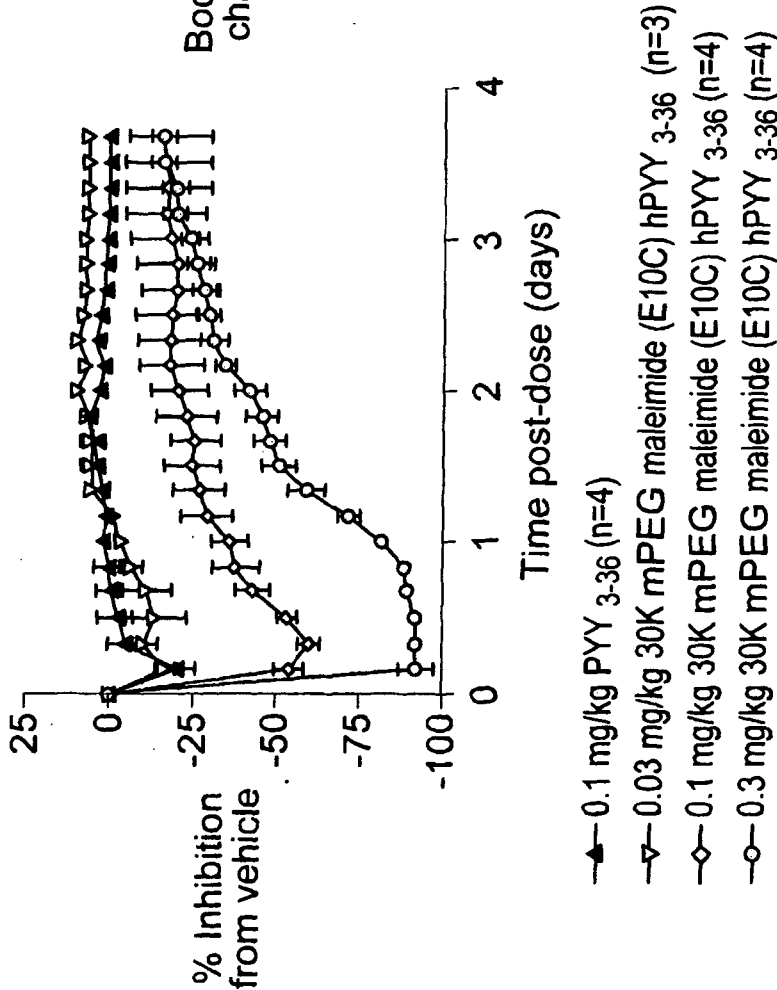
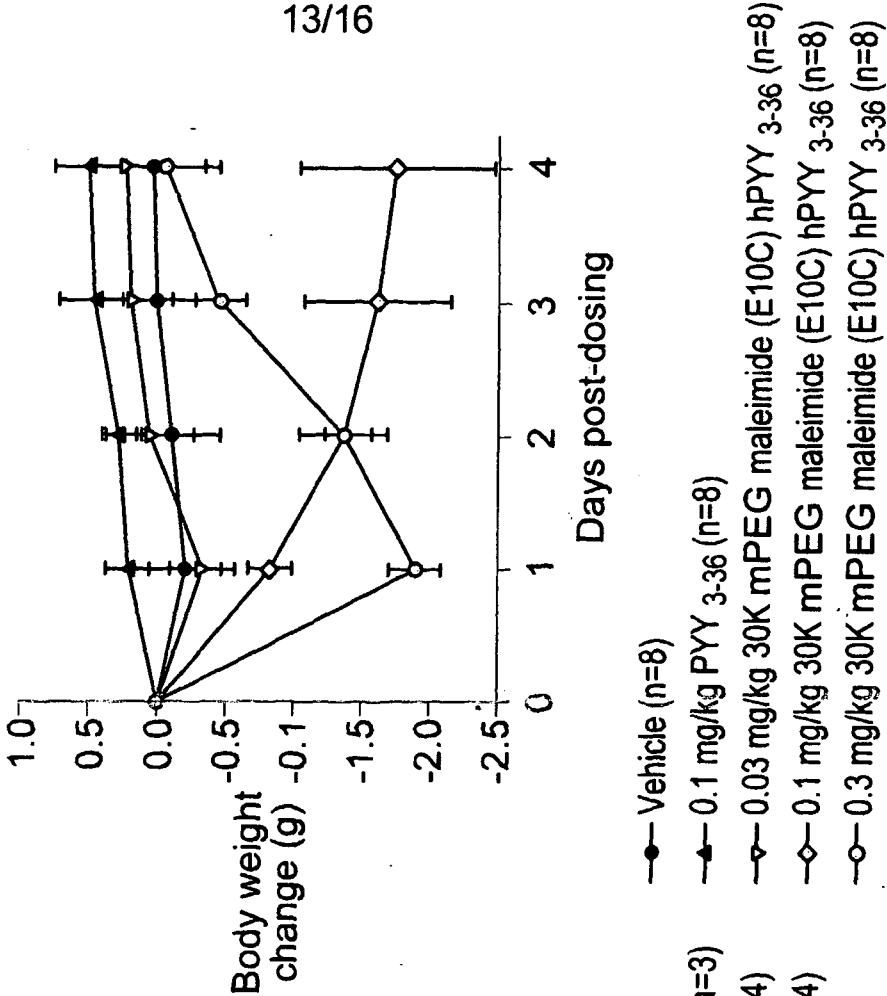


FIG. 13B



28

14/16

FIG. 14B

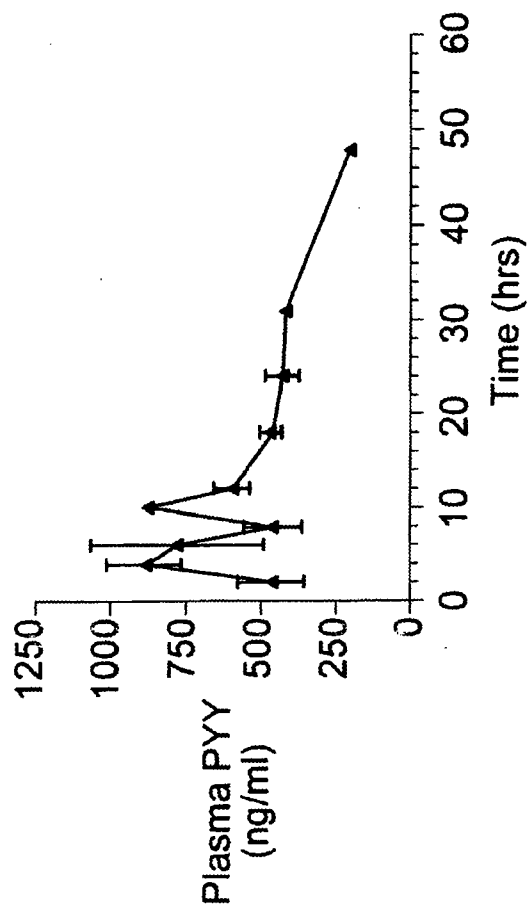
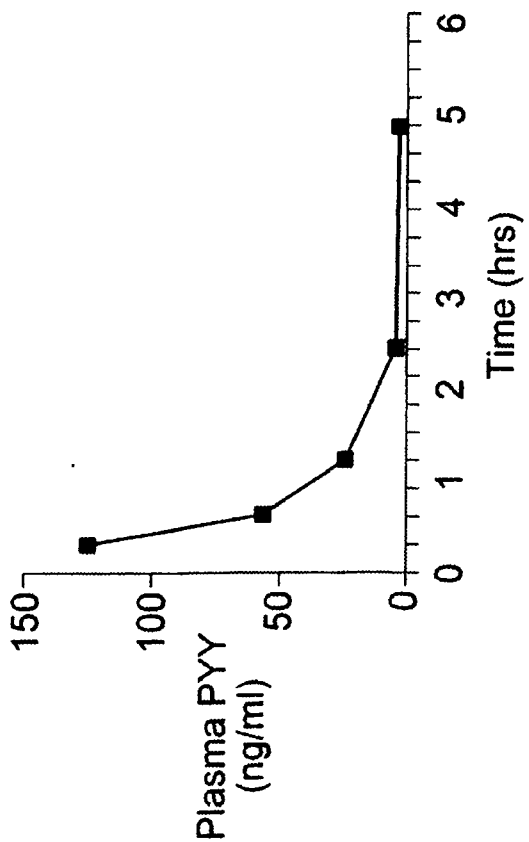
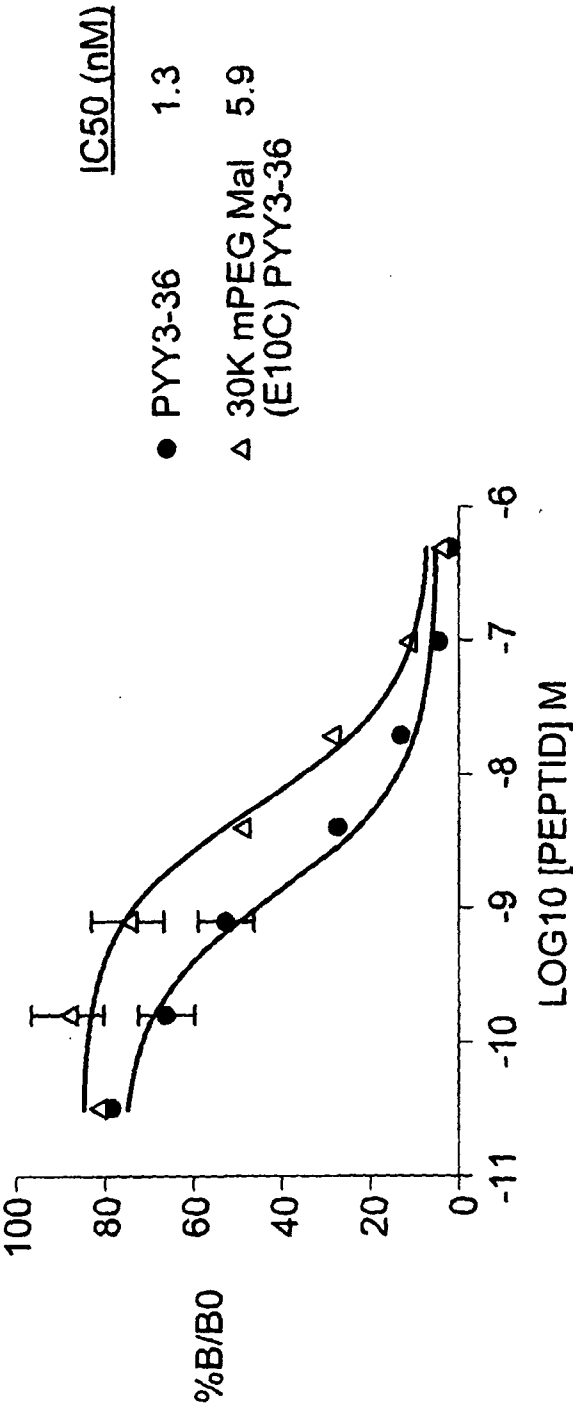


FIG. 14A



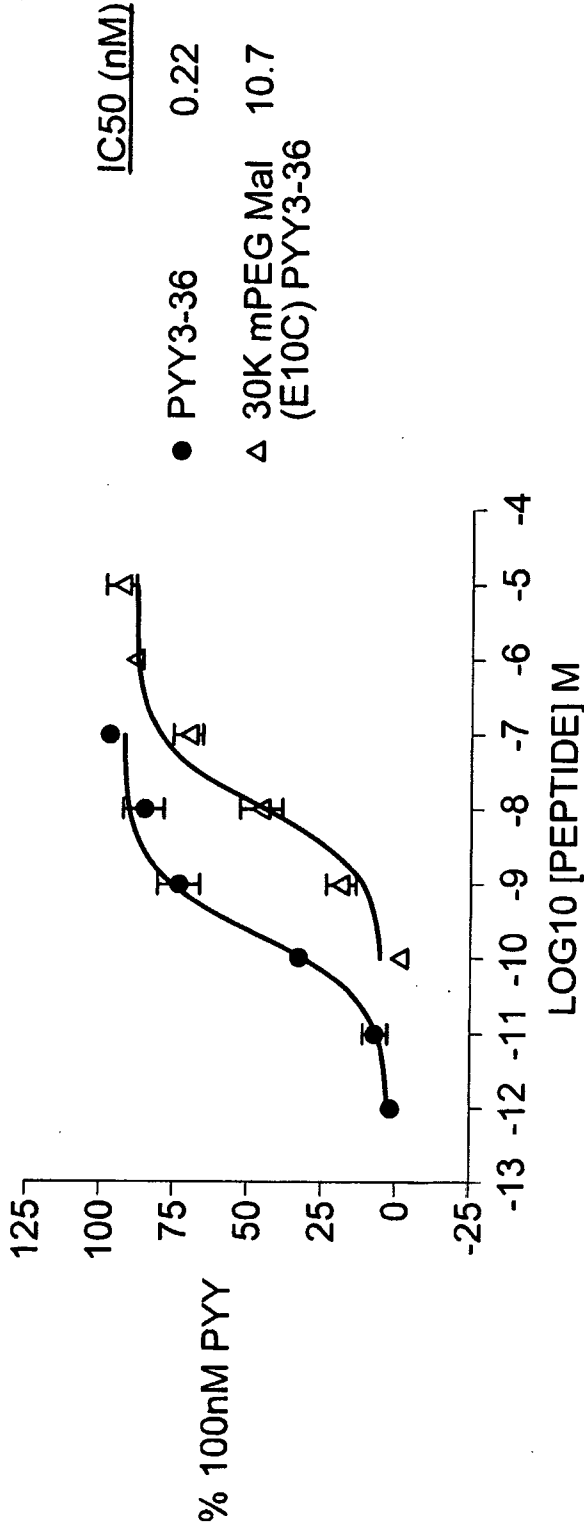
89

FIG. 15



85

FIG. 16



036

PC32768B FF SEQUENCE.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> PFIZER PRODUCTS INC
Summers, Neena L.
Finn, Rory F.
Siegel, Ned R.

<120> PYY AGONISTS AND USES THEREOF

<130> PC32768B

<150> US 60/650,366

<151> 2005-02-04

<150> US 60/733,656

<151> 2005-11-04

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
1 5 10 15

Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
20 25 30

Arg Gln Arg Tyr
35

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
20 25 30

Arg Tyr

<210> 3

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Cys Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn

PC32768B FF SEQUENCE.ST25.txt

1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 4
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Cys Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 5
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5

atcaaaccg aggtccccg ctgtgacgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60
 tccctgcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcggt at 102

<210> 6
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6

atcaaaccg aggtccccg ctgcgacgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60
 tccctgcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcggt at 102

<210> 7
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7

atcaaaccg aggtccccg cgaatgtgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60
 tccctgcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcggt at 102

<210> 8
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens



PC32768B FF SEQUENCE.ST25.txt

<400> 8

atcaaaccg aggtcccg cgaatgcgc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60

tccctgcgc actacctcaa cctggtcacc cggcagcgg at 102

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/IB2006/000270

89

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/575 A61K38/22 A61K47/48

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)

C07K A61K

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

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

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 April 2003 (2003-04-03) cited in the application the whole document	1-28
A	WO 2004/089279 A (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD; RUBINSTEIN, MENACHEM; SHECHTER,) 21 October 2004 (2004-10-21) cited in the application the whole document	1-28
	----- -/-- -----	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 April 2006

Date of mailing of the international search report

04/05/2006

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Groenendijk, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2006/000270

9/6

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	SHECHTER ET AL: "Reversible PEGylation of peptide YY3-36 prolongs its inhibition of food intake in mice" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 579, no. 11, 25 April 2005 (2005-04-25), pages 2439-2444, XP005344451 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2006/000270

Box 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:

Although claims 22-24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2006/000270

012

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03026591	A	03-04-2003	BR 0212985 A	30-08-2005
			CA 2461345 A1	03-04-2003
			CN 1596119 A	16-03-2005
			EP 1499277 A2	26-01-2005
			JP 2005508324 T	31-03-2005
			MX PA04002751 A	08-09-2005
WO 2004089279	A	21-10-2004	NONE	

REVISED

93

PC32768A

- 1 -

AGONISTAS DE PYY Y SUS USOS

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud no provisional reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. número 60/650,366, presentada el 4 de febrero de 2005 y la solicitud provisio-
5 nal de EE.UU. 60/733,656, presentada el 4 de noviembre de 2005.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a agonistas de PYY, más particularmente a variantes de PYY₃₋₃₆ y a derivados pegilados de PYY₃₋₃₆ y variantes de PYY₃₋₃₆, a com-
10 posiciones que contienen dichos agonistas, a ácidos nucleicos aislados que codifican dichos agonistas de PYY y al uso de dichos agonistas o composiciones en el trata-
miento de la obesidad y sus co-morbididades o a la disminución del apetito, la ingesta de alimento o la ingesta calórica en un mamífero.

Antecedentes de la invención

La obesidad es una importante preocupación de salud pública debido a su creciente prevalencia y a los riesgos sanitarios asociados a ella. Además, la obesidad puede afectar la calidad de vida de las personas a causa de su limitada movilidad y
15 disminución de la resistencia física, así como a causa de su discriminación social, académica y laboral.

La obesidad y el sobrepeso se definen generalmente por el índice de masa corporal (abreviadamente BMI por la expresión inglesa *body mass index*), que está relacionado con la grasa corporal total y sirve como medida del riesgo de ciertas en-
25 fermedades. El BMI se calcula dividiendo el peso en kilogramos por la altura en metros cuadrados (kg/m²). El sobrepeso se define típicamente como un BMI de 25-29,9 kg/m², y la obesidad se define típicamente como un BMI de 30 kg/m² o superior. Véase, por ejemplo, *National Heart, Lung, and Blood Institute, Clinical Guidelines on the Identifica-
tion, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, The Evidence
Report*, Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, NIH publi-
30 cation n° 98-4083 (1998).

Estudios recientes han encontrado que la obesidad y los riesgos de salud asociados a ella no están limitados a adultos, sino que también afectan a niños y ado-
lescentes en un grado alarmante. De acuerdo con el *Center for Disease Control* de EE.UU., el porcentaje de niños y adolescentes a los que afecta el sobrepeso se ha
35 duplicado desde el principio de la década de 1970, y actualmente alrededor del 15 por

ciento de los niños y adolescentes tienen sobrepeso. Los factores de riesgo de enfermedades cardíacas, tales como altos valores del colesterol y la tensión arterial, aparecen con mayor frecuencia en niños y adolescentes con sobrepeso en comparación con sujetos de peso normal de edad similar. También la diabetes tipo 2, considerada anteriormente una enfermedad de adultos, ha aumentado drásticamente en niños y adolescentes. El sobrepeso y la obesidad están estrechamente relacionados con la diabetes tipo 2. Recientemente se ha estimado que los adolescentes con sobrepeso tienen un 70% de probabilidad de llegar a ser adultos con sobrepeso u obesos. La probabilidad aumenta hasta aproximadamente 80% si al menos uno de los padres tiene sobrepeso o es obeso. La consecuencia más inmediata del sobrepeso percibida por los niños es la discriminación social.

Los individuos con sobrepeso u obesos tienen mayor riesgo de enfermedades tales como hipertensión, dislipidemia, diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina), resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, cardiopatía isquémica, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva, ictus, cálculo biliar, colelitiasis, gota, osteoartritis, apnea obstructiva en el sueño y problemas respiratorios, colecistopatía, ciertas formas de cáncer (por ejemplo, endometrial, de mama, de próstata y de colon) trastornos fisiológicos (tales como depresión, trastornos de la alimentación, imagen corporal distorsionada y escasa confianza en sí mismo). Las consecuencias negativas de la obesidad sobre la salud hacen que sea la segunda causa principal de muerte evitable en Estados Unidos produciendo un efecto económico y psicológico significativo sobre la sociedad. Véase, McGinnis M, Foege WH., *"Actual Causes of Death in the United States"* JAMA, 270, 2207-12 (1993).

La obesidad es reconocida actualmente como una enfermedad crónica que requiere tratamiento para reducir los riesgos de salud asociados a ella. Aunque la pérdida de peso es un resultado importante del tratamiento, uno de los principales objetivos del tratamiento de la obesidad es mejorar los índices cardiovasculares y metabólicos para reducir la morbilidad y mortalidad relacionadas con la obesidad. Se ha demostrado que una pérdida de peso corporal de 5-10% puede mejorar sustancialmente los índices metabólicos, tales como glucemia, tensión arterial y concentraciones de lípidos. Por consiguiente, se cree que una reducción deliberada de 5-10% en el peso corporal puede reducir la morbilidad y mortalidad.

Los fármacos que se prescriben usualmente para tratar la obesidad en general reducen el peso disminuyendo la absorción de la grasa alimenticia, como ocurre con el orlistat, o creando un déficit de energía reduciendo la ingesta de alimentos y/o

55
aumentando el gasto de energía, como se observa con la sibutramina. La búsqueda de mejores alternativas a los agentes anti-obesidad actualmente disponibles ha seguido varias vías, una de las cuales se ha centrado en ciertos péptidos del intestino que se cree que están implicados en modular la saciedad, tal como el péptido YY (PYY).

5 El PYY es un miembro de la familia de hormonas polipeptídicas pancreáticas (PP) (junto con PP y el neuropéptido Y (NPY)). Como los otros miembros de la familia, el PYY es un péptido de 36 aminoácidos amidado en el extremo C (carboxilo). Es un péptido endocrino del intestino que se aisló inicialmente del intestino porcino (Tatemoto and Mutt, *Nature*, 285: 417-418, 1980) y posteriormente se describió que reducía en
10 ratas la ingesta de alimentos de alto contenido en grasas después de su administración periférica (Okada et al., *Endocrinology Supplement* 180, 1993) y provocaba la pérdida de peso en ratones después de su administración periférica (Morley and Flood, *Life Sciences* 41:2157-2165, 1987). Se sabe que existen múltiples formas moleculares almacenadas y circulantes de PYY (Chen et al., *Gastroenterology* 87:1332-
15 1338, 1984; y Roddy, et al., *Regul Pept* 18:201-212, 1987). Una de dichas formas, el PYY₃₋₃₆, se aisló de extractos mucosales de colon humano (Eberlein et al., *Peptides* 10:797-803, 1989), y se encontró que era la forma predominante de los PYY en plasma humano postprandial (Grandt et al., *Regul. Pept.* 51:151-159, 1994). Se ha descrito que el PYY₃₋₃₆ era un agonista selectivo del receptor Y2 de NPY de alta afinidad (abreviadamente Y2R por la expresión inglesa *Y2-receptor*) (Keire et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279:G126-G131, 2000). Se ha descrito que la administración periférica de PYY₃₋₃₆ reduce marcadamente la ingesta de alimentos y la ganancia de peso en ratas, disminuye el apetito y la ingesta de alimentos en seres humanos, y disminuye la ingesta de alimentos en ratones, pero no en ratones con el Y2R nulo, lo
20 cual se dijo que sugería que el efecto de ingesta de alimentos requiere el Y2R. En estudios en seres humanos, se encontró que la infusión de PYY₃₋₃₆ disminuía significativamente el apetito y reducía la ingesta de alimentos en 33% durante 24 horas. La infusión de PYY₃₋₃₆ para alcanzar las concentraciones circulatorias postprandiales normales del péptido condujo a los máximos niveles en suero de PYY₃₋₃₆ en 15 minutos, seguido por una disminución rápida hasta los niveles basales en 30 minutos. Se describió que hubo una inhibición significativa de la ingesta de alimentos en el periodo de 12 horas que sigue a la infusión de PYY₃₋₃₆, pero que no había esencialmente efecto sobre la ingesta de alimentos en el periodo de 12 horas a 24 horas. En el estudio en ratas, la administración repetida de PYY₃₋₃₆ IP (inyecciones dos veces al día durante 7
30 días) redujo la ingesta acumulativa de alimentos (Batterham, et al., *Nature* 418:650-
35

ab

654, 2002).

Los fármacos basados en polipéptidos se unen frecuentemente de modo covalente a polímeros, tales como polietilenglicoles para prolongar sus semividas *in vivo*. Sin embargo, esto frecuentemente conduce a drásticas pérdidas de actividad biológica o farmacológica (Shechter et al., *FEBS Letters* 579:2439-2444, 2005; Fuerteges and Abuchowski, *J. Control Release* 11:139-148, 1990; Katre, *Adv. Drug Del. Sys.* 10:91-114, 1993; Bailon and Berthold, *Pharm. Sci. Technol. Today* 1:352-356, 1996; Nucci et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 6, 1991; Delgado et al., *Critical Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9:249-304, 1992; Fung et al., *Polym. Preprints* 38:565-566, 1997; Reddy, *Ann. Pharmacother.* 34:915-923, 2000; Veronese, *Biomaterials* 22:405-417, 2001). Por ejemplo, Shechter et al., *supra*, informaron que la pegilación de PYY₃₋₃₆ con PEG de 40 kD por química estándar, a través de la formación de un enlace estable (PEG de 40 kD -PYY₃₋₃₆), condujo a su completa inactivación en estudios de ingesta de alimentos con ratones (por inyección s.c). También informaron, sin embargo, que la pegilación reversible de PYY₃₋₃₆ (PEG de 40 kD-FMS-PYY₃₋₃₆) dio como resultado un aumento de ocho veces la semivida funcional (24 horas vs. 3 horas). Véanse también las solicitudes de patentes PCT N^{os} WO 2004/089279 y WO 03/026591.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a agonistas del PYY que son variantes de PYY₃₋₃₆.

En un aspecto de la presente invención el agonista de PYY es una variante de un PYY₃₋₃₆ de mamífero, en el cual el residuo 10 (ácido glutámico) o el residuo 11 (ácido aspártico) ha sido remplazado por un aminoácido "X" que se selecciona del grupo que consiste en cisteína, lisina, serina, treonina, tirosina y aminoácidos no naturales, que tienen una funcionalidad que es conjugable con un polímero hidrófilo, tal como polietilenglicol, por ejemplo, una funcionalidad ceto, tiol, hidroxilo, carboxilo, o amino libre, designándose dicha variante (E10X)PYY₃₋₃₆ o (D11X)PYY₃₋₃₆ respectivamente.

El residuo "X" es preferiblemente cisteína, y las correspondientes variantes son por lo tanto (E10C)PYY₃₋₃₆ y (D11C)PYY₃₋₃₆.

En una realización preferida de la presente invención, el agonista de PYY es una variante de PYY₃₋₃₆ humano (hPYY₃₋₃₆), PYY₃₋₃₆ canino, PYY₃₋₃₆ felino o PYY₃₋₃₆ equino, más preferiblemente, hPYY₃₋₃₆.

En una realización preferida de la invención, el agonista de PYY es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆, que tiene la secuencia de aminoácidos:

97

IKPEAPGCDASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:3],
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización más preferida, el agonista de PYY es el polipéptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ que tiene la secuencia de aminoácidos:

5 IKPEAPGECASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:4],
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Más preferiblemente, el agonista es (E10C)hPYY₃₋₃₆.

Los agonistas de PYY de la invención están preferiblemente conjugados con un polímero hidrófilo, preferiblemente un polietilenglicol (PEG). El agonista está prefe-
10 riblemente monopegilado, es decir, la relación entre agonista y PEG es aproximada-
mente 1:1, y está unido a la funcionalidad conjugable, tal como ceto, tiol, hidroxilo, carboxilo o una funcionalidad amino libre, de "X" en (E10X)PYY₃₋₃₆ y (D11X)PYY₃₋₃₆. El PEG puede ser lineal, ramificado o colgante; más preferiblemente, lineal o ramificado; más preferiblemente, lineal.

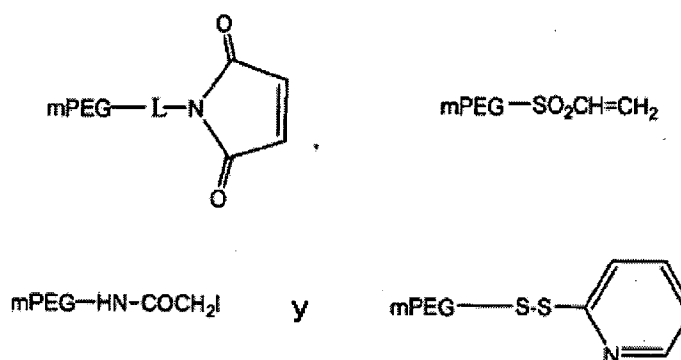
15 En los PEG lineales, un extremo del PEG está protegido por un grupo que es inerte en las condiciones de acoplamiento del PEG al agonista, por ejemplo, un grupo éter, preferiblemente un grupo metoxi. Los PEG terminados de este modo (con un grupo metoxi) se denominan comúnmente mPEG. El otro extremo está activado para acoplarse con el agonista de PYY. Similarmente, con los PEG ramificados útiles en la
20 presente invención, todos los extremos menos uno están protegidos con éter, y el extremo no protegido con éter está activado para el acoplamiento. En una realización el extremo no protegido con éter del PEG está protegido con un resto enlazador ("L") que enlaza el PEG a un grupo funcional que es reactivo con la funcionalidad conjugable del aminoácido X en (E10X)PYY₃₋₃₆ o (D11X)PYY₃₋₃₆ para producir un conjugado que tiene
25 PEG covalentemente unido a la funcionalidad conjugable de X. En una realización adicional, el PEG está unido directamente al grupo reactivo, sin inclusión de un resto enlazador. Tales PEG se denominan frecuentemente PEG "sin enlazadores".

Para los polipéptidos (E10C)PYY₃₋₃₆ y (D11C)PYY₃₋₃₆, el extremo no protegido con éter del PEG está preferiblemente unido a un enlazador que une el PEG a una
30 maleimida u otro grupo que reaccionará con el tiol del residuo de cisteína para producir un conjugado que tiene el PEG unido covalentemente al grupo tiol de la cisteína.

Los PEG reactivos adecuados para uso con (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)PYY₃₋₃₆ incluyen los PEG de las fórmulas:

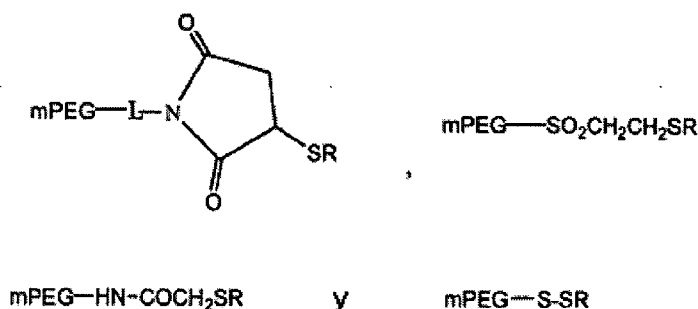
28

- 6 -



Preferiblemente, el PEG es el mPEG-maleimida representado anteriormente que incluye un resto enlazador -L-. Los PEG-maleimidas sin enlazador también son adecuados para uso en la presente invención, particularmente con (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)PYY₃₋₃₆. Dichos PEG-maleimidas sin enlazador pueden prepararse como se describe en Goodson and Katre, *Bio/Technology* 8:343-346, 1990.

Los conjugados producidos por acoplamiento del polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)PYY₃₋₃₆ con los mPEG mostrados anteriormente se representan en las siguientes fórmulas, en donde -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)PYY₃₋₃₆ en los cuales el S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína:



El enlazador -L- sirve simplemente para unir el PEG al grupo funcional reactivo y por consiguiente no está particularmente limitado sino que, preferiblemente, incluye un grupo alquileo que contiene un enlace éster, un enlace uretano, un enlace amida, un enlace éter, un enlace carbonato, o un grupo amino secundario.

En una realización preferida, particularmente para los PEG lineales, el enlazador es un grupo de la fórmula:



en la cual p es un número entero de 1 a 6, preferiblemente, 1 a 3, más preferiblemente, 2 ó 3, lo más preferiblemente, 3, y r es un número entero de 1 a 6, preferiblemente, 1 a 3, más preferiblemente, 2 ó 3, lo más preferiblemente, 2.

Un enlazador preferido es el grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$.

- 5 En otra realización preferida, particularmente para los PEG ramificados, el enlazador es un grupo de la fórmula:



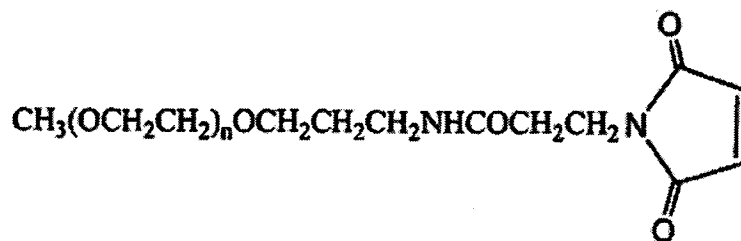
- 10 en la cual s es un número entero de 1 a 6, preferiblemente, 1 a 3, más preferiblemente, 2 ó 3, lo más preferiblemente, 2.

Un enlazador preferido es el grupo $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

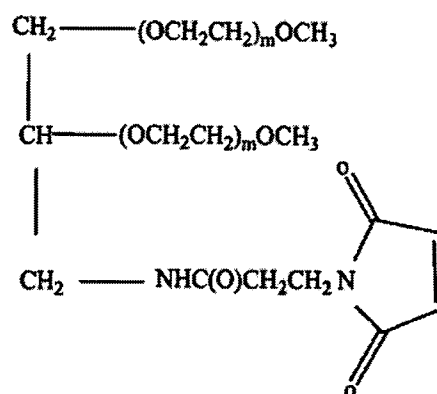
- El PEG puede ser lineal o no lineal, por ejemplo, ramificado o colgante. Preferiblemente, el PEG es lineal o ramificado, preferiblemente un mPEG lineal o ramificado-maleimida. El glicerol-mPEG ramificado-maleimida es un PEG ramificado preferido. Preferiblemente, el PEG es un mPEG lineal-maleimida. El PEG debe tener un peso molecular medio ponderal en el intervalo de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 50 kD. Preferiblemente, el peso molecular medio ponderal está en el intervalo de aproximadamente 5 kD a aproximadamente 45 kD; más preferiblemente, aproximadamente 10-12 kD a aproximadamente 40-45 kD o aproximadamente 20 kD a aproximadamente 40-45 kD. De particular interés es un mPEG lineal, tal como el mostrado en la Fórmula 1, que tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 20 o aproximadamente 30 kD. El glicerol-mPEG ramificado de Fórmula 2 es también de interés y, preferiblemente, tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 20 o aproximadamente 43 kD.
- 15
- 20
- 25

- Los PEG preferidos, apropiadamente activados para conjugación con el grupo tiol de la cisteína de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)PYY₃₋₃₆, son los compuestos de Fórmulas 1 y 2. En el mPEG lineal de Fórmula 1, n es un número entero en el intervalo de aproximadamente 175 a 800; preferiblemente, aproximadamente 375 a 525 o aproximadamente 600 a 750 o aproximadamente 425 a 475 o aproximadamente 650 a 700 o aproximadamente 437 a 473 o 675 a 700. En el glicerol-mPEG ramificado de Fórmula 2, cada m es aproximadamente el mismo y es un número entero en el intervalo de aproximadamente 150 a 500; preferiblemente, aproximadamente 160 a 285 o aproximadamente 400 a 525, o aproximadamente 200 a 250 ó 450 a 500.
- 30

100



1

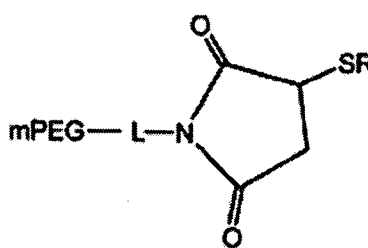


2

Una amplia variedad de PEG, apropiadamente activados para conjugación con las funcionalidades dianas en la cadena lateral de los aminoácidos del péptido, por ejemplo, ceto, tiol, hidroxilo, carboxilo o funcionalidades amino libres, están comercialmente disponibles de cierto número de proveedores, por ejemplo, NOF Corporación, Tokyo, Japón o Nektar Therapeutics Corporation, Huntsville, AL.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a conjugados de variantes del presente PYY₃₋₃₆ y polietilenglicol.

En una realización el conjugado es un compuesto de Fórmula 3



3

en donde el resto mPEG es lineal o ramificado y tiene un peso molecular medio ponderal en el intervalo de aproximadamente 1 kD a 50 kD, preferiblemente, 5 kD a

101

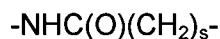
aproximadamente 45kD, más preferiblemente, aproximadamente 10 kD ó 12 kD a aproximadamente 40 ó 45 kD o aproximadamente 20 kD a aproximadamente 40 kD o 45 kD.

L es un grupo de la fórmula:



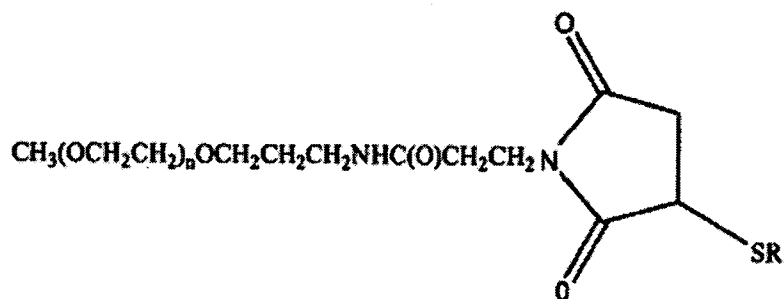
en el cual p es un número entero de 1 a 6; preferiblemente, 1 a 3; más preferiblemente, 2 ó 3; lo más preferiblemente, 3; (como se representa en la Fórmula 4 más adelante); y r es un número entero de 1 a 6; preferiblemente, 1 a 3; más preferiblemente, 2 ó 3, lo más preferiblemente, 2;

10 o L es un grupo de la fórmula:



en el cual s es un número entero de 1 a 6; preferiblemente, 1 a 3; más preferiblemente, 2 o 3; lo más preferiblemente 2; y -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína.

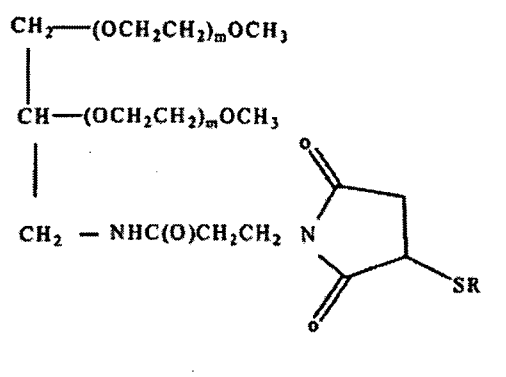
15 Una realización preferida de la invención es el conjugado de la variante de mPEG lineal-PYY₃₋₃₆ de Fórmula 4



4

en donde n es un número entero en el intervalo de aproximadamente 175 a 800; preferiblemente aproximadamente 375 a 525 o aproximadamente 600 a 750 o aproximadamente 437 a 463 o aproximadamente 675 a 700; y -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, el resto (CH₂CH₂O)_n tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 20 kD ó 30 kD. El conjugado en el cual -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ es de particular
25 interés.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a conjugados en los cuales el resto PEG es ramificado. Los conjugados preferidos en esta categoría comprenden un glicerol-resto PEG ramificado. De particular interés es el conjugado de Fórmula 5.



5

5

en donde cada m es aproximadamente el mismo y es un número entero en el intervalo de aproximadamente 150 a 550; preferiblemente, aproximadamente 160 a 285 o aproximadamente 400 a 525, o aproximadamente 200 a 250 o aproximadamente 450 a 500, y -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, cada resto (CH₂CH₂O)_m tiene un peso molecular medio ponderal en el intervalo de aproximadamente 9-11 kD o aproximadamente 20- 22 kD. Preferiblemente, el peso molecular medio ponderal combinado de los restos (CH₂CH₂O)_m es aproximadamente 20 kD o aproximadamente 43 kD. El conjugado en el que -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ es de particular interés.

La presente invención también proporciona un anticuerpo monoclonal que específicamente se une a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:4. En una realización de este aspecto de la invención el polipéptido está pegilado en el residuo de cisteína.

Además, la presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican las secuencias de polipéptidos de la invención, preferiblemente, codifican las SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

En otra realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agonista de PYY de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición también comprende al menos un agente farmacéutico adicional, que puede ser un agente útil en el tratamiento de la indicación primaria para la composición o una co-morbilidad de la indica-

ción primaria. El agente farmacéutico adicional es preferiblemente un agente anti-obesidad. La composición preferiblemente comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de PYY de la invención o una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de un agonista de PYY de la invención y un agente farmacéutico adicional.

5 También se proporciona un método de tratar una enfermedad, estado o trastorno modulado por un agonista del receptor YR2 en mamíferos, que comprende administrar periféricamente a un mamífero que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de PYY de la invención. El agonista de PYY de la invención puede usarse solo o en combinación con al menos un agente farmacéutico adicional que es útil en el tratamiento de la enfermedad, estado o trastorno o una co-morbilidad de la enfermedad, estado o trastorno. Las enfermedades, estados, o trastornos modulados por un agonista de YR2 en mamíferos incluyen obesidad y sobrepeso. Las co-morbididades de dichas enfermedades, estados o trastornos podrían igualmente ser incidentalmente mejorados por tratamiento de dichas enfermedades, estados o trastornos. Además, se proporciona un método de tratar la obesidad en un mamífero que necesite dicho tratamiento, que comprende administrar periféricamente al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de PYY de la presente invención.

20 También se proporciona un método de reducir el peso o promover la pérdida de peso (incluyendo prevenir o inhibir la ganancia de peso) en un mamífero que comprende administrar periféricamente al mamífero una cantidad controladora del peso o reductora de peso de un agonista de PYY de la presente invención.

25 También se proporciona un método de reducir la ingesta de alimentos en un mamífero, que comprende administrar periféricamente al mamífero una cantidad reductora de la ingesta de alimentos de un agonista de PYY de la presente invención.

También se proporciona un método de inducir saciedad en un mamífero, que comprende administrar periféricamente al mamífero una cantidad inductora de saciedad de un agonista de PYY de la invención.

30 También se proporciona un método de reducir la ingesta calórica en un mamífero que comprende administrar periféricamente al mamífero una cantidad reductora de la ingesta calórica de un agonista de PYY de la invención. El agonista de PYY puede administrarse solo o en combinación con al menos un agente farmacéutico adicional, preferiblemente, un agente anti-obesidad.

35 En cada uno de los métodos antes descritos y en las reivindicaciones que se

104

acompañan, el agonista de PYY puede administrarse solo o en combinación con al menos un agente farmacéutico adicional, preferiblemente, un agente anti-obesidad.

Los presentes agonistas de PYY y las composiciones que los contienen también son útiles en la fabricación de un medicamento para las aplicaciones terapéuticas mencionadas en la presente memoria.

Definiciones y abreviaturas

La frase "farmacéuticamente aceptable" significa que la sustancia o composición debe ser compatible química y/o toxicológicamente con los otros ingredientes que comprenden una formulación y/o con el mamífero que se trata con ella.

La expresión "agonista de PYY" significa un compuesto que produce uno o más de los efectos producidos por el PYY *in vivo* o *in vitro*.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agonista de PYY de la presente invención que reduce la ingesta calórica, reduce el peso corporal y/o reduce la grasa corporal con respecto a valores de control apropiados determinados antes del tratamiento o en un grupo tratado con un vehículo.

El término "mamífero" significa seres humanos, así como otros miembros de sangre caliente del reino animal que poseen un mecanismo homeopático en la clase mamíferos, por ejemplo, mamíferos de compañía, mamíferos de zoo y mamíferos fuentes de alimentos. Algunos ejemplos de mamíferos de compañía son caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos) y caballos; algunos ejemplos de mamíferos fuentes de alimentos son cerdos, ganado, ovejas y similares. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano o un mamífero de compañía. Más preferiblemente, el mamífero es un ser humano, hombre o mujer.

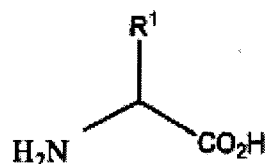
Los términos "tratar" o "tratamiento" abarcan tanto el tratamiento preventivo, es decir, profiláctico, como el tratamiento paliativo.

La expresión "administración periférica" significa administración fuera del sistema nervioso central. La administración periférica no incluye la administración directa al cerebro. La administración periférica incluye, pero sin limitación, administración intravascular, intramuscular, subcutánea, por inhalación, oral, sublingual, enteral, rectal, transdérmica o intra-nasal.

Un aminoácido no natural adecuado para uso en la presente invención es típicamente cualquier aminoácido de la fórmula siguiente, distinto de los 20 aminoácidos naturales (Cantor and Shimmel, *Biophysical Chemistry*, Part 1, W.H Freeman & Sons, San Francisco, 42-43, 1980), en donde R¹ es cualquier sustituyente que comprende

105

una funcionalidad ceto, tiol, carboxilo, hidroxilo o amino libre, tales como los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. publicada N° 2005/0208536, incorporada en la presente memoria como referencia.



- 5 Dichos aminoácidos no naturales, por ejemplo, incluyen tiotirosina, ornitina, 3-mercaptofenilalanina, 3- o 4-aminofenilalanina, 3- o 4-acetilfenilalanina, 2- o 3-hidroxifenilalanina (o- o m-tirosina), hidroximetilglicina, aminoetilglicina, 1-metil-1-mercaptoetilglicina, aminoetiltioetilglicina y mercaptoetilglicina. Muchos de los aminoácidos no naturales útiles en la presente invención están comercialmente disponibles.
- 10 Otros pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la tiotirosina puede prepararse por el método descrito por Lu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119:7173-7180, 1997, incorporado como referencia en la presente memoria.

La expresión "PYY humano " o "hPYY" significa el polipéptido de 36 aminoácidos amidado en el C-terminal que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

- 15 YPIKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:1]

La expresión "hPYY₃₋₃₆" significa el 34-mero del C-terminal del hPYY que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

IKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:2]

- 20 La expresión "(E10C)hPYY₃₋₃₆" significa el 34-mero del C-terminal del hPYY en el cual el residuo 10 de ácido glutámico del hPYY está reemplazado por un residuo de cisteína, y que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

IKPEAPGCDASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:3].

- 25 La expresión "(D11C)hPYY₃₋₃₆" significa el 34-mero del C-terminal del hPYY en el cual el residuo 11 de ácido aspártico de hPYY está reemplazado por un residuo de cisteína, y que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

IKPEAPGECASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:4].

Breve descripción de los dibujos

- 30 La Figura 1 es un trazado de la HPLC de fase inversa del péptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ purificado en una columna Zorbax Eclipse XDB-C8.

La Figura 2 es un trazado de HPLC de exclusión por tamaño molecular de la

108

mezcla de reacción de mPEG lineal de 30K-maleimida más (E10C)hPYY₃₋₃₆ en una columna Shodex 804 de cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

La Figura 3 es una foto de SDS PAGE de las fracciones de la purificación en una columna SP Hitrap de mPEG lineal-maleimida de 30K-(E10C)hPYY₃₋₃₆. PM = pesos moleculares estándares; C = carga de columna; FP = flujo pasante; 4-23 = fracciones de elución.

La Figura 4 es un trazado de HPLC de fase inversa del péptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ purificado en una columna Zorbax Eclipse XDB-C8.

La Figura 5 es un trazado de HPLC de exclusión por tamaño molecular de la mezcla de reacción de mPEG lineal de 30K-maleimida más (D11C)hPYY₃₋₃₆ en una columna Shodex 804 de cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

La Figura 6 es un trazado de HPLC de exclusión por tamaño molecular que muestra el perfil de elución del producto mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ purificado en una columna Shodex 804 de cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

La Figura 7 es un trazado de HPLC de exclusión por tamaño molecular que muestra el perfil de elución del producto mPEG lineal de 30K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆ purificado en una columna Shodex 804 de cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

La Figura 8 es un trazado de HPLC de exclusión por tamaño molecular de la mezcla de reacción de glicerol-mPEG ramificado de 43K-maleimida más (E10C)hPYY₃₋₆ en una columna Shodex 804 de cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

La Figura 9 es un trazado de HPLC de exclusión por tamaño molecular que muestra el perfil de elución del producto glicerol-mPEG ramificado de 43K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ purificado en una columna Shodex 804 de cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

La Figura 10 es una gráfica de inhibición de la ingesta acumulativa de alimentos en ratones mantenidos en ayunas después de la inyección intraperitoneal (IP). La Figura 10A muestra el efecto de la dosis de PYY₃₋₃₆ natural en comparación con el grupo al que solo se administra vehículo. La Figura 10B muestra el efecto de la dosis de mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆.

La Figura 11 muestra el efecto sobre la ingesta de alimentos de la inyección IP en ratones mantenidos en ayunas de glicerol-mPEG ramificado de 43K-maleimida-(E10C)PYY₃₋₃₆ en comparación con el vehículo y mPEG lineal de 30K-maleimida-

(E10C)PYY₃₋₃₆. La Figura 11A es una gráfica lineal que muestra la respuesta durante 6 horas después de la inyección. La Figura 11B es un gráfico de barras que compara los efectos durante 24 horas después de la inyección.

La Figura 12 muestra los efectos de la inyección IP de vehículo, PYY₃₋₃₆, y mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)PYY₃₋₃₆ en ratones alimentados espontáneamente. La Figura 12A muestra el efecto de la ingesta de alimentos y la Figura 12B muestra el efecto sobre el peso corporal.

La Figura 13 muestra los efectos de la inyección subcutánea (SC) de vehículo, PYY₃₋₃₆, y mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ en ratones alimentados espontáneamente. La Figura 13A muestra el efecto sobre la ingesta de alimentos, y la Figura 13B muestra el efecto sobre el peso corporal.

La Figura 14 muestra la exposición del plasma a PYY en ratones después de la inyección IP de 0,1 mg/kg. La Figura 14A muestra los niveles de PYY en plasma después de la inyección de hPYY₃₋₃₆ y la Figura 14B muestra los niveles de PYY en plasma después de la inyección de mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆.

La Figura 15 es una gráfica de curvas concentración-respuesta para PYY₃₋₃₆ o mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)PYY₃₋₃₆ obtenida en el ensayo de proximidad de centelleo (SPA), en el cual los ligando compiten con ¹²⁵I-PYY₁₋₃₆ para unirse al receptor Y2R expresado en células KAN-TS.

La Figura 16 es una gráfica de curvas de concentración-respuesta para PYY₃₋₃₆ o mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)PYY₃₋₃₆ en el ensayo de unión de GTPgamma[³⁵S] al receptor Y2R expresado en membranas KAN-TS.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a agonistas de PYY que son variantes de PYY₃₋₃₆ y sus conjugados pegilados, que pueden tener al menos una propiedad química o fisiológica mejorada, seleccionada, pero sin limitación, de disminución de la tasa de eliminación, aumento de la duración de permanencia en plasma, actividad prolongada *in vivo*, aumento de potencia, aumento de estabilidad, aumento de solubilidad y disminución de antigenicidad.

Una variante preferida de PYY₃₋₃₆ de la invención es (E10C)hPYY₃₋₃₆. Otra variante preferida es (D11C)hPYY₃₋₃₆. Estas y otras variantes de la invención pueden producirse sintéticamente, recombinantemente y por otros medios, como se describe más adelante y en los Ejemplos de la presente memoria o por métodos análogos.

Además de las sustituciones enumeradas anteriormente (por ejemplo, E10C y

D11C), los agonistas de PYY de la invención también pueden incluir una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en otras posiciones de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras pueden hacerse, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla siguiente. Los aminoácidos alifáticos no polares, polares no cargados y polares cargados pueden ser sustituidos por otros aminoácidos alifáticos, es decir no polares, polares no cargados o polares cargados respectivamente. Preferiblemente, tales sustituciones se producen entre aminoácidos en la misma línea de la tercera columna de la tabla siguiente. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos también pueden hacerse entre aminoácidos aromáticos, tales como se recogen en la tabla siguiente.

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares no cargados	C S T M
		N Q
	Polares cargados	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

Producción sintética

Las variantes de PYY₃₋₃₆ de esta invención, por ejemplo, (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆, pueden prepararse usando técnicas estándares de síntesis de péptidos conocidas en la técnica, por ejemplo, por síntesis de péptidos en fase sólida con un sintetizador automático de péptidos (por ejemplo, el modelo 433A; de Applied Biosystems, Foster City, CA), usando química tBoc o Fmoc. Puede encontrarse un resumen de las muchas técnicas de síntesis de péptidos en *Solid Phase Peptide Synthesis* 2nd ed. (Stewart, J.M. and Young, J. D., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1984). Véase también el libro *Solid-phase Organic Synthesis* (Burgess, K., John Wiley & Sons, New York, NY, 2000) y el artículo de Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34, 1989. Todas las referencias anteriores se incorporan en la presente memoria como referencia.

Las variantes de PYY₃₋₃₆ de la invención se conjugan preferiblemente con un PEG. Las reacciones de conjugación, denominadas reacciones de pegilación, se llevaron a cabo históricamente en solución con un exceso molar de polímero y sin relación a donde se uniría el polímero a la proteína. Dichas técnicas generales, sin embargo, han demostrado típicamente ser inadecuadas para conjugar proteínas bioactivas a

polímeros no antigénicos al mismo tiempo que retienen suficiente bioactividad. Un modo de mantener la bioactividad de la variante del agonista de PYY₃₋₃₆ después de la pegilación es evitar sustancialmente, en el proceso del acoplamiento, la conjugación de cualesquiera grupos reactivos de la variante que estén asociados con la unión del agonista al receptor diana. Un aspecto de la presente invención es proporcionar un proceso de conjugar un polietilenglicol a un agonista de la variante de PYY₃₋₃₆ de la invención en sitios reactivos específicos que no interfieran sustancialmente con el (los) sitio(s) de unión del receptor para retener altos niveles de actividad. Otro aspecto de esta invención es la inserción de residuos reactivos en PYY₃₋₃₆ para proporcionar sus variantes de agonista para conjugación con un polietilenglicol con una limitada alteración de la actividad.

La modificación química a través de un enlace covalente puede realizarse bajo las condiciones adecuadas generalmente adoptadas en una reacción de conjugación de una sustancia biológicamente activa con un PEG activado. La reacción de conjugación se lleva a cabo en condiciones relativamente suaves para evitar la inactivación del agonista variante de PYY₃₋₃₆. Las condiciones suaves incluyen mantener el pH de la solución de reacción en el intervalo de aproximadamente 3 a 10, y las temperaturas de reacción en el intervalo de aproximadamente 0° a 40°C. Las funcionalidades no dianas en las variantes de PYY₃₋₃₆ que son reactivas con el PEG activado en condiciones de pegilación se protegen preferiblemente con un grupo protector adecuado que es eliminable después de la pegilación en la funcionalidad diana. En la pegilación de los grupos amino libres con reactivos, tales como PEG-aldehídos o PEG-succinimidas, se mantiene típicamente un pH en el intervalo de aproximadamente 3 a 10, preferiblemente aproximadamente 4 a 7,5. La reacción de acoplamiento se lleva preferiblemente a cabo en un tampón adecuado (pH 3 a 10), por ejemplo, fosfato, MES, citrato, acetato, succinato o HEPES, durante aproximadamente 1 a 48 horas a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 4° a 40°C. En la pegilación de grupos tiol usando reactivos tales como PEG-maleimidas, PEG-vinilsulfonas o PEG-ortopiridil-disulfuros, se mantiene preferiblemente un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a 8. Las PEG-aminas son útiles en la pegilación de grupos ceto, por ejemplo, en p-acetilfenilalanina y pueden prepararse como se describe por Pillai et al., *J. Org. Chem.* 45:5364-5370, 1980.

Las reacciones de conjugación de la presente invención proporcionan típicamente una mezcla de reacción o reunión de reactivos que contiene la variante de PYY₃₋₃₆ mono-pegilado deseada, así como el péptido variante de PYY₃₋₃₆ sin reaccio-

nar, PEG sin reaccionar y usualmente menos que aproximadamente 20% de especies de alto peso molecular, que pueden incluir conjugados que contienen más una cadena de PEG y/o especies agregadas. Después de que han sido separadas las especies sin reaccionar y las especies de alto peso molecular, se recuperan las composiciones que contienen principalmente las variantes de PYY₃₋₃₆ mono-pegilado. Dado que los conjugados incluyen frecuentemente una sola cadena de polímero, los conjugados son sustancialmente homogéneos.

El conjugado PEG-variante de PYY₃₋₃₆ deseado puede ser purificado de la mezcla de reacción por los métodos convencionales típicamente usados para la purificación de proteínas, tales como diálisis, precipitación por adición de sal, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (abreviadamente HIC por la expresión inglesa *hydrophobic interaction chromatography*), cromatografía en gel y electroforesis. La cromatografía de intercambio iónico es particularmente eficaz en separar el PEG que no ha reaccionado o la variante de PYY₃₋₃₆ que no ha reaccionado. La separación del conjugado PEG-variante de PYY₃₋₃₆ deseado puede efectuarse colocando la mezcla de reacción que contiene las especies mixtas en una solución tampón que tenga un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, preferiblemente menor que 8 para evitar la desamidación. La solución tampón preferiblemente contiene una o más sales tampones seleccionadas, per sin limitación, de KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄ y CH₃CO₂Na.

Si el sistema tampón usado en la reacción de pegilación es diferente del usado en el proceso de separación, la mezcla de reacción pegilación se somete a intercambio iónico/diafiltración o se diluye con una cantidad suficiente del tampón de separación inicial.

El fraccionamiento de los conjugados en una masa reunida que contiene las especies deseadas se realiza preferiblemente usando un medio de cromatografía de intercambio iónico. Dichos medios son capaces de unir (fijar) selectivamente los conjugados PEG-variante de PYY₃₋₃₆ por diferencias en carga, que varían de algún modo predecible. Por ejemplo, la carga superficial de una variante de PYY₃₋₃₆ está determinada por el número de grupos cargados disponibles en la superficie del péptido que están disponibles para interacción con el soporte de la columna no comprometido por la presencia de PEG. Estos grupos cargados típicamente sirven como punto de la potencial unión de polímeros de PEG. Por lo tanto, los conjugados PEG-variante de PYY₃₋₃₆ tendrán una carga diferente de las de otras especies presentes para permitir el aislamiento selectivo.

Las resinas de intercambio iónico son especialmente preferidas para la purificación de los presentes conjugados PEG-variante de PYY₃₋₃₆. En el método de purificación de la presente invención se usan resinas de intercambio catiónico, tales como resinas de sulfopropilo. Una lista no limitativa de resinas de intercambio catiónico adecuadas para uso con la presente invención incluye SP-Hitrap®, SP Sepharose HP® y SP Sepharose® *fast flow*. También pueden usarse otras resinas de intercambio catiónico, por ejemplo resinas S y CM.

La resina de intercambio catiónico está preferiblemente formando relleno en una columna y equilibrada por medios convencionales. Se usa un tampón que tenga el mismo pH y osmolalidad que la solución de PEG-variante de PYY₃₋₃₆ conjugada. El tampón de elución preferiblemente contiene una o más sales seleccionadas, pero sin limitación, de CH₃CO₂Na, HEPES, KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄ y (NH₄)₂CO₃. La solución que contiene el conjugado se adsorbe luego en la columna, con PEG sin reaccionar y algunas especies de alto peso molecular que no se retienen. Tras completarse la carga, se aplica a la columna un flujo en gradiente de un tampón de elución con concentraciones crecientes de sales para eluir la fracción deseada de PEG-variante de PYY₃₋₃₆ conjugada. Las fracciones eluidas reunidas se limitan preferiblemente a conjugados de polímeros uniformes después de la etapa de separación de intercambio catiónico. Cualquier especie de la variante de PYY₃₋₃₆ no conjugada puede ser eliminada luego por lavado de la columna por técnicas convencionales. Si se desea, las especies de variantes de PYY₃₋₃₆ mono- y multi-pegiladas y las especies de superior peso molecular pueden separarse unas de otras mediante cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño molecular adicionales.

En lugar de un gradiente lineal pueden usarse técnicas que utilizan múltiples etapas isocráticas de aumentar la concentración. Las etapas de elución isocrática múltiple de aumentar la concentración darán como resultado la elución secuencial de conjugados de variantes de PYY₃₋₃₆ multi-pegilados/agregados y luego de mono-pegilados. También pueden usarse las técnicas de elución basadas en gradientes de pH. El intervalo de temperatura para la elución está generalmente entre aproximadamente 4°C y aproximadamente 25°C. La elución de PEG-variante de PYY₃₋₃₆ es monitorizada por absorbancia UV a 280 nm. La recogida de fracciones puede conseguirse a través de simples perfiles de tiempo de elución.

Expresión recombinante

Moléculas de ácidos nucleicos

W

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ pueden comprender una de las siguientes secuencias de ácidos nucleicos (la mutación del codón para la sustitución E10C está subrayada):

5 atcaaaccgaggctcccggtgacgcctcgccgaggagctgaaccgctactacgcctccctgcgccactaccta
aacctgggcacccggcagcggtat (SEQ ID NO: 5); o

atcaaaccgaggctcccggtgcgacgcctcgccgaggagctgaaccgctactacgcctccctgcgccactaccta
aacctgggcacccggcagcggtat (SEQ ID NO: 6).

10

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ pueden comprender una de las siguientes secuencias de ácidos nucleicos (la mutación del codón para la sustitución D11C está subrayada):

15 atcaaaccgaggctcccggcgaatgacgcctcgccgaggagctgaaccgctactacgcctccctgcgccactaccta
aacctgggcacccggcagcggtat (SEQ ID NO: 7); o

atcaaaccgaggctcccggcgaatgcgacgcctcgccgaggagctgaaccgctactacgcctccctgcgccactaccta
aacctgggcacccggcagcggtat (SEQ ID NO: 8).

20

Estas secuencias también pueden incluir un codón de parada (por ejemplo, tga, taa, tag) en el extremo C-terminal, y pueden obtenerse fácilmente por una variedad de modos incluyendo, sin limitación, síntesis química, mutación genética de secuencias de polinucleótidos hPYY de tipo silvestre obtenidas de cDNA o por escrutinio de genoteca genómica, escrutinio de genoteca de expresión, y/o amplificación de cDNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆ pueden producirse usando mutagénesis dirigida al sitio, amplificación por PCR u otros métodos apropiados, en donde el(los) cebador(es) tienen las mutaciones puntuales deseadas.

25 Los métodos de DNA recombinantes y los métodos de mutagénesis descritos en la presente memoria son generalmente los expuestos en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) y en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). Si se desea que otro aminoácido no natural esté reemplazando a E10

30 o D11, dicho péptido puede ser expresado recombinantemente usando métodos que

35

W3

se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. publicada N° 2005/0208536, incorporada en la presente memoria como referencia.

Los polinucleótidos de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de los hPYY pueden ser identificados por clonación con expresión que emplea la detección de clones positivos basado en la propiedad la proteína expresada. Típicamente, las genotecas de ácidos nucleicos se escrutan por unión de un anticuerpo u otra pareja de unión (por ejemplo, receptor o ligando) a las proteínas clonadas que se expresan y se presentan en la superficie de una célula hospedante. El anticuerpo o pareja de unión se modifica con un marcador detectable para identificar las células que expresan el clon deseado.

Las técnicas de expresión recombinantes realizadas de acuerdo con las descripciones que se exponen más adelante pueden ser seguidas para producir polinucleótidos que codifican (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆ y para expresar los polipéptidos codificados. Por ejemplo, insertando una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de una variante de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ en un vector apropiado, un experto en la técnica puede producir fácilmente grandes cantidades de la secuencia de nucleótidos deseada. Las secuencias se pueden usar luego para generar sondas de detección o cebadores de amplificación. Alternativamente, puede insertarse en un vector de expresión un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Introduciendo el vector de expresión en un hospedante apropiado, pueden producirse en grandes cantidades la variante de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ codificada.

Otro método para obtener una secuencia de ácidos nucleicos adecuada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este método, se prepara cDNA a partir de poli(A)+RNA o RNA total usando la enzima transcriptasa inversa. Dos cebadores, típicamente complementarios a dos regiones separadas de cDNA que codifican la secuencia de aminoácidos de una variante de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆, se añaden luego al cDNA junto con una polimerasa, tal como Taq-polimerasa y la polimerasa amplifica la región del cDNA entre los dos cebadores.

Otro medio de preparar una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una variante de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ es la síntesis química usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos por Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34, 1989. Estos métodos incluyen los métodos del fosfotriéster, fosforamidito y H-fosfonato para la síntesis de ácidos nucleicos. Un método preferido para tal síntesis química es la síntesis

soportada por polímero usando química de fosforamidito. Típicamente, el DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ tendrá aproximadamente una longitud de un centenar de nucleótidos. Ácidos nucleicos mayores que aproximadamente 100 nucleótidos pueden sintetizarse como diversos fragmentos usando estos métodos. Los fragmentos se pueden ligar luego entre sí para formar la secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen (E10C)hPYY₃₋₃₆.

El fragmento de DNA que codifica el extremo amino del polipéptido puede tener un codón ATG, que codifica un residuo de metionina. Esta metionina puede o no estar presente en la forma madura de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (DIIC) LP443-36, dependiendo de si el polipéptido producido en la célula hospedante está diseñado para ser secretado desde la célula. El codón que codifica isoleucina también puede usarse como sitio de iniciación. También puede usarse otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, las variantes de ácido nucleico contienen codones que han sido alterados para una expresión óptima de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆ en una célula hospedante dada. Las alteraciones particulares de codones dependerán del (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ y de la célula hospedante seleccionada para expresión. Dicha "optimización de codón" puede realizarse por una variedad de métodos, por ejemplo, seleccionando codones que son preferidos para uso en genes altamente expresados en una célula hospedante dada. Pueden usarse algoritmos de ordenadores que incorporan tablas de frecuencia de codones, tales como "*Eco_high.Cod*" para preferencia de codones de genes bacterianos altamente expresados y son proporcionados por la University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, Wis.). Otras tablas útiles de frecuencia de codones incluyen "*Caelegans_high.cod*," "*Caelegans_low.cod*," "*Drosophila_high.cod*," "*Human_high.cod*," "*Maize_high.cod*," y "*Yeast_high.cod*."

Vectores y células hospedantes

Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆ se inserta en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligación estándares. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula hospedante particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedante de tal modo que pueda ocurrir la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆ puede ser amplificada/expresada en células hospedantes procariotas, de levadura, de insectos (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. Para una revisión de los vectores de

expresión, véase *Meth. Enz.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed., Academic Press, 1990).

Típicamente, los vectores de expresión usados en cualesquiera de las células hospedantes contendrán secuencias para el mantenimiento de plásmidos y para clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, colectivamente denominadas "secuencias flanqueantes" en ciertas realizaciones, incluirán típicamente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia completa de intrón que contiene un sitio de empalme de donador y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia delantera para la secreción del polipéptido, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de polienlazador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que ha de expresarse, y un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se analiza más adelante.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica una etiqueta (denominada en inglés "tag"), es decir, una molécula de oligonucleótido localizada en el extremo 5' ó 3' de la secuencia que codifica (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆; la secuencia de oligonucleótido codifica poliHis (tal como hexaHis), u otra etiqueta, tales como FLAG, HA (hemaglutinina del virus de la gripe), o myc para las cuales existen anticuerpos comercialmente disponibles. Esta etiqueta está típicamente fusionada al polipéptido para expresión del polipéptido, y puede servir como medio para purificación por afinidad del (E10C)hPYY₃₋₃₆ o el (D11C)hPYY₃₋₃₆ de la célula hospedante. La purificación por afinidad puede conseguirse, por ejemplo, por cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede ser retirada subsiguientemente de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY purificado por diversos medios, tales como el uso de ciertas peptidasas para escisión, por ejemplo, digestión en 3' por enteroquinasa de una secuencia etiqueta FLAG que está *aguas arriba* de una de las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 3-4.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedante), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie de la célula hospedante o cepa), híbrida (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), o sintética, o las secuencias flanqueantes pueden ser secuencias naturales que normalmente funcionan regulando la expresión de hPYY₃₋₃₆. La fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o

cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional en la maquinaria de la célula hospedante, y pueda ser activada por dicha maquinaria.

Las secuencias flanqueantes útiles pueden obtenerse por cualquiera de los diversos métodos bien conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en la presente memoria, distintas de las secuencias flanqueantes del gen PYY, habrán sido previamente identificadas por cartografía y/o por digestión con endonucleasa de restricción y por tanto pueden aislarse del tejido fuente apropiado usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, la secuencia completa de nucleótidos de una secuencia flanqueante puede ser conocida. En este caso, la secuencia flanqueante puede ser sintetizada usando los métodos descritos en la presente memoria para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

Cuando es conocida la totalidad o solo una parte de la secuencia flanqueante, ésta puede obtenerse usando PCR y/o escrutando una genoteca genómica con un oligonucleótido adecuado y/o un fragmento de una secuencia flanqueante de la misma u otra especie. Cuando la secuencia flanqueante no es conocida, puede aislarse un fragmento de DNA que contiene una secuencia flanqueante de un fragmento mayor de DNA que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificadora o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede conseguirse por digestión con endonucleasa de restricción para producir el fragmento de DNA apropiado seguido por aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para conseguir este fin será fácilmente evidente para los expertos en la técnica.

Un origen de replicación es típicamente una parte de los vectores de expresión procariotas adquiridos comercialmente, y el origen ayuda a la amplificación del vector en una célula hospedante. La amplificación del vector para obtener un cierto número de copias, puede, en algunos casos, ser importante para la expresión óptima de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆. Si el vector de elección no contiene un origen de sitio de replicación, puede ser sintetizado químicamente basándose en una secuencia conocida, y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas y diversos orígenes (por ejemplo, SV40, poliovirus, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus, tales como HPV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamíferos. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión en mamífe-

ros (por ejemplo, el origen de SV40 se usa frecuentemente porque contiene el promotor temprano).

Una secuencia de terminación de la transcripción está típicamente situada en 3' del extremo de una región codificadora de polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Usualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariontes es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia de poli-T. Aunque la secuencia es fácilmente clonada a partir de una genoteca o incluso adquirida comercialmente como parte de un vector, también puede ser fácilmente sintetizada usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos, tales como los descritos en la presente memoria.

Un elemento genético marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula hospedante en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores típicos de selección codifican proteínas que: (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina, o kanamicina para células hospedantes procariontes; (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos. Los marcadores seleccionables preferidos son el gen de la resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. Un gen de resistencia a la neomicina también puede usarse para la selección en células hospedantes procariontes y eucariotes.

Para amplificar el gen que se expresará pueden usarse otros genes de selección. La amplificación es el proceso en donde los genes que tienen mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se reiteran en tandem dentro de cromosomas de sucesivas generaciones de células recombinantes. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos incluyen dihidrofolato-reductasa (DHFR) y timidina-quinasa. Los transformantes de células de mamíferos se colocan bajo presión de selección en donde sólo los transformantes están únicamente adaptados a sobrevivir en virtud del gen de selección presente en el vector. La presión de selección es impuesta cultivando las células transformadas en condiciones en las cuales la concentración de agente de selección en el medio es sucesivamente cambiada, lo cual conduce a la amplificación de tanto el gen de selección como del DNA que codifica un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Como resultado, se sintetizan a partir de DNA amplificado mayores cantidades de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆.

Un sitio de unión a ribosoma es usualmente necesario para la iniciación de la

traducción de mRNA y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento está típicamente situado 3' respecto al promotor y 5' respecto a la secuencia codificadora de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆. La secuencia de Shine-Dalgarno es variada pero típicamente es una polipurina (es decir, que tiene un alto contenido de A-G). Han sido identificadas muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de las cuales puede ser sintetizada fácilmente usando métodos expuestos en la presente memoria y usados en un vector procariota.

Una secuencia delantera, o señal, puede usarse para dirigir un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ fuera de la célula hospedante. Típicamente, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia señal está situada en la región codificadora de la molécula de ácido nucleico de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆, o directamente en el extremo 5' de una región codificadora de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Se han identificado muchas secuencias señal, y cualquiera de las que sean funcionales en la célula hospedante seleccionada puede usarse junto con una molécula de ácido nucleico de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Por lo tanto, una secuencia señal puede ser homóloga (se presenta en la naturaleza) o heteróloga para la molécula de ácido nucleico de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Adicionalmente, una secuencia señal puede sintetizarse químicamente usando los métodos descritos en la presente memoria. En la mayoría de los casos, la secreción de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆ desde la célula hospedante por la presencia de un péptido señal dará como resultado la eliminación del péptido señal del (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ secretado. La secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte de una molécula de ácido nucleico de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆ que está insertada en el vector.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de hPYY₃₋₃₆ natural puede estar unida a una región codificadora de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆ o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal heteróloga puede estar unida a una región codificadora de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una que sea reconocida y procesada, es decir, escindida por una peptidasa de señal, por la célula hospedante. Para células hospedantes procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal de hPYY natural, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias delanteras de fosfatasa alcalina, penicilinasas o enterotoxina II termoestable. Para la secreción de

levadura, la secuencia señal de hPYY natural puede ser sustituida por secuencias de-
lanteras de invertasa de levadura, factor alfa o fosfatasa ácida. En la expresión de cé-
lulas de mamíferos, la secuencia señal natural es satisfactoria, aunque pueden ser
adecuadas otras secuencias señal de mamíferos.

5 En muchos casos, se aumenta la transcripción de una molécula de ácido nu-
cleico por la presencia de uno o más intrones en el vector; esto es particularmente
cierto cuando se produce un polipéptido en células hospedantes eucariotas, especial-
mente células hospedantes de mamíferos. Los intrones usados pueden ser los que
existen naturalmente dentro del gen de hPYY especialmente cuando el gen usado es
10 una secuencia genómica de longitud completa o uno de sus fragmentos. Cuando el
intrón no existe naturalmente dentro del gen (como ocurre con la mayoría de los
cDNA), el intrón puede obtenerse de otra fuente. La posición del intrón con respecto a
las secuencias flanqueantes y al gen hPYY es generalmente importante, puesto que el
intrón debe transcribirse para ser eficaz. Así, cuando está siendo transcrita una molé-
15 cula de de cDNA que codifica un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆, la posición
preferida para el intrón es 3' respecto al sitio del comienzo de la transcripción y 5' res-
pecto a la secuencia de terminación de la transcripción poli-A. Preferiblemente, el in-
trón o los intrones estarán localizados en un lado o en otro (es decir, 5' ó 3') del cDNA,
de tal modo que no interrumpa(n) la secuencia codificadora. Puede usarse cualquier
20 intrón de cualquier fuente, incluyendo organismos virales, procariotas y eucariotas
(plantas o animales), siempre y cuando sea compatible con la célula hospedante en la
cual está insertado. También están incluidos en la presente memoria los intrones sinté-
ticos. Opcionalmente, en el vector puede usarse más de un intrón.

Los vectores de expresión y clonación contendrán típicamente un promotor
25 que es reconocido por el organismo hospedante y está unido operativamente a la mo-
lécula que codifica el (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Los promotores son secuen-
cias no transcritas localizadas aguas arriba (es decir, 5') respecto al codón de inicia-
ción de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb)
que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan conven-
30 cionalmente en dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los
promotores Inducibles inician niveles crecientes de transcripción de DNA bajo su con-
trol en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tales como la presencia
o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitui-
vos, por otra parte, inician la producción continua del producto del gen; es decir, hay
35 poco o ningún control sobre la expresión del gen. Son bien conocidos un gran número

de promotores, reconocidos por una variedad de potenciales células hospedantes. Un promotor adecuado se une operativamente al DNA que codifica (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ separando el promotor de la fuente de DNA por digestión con una enzima de restricción e insertando la secuencia promotora deseada en el vector. La

5 secuencia promotora natural de hPYY₃₋₃₆ puede usarse para dirigir la amplificación y/o la expresión de una molécula de ácido nucleico de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Sin embargo, se prefiere un promotor heterólogo, si permite mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína expresada en comparación con el promotor natural, y si es compatible con el sistema de célula hospedante que se ha seleccionado para

10 uso.

Promotores adecuados para uso con hospedantes procariotas incluyen los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa; RNA-polimerasa inducible en *E. coli* T7; fosfatasa alcalina; un sistema promotor de triptófano (trp); y promotores híbridos, tales como el promotor tac. Otros promotores bacterianos conocidos también son ade-

15 cuados. Sus secuencias han sido publicadas, facilitando de este modo a los expertos en la técnica ligarlos a las secuencias de DNA deseadas, usando enlazadores o adaptadores según sea necesario para suministrar sitios de restricción útiles.

Los promotores adecuados para uso con hospedantes constituidos por levaduras son también bien conocidos en la técnica. Potenciadores de levaduras se usan

20 ventajosamente con promotores de levaduras. Los promotores adecuados para uso en células hospedantes de mamíferos son bien conocidos e incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los genomas de virus, tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferible-

25 mente virus del simio 40 (SV40). Otros promotores de mamíferos adecuados incluyen promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés en controlar la expresión de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ incluyen, pero sin limitación: la región pro-

30 motora temprana de SV40 (Bemoist and Chambon, *Nature* 290:304-10, 1981); el promotor de CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., *Cell* 22:787- 97, 1980); el promotor de timidinaquinasa de herpes (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45, 1981); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster et al., *Nature* 296:39-42,

35 1982); vectores de expresión procariotas, tal como el promotor de beta-lactamasa (Vi-

lla-Kamaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-31, 1978); o el promotor tac (DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25, 1983).

En el vector puede estar insertada una secuencia potenciadora para aumentar la transcripción en organismos eucariotas superiores de un DNA que codifica
5 (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Los potenciadores son elementos de DNA de acción cis, usualmente de una longitud de aproximadamente 10-300 pb, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición. Se encuentran en 5' y 3' respecto a la unidad de transcripción. Se conocen varios potenciadores disponibles para genes de
10 mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio y los potenciadores de adenovirus son elementos potenciadores ilustrativos para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador puede estar em-
15 palmado en el vector en una posición 5' o 3' respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆, está típicamente situado en el sitio 5' respecto al promotor.

Los vectores de expresión pueden construirse a partir de un vector de partida, tales como un vector comercialmente disponible. Tales vectores pueden contener o no
20 la totalidad de las secuencias flanqueantes deseadas. Cuando una o más de las secuencias flanqueantes descritas en la presente memoria no estén ya presentes en el vector, se pueden obtener individualmente y ligarse en el vector. Los métodos usados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes son bien conocidos por los expertos en la técnica.

25 Los vectores preferidos son los que son compatibles con las células hospedantes bacterianas, de insectos y de mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3 y pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alfa (solicitud de
30 patente PCT publicada N° WO 90/14363) y pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Vectores adicionales adecuados incluyen, pero sin limitación, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero se apreciará que el sistema vector debe ser compatible con la célula hospedante seleccionada. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos, tales como derivados del plásmido Bluescript® (el fagémido basado
35

122

5 en ColE1 de elevado número de copias, Stratagene), plásmidos de clonación por PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados por Taq (por ejemplo, derivados del plásmido TOPO® TA Cloning® Kit, PCR2.1®, Invitrogen) y vectores de mamíferos, levadura o virus, tales como un sistema de expresión de baculovirus (derivado del plásmido pBacPAK, Clontech).

10 Después de que ha sido construido el vector y se ha insertado una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el sitio apropiado del vector, el vector completado puede insertarse en una célula hospedante adecuada para amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ en una célula hospedante seleccionada puede conseguirse por métodos bien conocidos, incluyendo métodos tales como transfección, infección, electroporación, microinyección, lipofección, método del DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte función del tipo de célula hospedante que se va a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica y se exponen, por ejemplo, en Sambrook et al., *supra*.

20 Las células hospedantes pueden ser células hospedantes procariotas (tales como *E. coli*) o células hospedantes eucariotas (tales como una célula de levadura, insecto o vertebrado). La célula hospedante, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ que subsiguientemente puede ser recogido del medio de cultivo (si la célula hospedante lo secreta en el medio) o directamente de la célula hospedante que lo produce (si no es secretado). La selección de una célula hospedante apropiada dependerá de diversos factores, tales como niveles de expresión deseados, modificaciones del polipéptido que sean deseables o necesarias para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa.

30 En la técnica se conoce un gran número de células hospedantes adecuadas y muchas están disponibles en American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va. Ejemplos incluyen, pero sin limitación, células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células CHO DHFR(-) (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4216-20, 1980), células de riñón embrionarias humanas (HEK) 293 o 293T o células 3T3. La selección de células hospedantes adecuadas de mamíferos y los métodos para transformación, cultivo, amplificación, escrutinio, producción de producto y purificación son conocidos en la técnica. Otras líneas celulares de mamíferos adecuadas son líneas celulares de monos COS-1 y COS-7 y la línea celular CV-1.

Además las células hospedantes de mamíferos ilustrativas incluyen líneas celulares de primates y roedores, incluyendo líneas celulares transformadas. También son adecuadas células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, así como explantes primarios. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección que actúa dominantemente. Otras líneas celulares de mamíferos incluyen, pero sin limitación, células de neuroblastoma de ratón N2A, células HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, líneas celulares de hámster BHK o HaK. Cada una de estas líneas es conocida por los expertos en la técnica de expresión de proteínas.

Las células bacterianas son similarmente útiles como células hospedantes adecuadas. Por ejemplo, la diversas cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, DH5 α , DH10 y MC1061) son bien conocidas como células hospedantes en el campo de la biotecnología. También pueden emplearse en este método diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., otras *Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp.

Muchas cepas de células de levaduras conocidas por los expertos en la técnica están también disponibles como células hospedantes para la expresión de los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₅ y (D11C)hPYY₃₋₃₆. Las células de levadura preferidas incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Adicionalmente, cuando se desee, pueden utilizarse sistemas de células de insectos para la expresión de (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆. Dichos sistemas se describen, por ejemplo, en Kitts et al., 1993, *Biotechniques* 14:810-17; Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564-72, 1993; y Lucklow et al., *J. Virol*, 67:4566-79, 1993. Las células de insectos preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen).

Producción de los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆

Una línea de célula hospedante que comprende un vector de expresión de (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ puede ser cultivada usando medios estándares bien conocidos por los expertos en la técnica. Los medios contendrán usualmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Los medios adecuados para cultivar células *E. coli* incluyen, por ejemplo, caldo de Luria (abreviadamente LB por la expresión inglesa *Luria broth*) y/o caldo Terrific (abreviadamente TB por la expresión inglesa *Terrific broth*). Los medios adecuados para cultivar células eucariotas incluyen medio 1640 de Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), el medio esencial mínimo (MEM) y/o el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), todos los cuales pueden ser suplementados con suero y/o factores de creci-

12A

miento según sea necesario para la línea celular particular que se cultiva. Un medio adecuado para cultivos de células de insectos es el medio de Grace suplementado con yeastolato (extracto acuoso altamente filtrable de *Saccharomyces cerevisiae*), hidrolizado de lactalbúmina y/o suero de ternera fetal, según sea necesario.

- 5 Típicamente, se añade a los medios, como suplemento, un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de células transfectadas o transformadas. El compuesto que se ha de usar estará dictado por el elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el que se transformó la célula hospedante. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable es la resistencia a kanamicina, el
10 compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina. Otros compuestos para el crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina.

- La cantidad de un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ producida por una célula hospedante puede evaluarse usando métodos estándares conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, análisis por transferencia Western,
15 electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturizante, separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), ensayos de inmunoprecipitación y/o actividad, tales como ensayos de desplazamiento en gel de unión a DNA.

- Si un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ ha sido diseñado para ser secretado
20 por la línea de célula hospedante, la mayoría del polipéptido pueden encontrarse en el medio de cultivo de la célula. Si, sin embargo, el polipéptido no es secretado por las células hospedantes, estará presente en el citoplasma y/o el núcleo (para células hospedantes eucariotas) o en el citosol (para células hospedantes bacterianas gram-negativas).

- 25 Para un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ situado en el citoplasma y/o núcleo de la célula hospedante (para células hospedantes eucariotas) o en el citosol (para células hospedantes bacterianas), el material intracelular (incluyendo los cuerpos de inclusión para las bacterias gram-negativas) puede ser extraído de la célula hospedante usando cualquier técnica estándar conocida para los expertos en la técnica. Por
30 ejemplo, las células hospedantes pueden ser lisadas para liberar los contenidos del periplasma/citoplasma mediante homogenización en una prensa Francesa, y/o tratamiento con ultrasonidos, seguido por centrifugación.

- Si un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ ha formado cuerpos de inclusión en el citosol, los cuerpos de inclusión frecuentemente pueden fijarse en el interior y/o el
35 exterior de las membranas celulares y por tanto se encontrarán principalmente en el

material del sedimento después de la centrifugación. El material del sedimento puede tratarse luego a pH extremos o con un agente caotrópico, tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea o derivados de urea en presencia de un agente reductor, tal como ditioneitol a pH alcalino o tris-carboxietil-fosfina a pH ácido para liberar, disgregar y solubilizar los cuerpos de inclusión. El (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ solubilizado puede analizarse luego empleando electroforesis en gel, inmunoprecipitación, o similares. Si se desea aislar el polipéptido, el aislamiento puede realizarse usando métodos estándares, tales como los descritos en la presente memoria y en Marston et al., *Meth. Enz.* 182:264-75, 1990.

10 Si los cuerpos de inclusión no se forman en un grado significativo por expresión de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆ entonces el polipéptido se encontrará principalmente en el líquido sobrenadante después de la centrifugación del homege- neizado de células. El polipéptido puede aislarse luego del sobrenadante usando métodos tales como los descritos en la presente memoria.

15 La purificación de un (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ en solución puede lograrse usando una variedad de técnicas. Si el polipéptido ha sido sintetizado de tal modo que contiene una etiqueta, tal como Hexahistidina 9 u otro pequeño péptido tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o myc (Invitrogen) en cualquiera de sus extremos carboxilo o amino, puede purificarse en un proceso de una etapa haciendo pasar la solución a través de una columna de afinidad en donde la matriz de la columna tiene una alta afinidad por la etiqueta.

20 Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel. Por tanto, puede usarse para purificación una columna de afinidad para el níquel (tal como las columnas de níquel Qiagen®). Véase por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, 1993).

Adicionalmente, un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ puede purificarse mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que es capaz de reconocer y unirse específicamente a un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆.

30 En situaciones en las que se prefiere purificar parcialmente o completamente un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆, de tal modo que esté parcial o sustancialmente libre de contaminantes, pueden usarse métodos estándares conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, separación por electroforesis seguida por electroelución, diversos tipos de cromatografía (afinidad, inmutafinidad, tamiz molecular e intercambio iónico), HPLC y enfoque isoelectrico preparativo (má-

quina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific, San Francisco, CA). En algunos casos, pueden combinarse dos o más técnicas de purificación para conseguir una mayor pureza.

5 Son conocidos en la técnica cierto número de métodos adicionales para producir polipéptidos, y dichos métodos pueden usarse para producir los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆. Véase, por ejemplo, Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, 1997, que describe la producción de proteínas de fusión entre un mRNA y su péptido codificado. Véase también, Roberts, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-73, 1999.

10 Los procesos para producir péptidos o polipéptidos se describen también en las patentes de EE.UU. N^{os} 5.763.192; 5.814.476; 5.723.323; y 5.817.483. El proceso implica producir genes estocásticos o sus fragmentos, y luego introducir estos genes en células hospedantes que producen una o más proteínas codificadas por los genes estocásticos. Las células hospedantes se escrutan luego para identificar los clones
15 que producen péptidos o polipéptidos que tiene la actividad deseada. Otros procesos para la expresión de péptidos recombinantes se describen en las patentes de EE.UU. N^{os}: 6.103.495. 6.210.925. 6.627.438 y 6.737.250. El proceso utiliza *E. coli* y la vía secretora general de *E. coli*. El péptido está fusionado a una secuencia señal; por tanto, el péptido está dianizado para secreción.

20 Otro método para producir péptidos o polipéptidos se describe en la publicación de solicitud de patente PCT N^o WO 99/15650. El proceso publicado, denominado activación al azar de la expresión de genes para el descubrimiento de genes, implica la activación de la expresión de genes endógenos o sobre-expresión de un gen por métodos de recombinación *in situ*. Por ejemplo, la expresión de un gen endógeno es
25 activada o aumentada integrando una secuencia reguladora en la célula diana que es capaz de activar la expresión del gen por recombinación no homóloga o ilegítima. El DNA diana se somete primero a radiación y se inserta un promotor genético. El promotor finalmente localiza una rotura en el frente de un gen, iniciando la transcripción del gen. Esto da como resultado la expresión del péptido o polipéptido deseado.

30 Amidación

La amidación de un péptido, producido ya sea sintéticamente o recombinantemente, se consigue por una enzima denominada peptidil-glicina-alfa-amidante-monooxigenasa (PAM). Cuando se producen péptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ recombinantemente usando un sistema de expresión bacteriano, los
35 péptidos pueden ser amidados en el C terminal por una reacción *in vitro* usando la

enzima PAM recombinante. La fuente de enzima PAM, los métodos de su producción y purificación y los métodos que pueden usarse para amidar los péptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU: N^{os} 4.708.934, 5.789.234 y 6.319.685.

5

Anticuerpos selectivos para (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que específicamente se unen a los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆, con o sin pegilación en el sitio de sustitución de cisteína (como se ha descrito en la presente memoria), pero no se unen selectivamente al hPYY₃₋₃₆ natural, están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales, incluyendo policlonales monoespecíficos; monoclonales; recombinantes; quiméricos; humanizados, tales como injertados con regiones determinantes de la complementariedad (abreviadamente CDR por la expresión inglesa *Complementarity Determining Regions*); humanos; monocatenarios; y/o

10

Los anticuerpos pueden ser policlonales, incluyendo policlonales monoespecíficos; monoclonales; recombinantes; quiméricos; humanizados, tales como injertados con regiones determinantes de la complementariedad (abreviadamente CDR por la expresión inglesa *Complementarity Determining Regions*); humanos; monocatenarios; y/o

15

biespecíficos; así como fragmentos; variantes; o sus derivados. Los fragmentos de anticuerpos incluyen las porciones del anticuerpo que se une a un epítipo en el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Ejemplos de dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab') generados por escisión enzimáticas de anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos de unión incluyen los generados por técnicas de DNA

20

recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de los anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales dirigidos contra un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ generalmente se producen en animales (por ejemplo, conejos o ratones) por medio de inyecciones múltiples SC o IP de un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ y un adyuvante. Puede ser útil conjugar un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o un (D11C)hPYY₃₋₃₆ a una proteína portadora que sea inmunógena en la especie que se ha de inmunizar, tal como hemocianina de lapa bocallave, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja. Para mejorar la respuesta inmune también se usan agentes agregantes, tales como alumbre. Después de la inmunización,

25

los animales se sangran y el suero se analiza para determinar el título de anticuerpo anti-(E10C)hPYY₃₋₃₆ o anti-(D11C)hPYY₃₋₃₆.

30

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ se producen usando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo. Ejemplos

35

de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos

del hibridoma de Kohler et al., *Nature* 256:495-97, 1975, y el método del hibridoma de células B humanas (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001, 1984; Brodeur et al., *Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications*, 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). También se proporcionan por la invención líneas celulares de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales reactivos con los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆.

Los métodos preferidos para determinar la especificidad y afinidad de los anticuerpos monoclonales por inhibición competitiva pueden encontrarse en Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); *Current Protocols in Immunology* (Colligan et al., eds., Green Publishing Assoc. and Wiley Interscience, 1993); y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601, 1988.

Los anticuerpos quiméricos de la presente invención pueden comprender cadenas de inmunoglobulina individuales H y/o L. Una cadena H quimérica preferida comprende una región de unión al antígeno derivada de la cadena H de un anticuerpo no humano específico para un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ que está unida a al menos una porción de una región C de cadena H humana (C_H), tal como CH₁ o CH₂. Una cadena L quimérica preferida comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico para un polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ que está unido a al menos una porción de una región C de cadena L humana (C_L). Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica. Véase Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3273-77, 1984; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-55, 1984; Boulianne et al., *Nature* 312:643-46, 1984; Neuberger et al., *Nature* 314:268-70, 1985; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:3439-43, 1987; y Harlow and Lane, *supra*.

Los agentes de unión selectivos que tienen cadenas H y L quiméricas de la misma o diferente región variable también pueden prepararse por asociación apropiada de las cadenas individuales de polipéptidos, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, 1994) y Harlow and Lane, *supra*. Usando este método, las células hospedantes que expresan cadenas H quiméricas (o sus derivados) se cultivan separadamente de células hospedantes que expresan cadenas L quiméricas (o sus derivados) y las cadenas de inmunoglobulina se recuperan separadamente y luego se asocian. Alternativamente, las células hospedantes pueden cultivarse conjuntamente y dejar que las cadenas se asocien espontáneamente en el

medio de cultivo, seguido por recuperación de la inmunoglobulina ensamblada.

En otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo "humanizado". Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Véanse las patentes de EE.UU. 5.585.089 y 5.693.762. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más de residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. La humanización puede realizarse, por ejemplo, usando los métodos descritos en la técnica (Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann et al., 1998, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen et al., 1988, *Science* 239:1534-36), sustituyendo al menos una porción de una región determinante de la complementariedad (CDR) de roedores por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

Las técnicas para crear versiones de DNA recombinante de las regiones de unión a antígenos de moléculas de anticuerpos (es decir, Fab o fragmentos de la región variable) que evitan la generación de anticuerpos monoclonales están abarcadas por el alcance de la presente invención. En esta técnica las moléculas de RNA mensajero específicas del anticuerpo se extraen de las células del sistema inmune tomadas de un animal inmunizado y se transcriben en cDNA. El cDNA se clona luego en un sistema de expresión bacteriano. Un ejemplo de dicha técnica adecuada para la práctica de esta invención usa un sistema vector del bacteriófago lambda que tiene una secuencia delantera que hace que la proteína Fab expresada emigre al espacio periplásmico (entre la membrana celular bacteriana y la pared celular) o sea secretada. Se pueden generar rápidamente y escrutar grandes números de fragmentos Fab funcionales para aquellos que se unen al antígeno. Dichas moléculas de unión a (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ (fragmentos Fab con especificidad para los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆) están abarcadas específicamente dentro del término "anticuerpo" tal como se usa en la presente memoria.

También caen dentro del alcance de la invención las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos empalmando los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad para antígenos apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada (tal como la capacidad para activar el complemento humano y mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (abreviadamente ADCC por la expresión inglesa *Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity*)). Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-55, 1984; Neuberger et al., *Nature*, 312:604-08, 1984. Los agentes de unión selectivos, tales como los anticuerpos producidos por esta técnica están dentro del

136

alcance de la invención.

Se apreciará que la invención no está limitada a anticuerpos monoclonales de ratón o rata; de hecho, pueden usarse anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos pueden obtenerse usando hibridomas humanos. Por tanto están abarcados por la invención anticuerpos completamente humanos que se unen a los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Dichos anticuerpos se producen inmunizando con un antígeno (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ (opcionalmente conjugado a un vehículo) animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:2551-55, 1993; Jakobovits et al., *Nature* 362:255-58, 1993; Bruggemann et al., *Year in Immuno.* 7:33-40, 1993.

También están abarcados por la invención los anticuerpos humanos que se unen a los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆. Usando animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena, dichos anticuerpos se producen por inmunización con un antígeno polipeptídico (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ (es decir, que tienen al menos 6 aminoácidos contiguos), opcionalmente conjugados a un vehículo. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., 1993 *supra*; Jakobovits et al., *Nature* 362:255-58, 1993; Bruggemann et al., 1993, *supra*. En un método, dichos animales transgénicos se producen incapacitando los *loci* endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera, e insertando en su genoma *loci* que codifican proteínas humanas de cadenas pesadas y ligeras. Los animales parcialmente modificados, es decir, los que tiene menos del complemento completo de modificaciones, se crían cruzadamente para obtener un animal que tenga la totalidad de modificaciones deseadas del sistema inmune. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos con secuencias de aminoácidos humanas (en lugar de, por ejemplo, murinas), incluyendo regiones variables que son inmuno-específicas para estos antígenos. Véanse las publicaciones de solicitudes de patentes PCT N^{os}: WO 96/33735 y WO 94/02602. Métodos adicionales se describen en la patente de EE.UU. N^o 5.545.807, las publicaciones de solicitudes de patentes PCT: WO 91/10741 y WO 90/04036, y en la patente EP 0546073 B1 y la publicación de solicitud de patente PCT N^o WO 92/03918. Los anticuerpos humanos también pueden producirse por la expresión de DNA recombinante en células hospedantes o por expresión en células hibridoma como se ha descrito en la presente me-

moria.

En una realización alternativa, los anticuerpos humanos también pueden producirse a partir de genotecas que presentan fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581, 1991). Estos procesos mimetizan la selección inmune a través de la presentación de repertorios de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos y la subsiguiente selección de fagos por su unión al antígeno de elección. Una de dichas técnicas se describe en la publicación de solicitud de patente PCT N° WO 99/10494, que describe el aislamiento de anticuerpos agonísticos de alta afinidad y funcionales para los receptores MPL- y msk- usando dicho método.

Los anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados se producen típicamente por métodos recombinantes. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos se introducen en células hospedantes y se expresan usando materiales y métodos descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica. En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células hospedantes de mamíferos, tales como células CHO. Los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, humanos) pueden producirse por la expresión de DNA recombinante en células hospedantes o por expresión en células hibridomas como se ha descrito en la presente memoria.

Los anticuerpos anti-(E10C)hPYY₃₋₃₆ y anti-(D11C)hPYY₃₋₃₆ de la invención pueden emplearse en cualesquiera métodos de ensayo conocidos, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwiches directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) para la detección y cuantificación de los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆, así como la purificación de los polipéptidos. Los anticuerpos se unirán a los polipéptidos (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ con una afinidad que es apropiada para el método de ensayo que se emplea.

Los agonistas de PYY de la invención pueden proporcionarse en la forma de sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables para uso en el aspecto de método de la invención. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables representativas de los presentes compuestos incluyen las sales hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, citrato ácido, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato, palmitato, malonato, estearato, laurato, malato, borato,

hexafluorofosfato, naftilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares. Las sales de las variantes no pegiladas no necesitan ser farmacéuticamente aceptables cuando la variante ha de usarse como producto intermedio en la preparación del conjugado de la variante PEG-PYY₃₋₃₆.

5 Los agonistas de PYY de la presente invención se administrarán generalmente en la forma de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede, por ejemplo, estar en forma adecuada para administración oral (por ejemplo, comprimido, cápsula, píldora, polvo, solución, suspensión), para inyección parenteral (por ejemplo, solución, suspensión o emulsión estéril), para administración intranasal (por
10 ejemplo, gotas en aerosol, etc.), para administración rectal (por ejemplo, supositorio) o para administración transdérmica (por ejemplo, parche). La composición farmacéutica puede estar en una forma de dosificación unitaria adecuada para una sola administración de dosis precisas. La composición farmacéutica incluirá un vehículo farmacéutico convencional y un agonista de PYY de la invención como ingrediente activo. Además,
15 puede incluir otros agentes farmacéuticos, adyuvantes, etc.

Los métodos de preparar las diversas composiciones farmacéuticas de péptidos bioactivos son bien conocidos en la técnica de las ciencias farmacéuticas. Por ejemplo, véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2005/0009748 (para administración oral); y 2004/0157777, 2005/0002927 y 2005/0215475 (para administración transmucosal, por ejemplo, administración intranasal o bucal). Véase también *Remington: The Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 20nd ed. 2000.
20

Los agonistas de PYY de esta invención pueden usarse junto con otros agentes farmacéuticos para el tratamiento de estados o trastornos morbosos descritos en la presente memoria. Por tanto, también se proporcionan en la presente invención métodos de tratamiento que incluyen administrar los compuestos de la presente invención en combinación con otros agentes farmacéuticos.
25

Agentes farmacéuticos adecuados que pueden usarse en combinación con el agonista de PYY de la presente invención incluyen otros agentes anti-obesidad, tales como antagonistas del canabinoide-1 (CB-1) (tales como rimonabant), inhibidores de la 11 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa-1 (11 β -HSD tipo 1), agonistas de MCR-4, agonistas de colecistokinina-A (CCK-A), inhibidores de la recaptación de monoamina (tales como sibutramina), agentes simpatomiméticos, agonistas de los receptores β -adrenérgicos, agonistas de los receptores de dopamina (tales como bromocriptina),
30 análogos del receptor de la hormona estimuladora de melanocitos, agonistas del re-
35

ceptor 5HT2c, antagonistas de la hormona concentradora de melanina, leptina, análogos de leptina, agonistas de los receptores de leptina, antagonistas de galanina, inhibidores de lipasas (tales como tetrahidrolipstatina, es decir orlistat), agentes anorécticos (tales como un agonista de bombesina), antagonistas de los receptores del neuro péptido Y (por ejemplo, antagonistas del receptor Y5 del NPY), agentes tiromiméticos, deshidroepiandrosterona o uno de sus análogos, agonistas o antagonistas de los receptores de glucocorticoides, antagonistas del receptor de orexina, agonistas de los receptores del péptido-1 similar al glucagón, factores neurotróficos ciliares (tales como Axokine™ disponible en Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY y Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH), inhibidores de la proteína humana relacionada con el agutí (abreviadamente AGRP por la expresión inglesa *Agouti Related Protein*), antagonistas de los receptores de ghrelina, antagonistas o agonistas inversos del receptor 3 de la histamina, agonistas de los receptores U de neuromedina, inhibidores de MTP/ApoB (por ejemplo, inhibidores de MTP selectivos del intestino, tales como dirlo-
tapida) y similares.

Los agentes anti-obesidad preferidos para uso en combinación con los agonistas de PYY de la presente invención incluyen antagonistas del receptor CB-1, inhibidores de MTP selectivos del intestino, agonistas de CCKa, agonistas del receptor 5HT2c, antagonistas del receptor Y5 de NPY, orlistat y sibutramina. Los antagonistas del receptor CB-1 preferidos para uso en los métodos de la presente invención incluyen: rimonabant (SR141716A también conocido con la marca comercial Acomplia™) que es obtenible de Sanofi-Synthelabo o puede prepararse como se describe en la patente de EE.UU. 5.624.941; N-(piperidin-1-il)-1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-yodofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (AM251) que es obtenible en Tocris™, Ellisville, MO; [5-(4-bromofenil)-1-(2,4-dicloro-fenil)-4-etil-N-(1-piperidinil)-1H-pirazol-3-carboxamida] (SR147778) que puede prepararse como se describe en la patente de EE.UU. 6.645.985; N-(piperidin-1-il)-4,5-difenil-1-metilimidazol-2-carboxamida, N-(piperidin-1-il)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, N-(piperidin-1-il)-4,5-di-(4-metilfenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, N-ciclohexil-4,5-di-(4-metilfenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida, N-(ciclohexil)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida y N-(fenil)-4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-1-metilimidazol-2-carboxamida que pueden prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente PCT N° WO 03/075660; las sales hidrocloruro, mesilato y besilato de la amida del ácido 1-[9-(4-cloro-fenil)-8-(2-cloro-fenil)-9H-purin-6-il]-4-etilamino-piperidina-4-carboxílico que puede prepararse como se describe en la publi-

cación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0092520; amida del ácido 1-[7-(2-cloro-fenil)-8-(4-cloro-fenil)-2-metil-pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-il]-3-etilamino-azetidin-3-carboxílico y amida del ácido 1-[7-(2-cloro-fenil)-8-(4-cloro-fenil)-2-metil-pirazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-il]-3-metilamino-azetidin-3-carboxílico que puede prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0157839; 3-(4-cloro-fenil)-2-(2-cloro-fenil)-6-(2,2-difluoropropil)-2,4,5,6-tetrahidro-pirazolo[3,4-c]piridin-7-ona que puede prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0214855; 3-(4-cloro-fenil)-2-(2-cloro-fenil)-7-(2,2-difluoropropil)-6,7-dihidro-2H,5H-4-oxa-1,2,7-triaza-azulen-8-ona que puede prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2005/0101592; 2-(2-cloro-fenil)-6-(2,2,2-trifluoro-etil)-3-(4-trifluorometil-fenil)-2,6-dihidro-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona que puede prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2004/0214838; (S)-4-cloro-N-[[3-(4-cloro-fenil)-4-fenil-4,5-dihidro-pirazol-1-il]-metilamino-metilen]-bencenosulfonamida (SLV-319) y (S)-N-[[3-(4-cloro-fenil)-4-fenil-4,5-dihidro-pirazol-1-il]-metilamino-metilen]-4-trifluorometil-bencenosulfonamida (SLV-326) que puede prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente PCT N°. WO 02/076949; N-piperidino-5-(4-bromofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-etilpirazol-3-carboxamida que puede prepararse como se describe en la patente de EE.UU. 6.432.984; 1-[bis-(4-cloro-fenil)-metil]-3-[(3,5-difluoro-fenil)-metanosulfonil-metilen]-azetidina que puede prepararse como se describe en la patente de EE.UU. 6.518.264; 2-(5-(trifluorometil)piridin-2-iloxi)-N-(4-(4-clorofenil)-3-(3-cianofenil)butan-2-il)-2-metilpropanamida que puede prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente PCT N° WO 04/048317; 4-[[6-metoxi-2-(4-metoxifenil)-1-benzofuran-3-il]carbonil]benzonitrilo (LY-320135) que puede prepararse como se describe en la patente de EE.UU. 5.747.524; 1-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(4-fluorofenil)-benzo[1,3]dioxol-5-sulfonil]-piperidina que puede prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente PCT N° WO 04/013120; y [3-amino-5-(4-clorofenil)-6-(2,4-diclorofenil)-furo[2,3-b]piridin-2-il]-fenil-metanona que puede prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente PCT N° WO 04/012671.

Los inhibidores de MTP de acción intestinal preferidos para uso en las combinaciones, composiciones farmacéuticas, y métodos de la invención incluyen dirilotapida ((S)-N-[2-[bencil(metil)amino]-2-oxo-1-feniletil]-1-metil-5-[4'-(trifluorometil)[1,1'-bifenil]-2-carboxamido]-1H-indol-2-carboxamida) y (carbamoil-fenil-metil)-amida del ácido 1-metil-5-[(4'-trifluorometil-bifenil-2-carbonil)-amino]-1H-indol-2-carboxílico que ambos

pueden prepararse usando los métodos descritos en la patente de EE.UU. N° 6.720.351; (pentilcarbamoil-fenil-metil)-amida del ácido (S)-2-[(4'-trifluorometil-bifenil-2-carbonil)-amino]-quinolin-6-carboxílico, {[(4-fluoro-bencil)-metil-carbamoil]-fenilmetil}-amida del ácido (S)-2-[(4'-terc.butil-bifenil-2-carbonil)-amino]-quinolin-6-carboxílico, y

5 [(4-fluoro-bencilcarbamoil)-fenil-metil]-amida del ácido (S)-2-[(4'-terc.butil-bifenil-2-carbonil)-amino]-quinolin-6-carboxílico los cuales todos pueden prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2005/0234099A1, (-)-4-[4-[4-[4-[(2S,4R)-2-(4-clorofenil)-2-[(4-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)sulfanil]metil-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazin-1-il]fenil]-2-(1*R*)-1-metilpropil]-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-

10 triazol-3-ona (también conocida como Mitratapida o R103757) que puede prepararse como se describe en las patentes de EE.UU. N°s 5.521.186 y 5.929.075; y implitapida (BAY 13-9952) que puede prepararse como se describe en la patente de EE.UU. N° 6.265.431. El más preferido es dirlotapida, mitratapida, (pentilcarbamoil-fenil-metil)-amida del ácido (S)-2-[(4'-trifluorometil-bifenil-2-carbonil)-amino]-quinolin-6-carboxílico,

15 {[(4-fluoro-bencil)-metil-carbamoil]-fenil-metil}-amida del ácido (S)-2-[(4'-terc.butil-bifenil-2-carbonil)-amino]-quinolin-6-carboxílico o [(4-fluorobencilcarbamoil)-fenil-metil]-amida del ácido (S)-2-[(4'-terc.butil-bifenil-2-carbonil)-amino]-quinolin-6-carboxílico. El antagonista del receptor Y5 de NPY preferido incluye: 2-oxo-N-(5-fenilpirazinil)espiro[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina]-1'-carboxamida que puede pre-

20 pararse como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N°. 2002/0151456; y 3-oxo-N-(5-fenil-2-pirazinil)-espiro[isobenzofuran-1(3*H*), 4'-piperidina]-1'-carboxamida; 3-oxo-N-(7-trifluorometilpirido[3,2-*b*]piridin-2-il)-espiro-[isobenzofuran-1(3*H*),4'-piperidina]-1'-carboxamida; N-[5-(3-fluorofenil)-2-pirimidinil]-3-oxoespiro[isobenzofuran-1(3*H*),[4'-piperidina]-1'-carboxamida; *trans*-3'-oxo-N-(5-fenil-2-

25 pirimidinil)] espiro[ciclohexan-1,1'(3'*H*)-isobenzofuran]-4-carboxamida; *trans*-3'-oxo-N-[1-(3-quinolil)-4-imidazolil]espiro[ciclohexan-1,1'(3'*H*)-isobenzofuran]-4-carboxamida; *trans*-3-oxo-N-(5-fenil-2-pirazinil)espiro[4-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-ciclohexan]-4'-carboxamida; *trans*-N-[5-(3-fluorofenil)-2-pirimidinil]-3-oxoespiro[5-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-ciclohexano]-4'-carboxamida; *trans*-N-[5-(2-fluorofenil)-2-pirimidinil]-3-

30 oxoespiro[5-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-ciclohexan]-4'-carboxamida; *trans*-N-[1-(3,5-difluorofenil)-4-imidazolil]-3-oxoespiro[7-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-ciclohexan]-4'-carboxamida; *trans*-3-oxo-N-(1-fenil-4-pirazolil)espiro[4-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-ciclohexan]-4'-carboxamida; *trans*-N-[1-(2-fluorofenil)-3-pirazolil]-3-oxoespiro[6-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-ciclohexan]-4'-carboxamida; *trans*-3-oxo-N-(1-fenil-3-

35 pirazolil)espiro[6-azaisobenzofuran-1(3*H*),1'-ciclohexan]-4'-carboxamida; y *trans*-3-oxo-

N-(2-fenil-1,2,3-triazol-4-il)espiro[6-azaisobenzofuran-1(3H),1'-ciclohexan]-4'-

carboxamida, todos los cuales pueden prepararse como se describe en la publicación de solicitud de patente PCT N° WO 03/082190; y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. Todas las patentes y publicaciones de solicitudes de patentes de EE.UU. citadas en lo que antecede se incorporan en la presente memoria como referencia.

En el aspecto de métodos de la invención, un agonista de PYY de la invención, solo o en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticos, se administra periféricamente a un sujeto separadamente o junto en cualquiera de los métodos convencionales de administración periférica conocidos en la técnica. Por consiguiente, el agonista de PYY o la combinación puede administrarse a un sujeto parenteralmente (por ejemplo, intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente o subcutáneamente), intranasalmente, oralmente, sublingualmente, bucalmente, por inhalación (por ejemplo, por aerosol), rectalmente (por ejemplo, por supositorios) o transdérmicamente. La administración parenteral es un método preferido de administración y la administración subcutánea es un método preferido de administración parenteral.

Las composiciones adecuadas para inyección parenteral generalmente incluyen soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles, acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de excipientes o diluyentes acuosos y no acuosos adecuados (incluyendo disolventes y vehículos) incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), sus mezclas adecuadas, triglicéridos incluyendo aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo.

Estas composiciones para inyección parenteral también pueden contener excipientes tales como agentes conservantes, humectantes, solubilizantes, emulsionantes y dispersantes. La prevención de contaminación por microorganismos de las composiciones puede conseguirse con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenes, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de composiciones farmacéuticas inyectables puede conseguirse aproximadamente por el uso de agentes capaces de retrasar la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Los agonistas de PYY de la presente invención se administrarán a un sujeto a una dosis que varía dependiendo de cierto número de factores, incluyendo el modo de

administración, la edad y peso del sujeto, la gravedad de la enfermedad, el estado o el trastorno que se trate y la actividad farmacológica del agonista de PYY que se administre. La determinación de los intervalos de dosis y las dosificaciones óptimas para un paciente particular están dentro del alcance del experto ordinario en la técnica.

- 5 Para administración parenteral, los agonistas de PYY de la presente invención pueden administrarse a un sujeto humano a niveles de dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg/dosis en un régimen de dosificación basado en la variante no pegilada. Por ejemplo, para mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆, el nivel de dosificación parenteral estaría en el intervalo de
- 10 aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg/dosis en un régimen de dosificación basado en un (E10C)hPYY₃₋₃₆, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg/dosis, o aproximadamente 0,05 ó 0,1 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg/dosis, o aproximadamente 0,05 ó 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,3 ó 0,5 mg/kg/dosis. Por ejemplo, una dosis de 85 mg de
- 15 mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ que tiene un peso molecular de aproximadamente 34024 Da (PEG de 30 kDa más 4024, el peso molecular del péptido no pegilado), es equivalente a 10 mg basado en (E10C)hPYY₃₋₃₆ no pegilado. El régimen de dosificación puede ser uno o más o más dosis diarias, preferiblemente antes de una comida, o particularmente se prefiere con el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆
- 20 o el mPEG de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆, un régimen de dosificación de 2 ó 3 veces a la semana o una vez a la semana o una vez cada 10-14 días

En los Ejemplos siguientes se ilustran realizaciones de la presente invención. Ha de entenderse, sin embargo, que las realizaciones de la invención no están limitadas a los detalles específicos de estos Ejemplos, puesto que se conocerán otras variaciones de los mismos, o serán evidentes a la luz de la presente descripción y reivindicaciones anexas, para el experto ordinario en la técnica. Todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

mPEG lineal de 20K y de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

Este ejemplo proporciona la preparación de (E10C)hPYY₃₃₋₃₆ sustancialmente homogéneo y monopegilado con mPEG (30K ó 20K) unido en el residuo 10.

(a) Preparación de (E10C)hPYY₃₋₃₆

- 35 El (E10C)PYY₃₋₃₆ se sintetizó por el método de la fase sólida usando la estra-

tegia Fmoc con activación por hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio (HBTU) (Fastmoc, ciclos de 0,15 mmoles) usando un sintetizador de péptidos automático (modelo 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA). Los grupos protectores de las cadenas laterales usados fueron Trt para Asn, Gln, Cys y His; tBu para Ser, Thr y Tyr; Boc para Lys; OtBu para Asp y Glu; y Pbf para Arg. La escisión del péptido-resina se completó con una mezcla de 9 mL de ácido trifluoroacético (TFA), 0,5 g de fenol, 0,5 mL de H₂O, 0,5 mL de tioanisol y 0,25 mL de 1,2-etanoditiol a temperatura ambiente durante 4 horas. El péptido se precipitó en éter etílico enfriado con hielo y se lavó con éter etílico, se disolvió en DMSO y se purificó por HPLC en fase inversa en una columna Waters Deltapak C18, 15 µm, 100 Å, DI 50 x 300 mm (nº de catálogo WAT011801, Waters, Milford, MA) usando un gradiente lineal de 100% de disolvente A:0% de disolvente B a 70% de disolvente A:30% de disolvente B en 30 minutos a un caudal de 80 mL/min. El disolvente A es una solución acuosa al 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético). El disolvente B es una solución al 0,1% de TFA en acetonitrilo. La masa molecular del péptido purificado se confirmó por ESI-MS (M_{media} = 4024) y la pureza se determinó por HPLC en fase inversa (Figura 1)

(b) Preparación de mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG lineal-maleimida de un peso molecular de aproximadamente 30.000 (Sunbright ME-300MA, NOF Corporation, Tokyo, Japón) se acopló selectivamente a (E10C)hPYY₃₋₃₆ en el grupo sulfhidrilo de la cisteína en el residuo 10. El mPEG lineal de 30K-maleimida, disuelto en HEPES 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o alternativamente, en acetato de sodio 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para proporcionar una concentración de péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa PEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5-24 horas. Las reacciones en HEPES pH 7,0 se detuvieron por dilución en acetato de sodio 20 mM pH 4,5, para la inmediata purificación por cromatografía de intercambio catiónico. Las mezclas de reacción en acetato de sodio 20 mM se cargaron directamente en la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se determinaron por SEC-HPLC (Figura 2).

(c) Purificación de mPEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

La especie (E10C)hPYY₃₋₃₆ pegilada se purificó a partir de la mezcla de reac-

ción hasta >95% usando una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico. El (E10C)hPYY₃₋₃₆ mono-pegilado se purificó del (E10C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y las especies de mayor peso molecular usando cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de PEG lineal de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg de proteína), como se ha descrito antes, se fraccionó en una columna SP-Sephacrose Hitrap (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 (tampón A). La mezcla de reacción se diluyó 7 veces con tampón A y se cargó en la columna a un caudal de 2,5 mL/min. La columna se lavó con 5-10 volúmenes de columna de tampón A. Subsiguientemente, las diversas especies de (E10C)hPYY₃₋₃₆ se eluyeron de la columna en 20 volúmenes de columna con un gradiente lineal de NaCl de 0-100 mM. El eluyente se monitorizó por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se reunieron a medida que se extendía la pegilación, que se determinó por SDS-PAGE® (Figura 3). La masa reunida purificada se concentró luego hasta 0,5-5 mg/mL en un concentrador Centriprep 3 (Amicon Technology Corporation, Northborough, MA) o, alternativamente, usando un concentrador Vivaspin 10K (Vivascience Sartorius Group, Hannover, Alemania). La concentración de proteínas de la masa reunida purificada se determinó comparando el área de los picos de la RP HPLC con la de una curva patrón para PYY₃₋₃₆ (no mostrada) o, alternativamente, la concentración de la masa reunida purificada se determinó por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción obtenido experimentalmente. Se obtuvo el perfil de una masa reunida purificada de (E10C)hPYY₃₋₃₆ pegilado usando SEC-HPLC como se muestra en la Figura 6.

(d) Preparación de mPEG lineal de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG lineal-maleimida de PM aproximadamente 20.000 (Sunbright ME-200MA, NOF Corporation) se acopló selectivamente a (E10C)hPYY₃₋₃₆ en el grupo sulfhidrilo de la cisteína en el residuo 10. El mPEG lineal de 20K-maleimida, disuelto en acetato de sodio 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para proporcionar una concentración de péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1,3:1. Las reacciones se realizaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos seguido por 16 horas a 4°C. Las mezclas de reacción en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, se cargaron directamente sobre la columna de cromatografía de cambio catiónico. Los productos de reacción se determinaron por SEC-HPLC.

190

(e) Purificación de mPEG lineal de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

La especie (E10C)hPYY₃₋₃₆ pegilada se purificó de la mezcla de reacción hasta >95% usando una sola etapa de cromatografía de intercambio catiónico. El (E10C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado se separó del PEG libre, el (E10C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y las especies de mayor peso molecular usando cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de mPEG lineal de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (20 mg de proteína), como se ha descrito antes, se fraccionó en una columna SP-Sepharose Hitrap (5 mL) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 (tampón A). La mezcla de reacción se cargó en la columna a un caudal de 1,0 mL/min. La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón A a un caudal de 2,5 mL/min. Subsiguientemente, las diversas especies de (E10C)hPYY₃₋₃₆ se eluyeron de la columna en 25 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl de 0-200 mM a un caudal de 2,5 mL/min. El eluyente se monitorizó por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se reunieron cuando se completó la pegilación, determinada por SEC-HPLC. La masa reunida purificada se concentró luego a 0,5-5 mg/mL usando un concentrador Vivaspín 10K (Vivascience Sartorius Group). La concentración de proteína de la masa reunida purificada se determinó por absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción obtenido experimentalmente. El rendimiento del proceso total del mono-mPEG de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ fue 38 %. Se determinó por SEC-HPLC que la masa reunida purificada de mono-mPEG de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ tenía una pureza de 96%.

25

Ejemplo 2

mPEG lineal de 30K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

Este ejemplo demuestra la preparación de (D11C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado sustancialmente homogéneo con el mPEG unido en el residuo 11.

30

(a) Preparación de (D11C)hPYY₃₋₃₆

Se sintetizó (D11C)hPYY₃₋₃₆ por el método de fase sólida usando la estrategia de Fmoc con activación por hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio (HBTU) (Fastmoc, ciclos de 0,15 moles) usando un sintetizador automático de péptidos (modelo 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA). Los grupos de protección de las cadenas laterales usados fueron Trt para Asn, Gln, Cys y His; tBu

35

para Ser, Thr, y Tyr; Boc para Lys; OtBu para Asp y Glu; y Pbf para Arg. La escisión de péptido-resina se completó con una mezcla de 9 mL de ácido trifluoroacético (TFA), 0,5 g de fenol, 0,5 mL de H₂O, 0,5 mL de tioanisol y 0,25 mL de 1,2-etanoditiol a temperatura ambiente durante 4 horas. El péptido se precipitó en éter etílico enfriado con hielo y se lavó con éter etílico disuelto en DMSO y se purificó por HPLC en fase inversa en una columna Waters Deltapak C18, 15 µm, 100 Å, DI 50 x 300 mm (Nº de catálogo WAT011801, Waters, Milford, MA) usando un gradiente lineal de 100% de disolvente A:0% de disolvente B hasta 70% de disolvente A:30% de disolvente B en 30 minutos a un caudal de 80 mL/min. El disolvente A era una solución acuosa al 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético). El disolvente B era una solución al 0,1% de TFA en acetonitrilo. La masa molecular del péptido purificado se confirmó por ESI-MS ($M_{media} = 4038$) y la pureza se determinó por HPLC en fase inversa (Figura 4)

(b) Preparación de mPEG lineal de 30K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG lineal-maleimida de un peso molecular de aproximadamente 30.000 (Sunbright ME-300MA, NOF Corporation, Tokyo, Japón) se acopló selectivamente a (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el grupo sulfhidrilo de la cisteína en el residuo 11. El mPEG lineal de 30K-maleimida, disuelto en HEPES 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0 se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para dar una concentración de péptido 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5-24 horas. Las reacciones se detuvieron por dilución en acetato de sodio 20 mM pH 4,5, para la inmediata purificación por cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se analizaron por SEC-HPLC (Figura 5).

Alternativamente, en lugar de disolver el mPEG lineal de 30K-maleimida en HEPES como se ha descrito antes, se disolvió en acetato de sodio 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4,5, y se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para dar una concentración del péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5-24 horas. Las mezclas de reacción se cargaron directamente en la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se analizaron por SEC-HPLC.

142

(c) Purificación de mPEG lineal de 30K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

La especie (D11C)hPYY₃₋₃₆ pegilada se purificó de la mezcla de reacción hasta >95% usando una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico. El (D11C)hPYY₃₋₃₆ mono-pegilado se purificó a partir de (D11C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y especies de mayor peso molecular usando cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de mPEG lineal de 30K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg de proteína), como se ha descrito antes, se fraccionó en una columna de SP-Sepharese Hitrap (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4.5 (Tampón A). Las mezclas de reacción a pH 7,0 se diluyeron 7 veces con tampón A y se cargaron en la columna a un caudal de 2,5 mL/min. La columna se lavó con 5-10 volúmenes de columna de tampón A. Subsiguientemente, las diversas especies de (D11C)hPYY₃₋₃₆ se eluyeron de la columna en 20 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl de 0-100 mM. El eluyente se monitorizó para absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se reunieron a medida que se extendía la pegilación, que se determinó por SEC HPLC. La masa reunida purificada se concentró luego a 0,5-5 mg/mL en un concentrador Vivaspin 10K (Vivascience Sartorius Group, Hannover, Alemania). La concentración de proteínas de la masa reunida purificada se determinó comparando el área del pico de HPLC de fase inversa con la curva patrón de PYY₃₋₃₆ (no mostrada). Se obtuvo el perfil de una masa reunida purificada de (D11C)hPYY₃₋₃₆ pegilado usando SEC-HPLC (cromatografía de exclusión por tamaño molecular + cromatografía de líquidos de alta resolución) como se muestra en la Figura 7.

Alternativamente, las mezclas de reacción a pH 4,5, de (b) anterior, se cargaron directamente sobre la columna a un caudal de 2,5 mL/min y se determinó la concentración de la masa reunida purificada por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción derivado experimentalmente.

Ejemplo 3

mPEG ramificado de 43K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

Este ejemplo demuestra la preparación de (E10C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado sustancialmente homogéneo con mPEG unido en el residuo 10.

(a) Preparación de mPEG ramificado de 43K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG ramificado-maleimida de peso molecular aproximadamente

43.000 (Sunbright GL2-400MA, NOF Corporation, Tokyo, Japón) se acopló selectivamente a (E10C)hPYY₃₋₃₆ preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1(a), en el grupo sulfhidrido de la cisteína en el residuo 10.

El mPEG ramificado de 43K-maleimida, disuelto en HEPES 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 7,0, se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para dar una concentración de péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5-24 horas. Las reacciones en HEPES, pH 7,0, se detuvieron por dilución en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, para inmediata purificación por cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se analizaron por SEC-HPLC (Figura 8).

Alternativamente, mPEG ramificado de 43K-maleimida, disuelto en acetato de sodio 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4,5, y se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para dar una concentración de péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las mezclas de reacción se cargaron directamente sobre la columna de cromatografía de intercambio catiónico.

(b) Purificación de mPEG ramificado de 43K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado

La especie mPEG ramificado de 43K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ monopegilada se separó de (E10C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y las especies de mayor peso molecular usando una sola etapa de cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de mPEG ramificado de 43K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg de proteína), como se ha descrito antes, se fraccionó en una columna de SP-Sepharose Hitrap (5 mL) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 (tampón A). Las mezclas de reacción a pH 7,0 se diluyeron 10 veces con tampón A y se cargaron en la columna a un caudal de 2.5 mL/min. La columna se lavó con 5-10 volúmenes de columna de tampón A. Subsiguientemente, las diversas especies de (E10C)hPYY₃₋₃₆ se eluyeron de la columna en 20 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl de 0-100 mM. El eluyente se monitorizó por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se reunieron a medida que se producía la pegilación, que se determinó por SEC-HPLC. La masa reunida purificada se concentró luego hasta 0,5-5 mg/mL en un concentrador Centriprep 3 (Amicon Technology Corporation) o, alternativamente, usando un concentrador Vivaspin 10K (Vivascience Sartorius Group). La concentra-

149

ción de proteínas de la masa reunida purificada se cuantificó por análisis de aminoácidos. Se obtuvo el perfil de una masa reunida de mPEG ramificado de 43 K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado usando SEC-HPLC como se muestra en la Figura 9.

5 Alternativamente, la concentración en proteína se determinó comparando el área del pico de RP HPLC con una curva patrón de PYY₃₋₃₆ (no mostrada) o por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción obtenido experimentalmente.

Ejemplo 4

10 Este ejemplo describe la preparación de (E10C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado sustancialmente homogéneo con mPEG lineal de 12 kD, o mPEG ramificado de 20 kD, unido en el residuo 10, y la preparación de (D11C)hPYY₃₋₃₆ sustancialmente homogéneo monopegilado con mPEG lineal de 20 kD, mPEG lineal de 12 kD o mPEG ramificado de 20 kD, unido en el residuo 11.

15

(a) Preparación de mPEG lineal de 12K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG lineal-maleimida de PM aproximadamente 12.000 (Sunbright ME-120MA, NOF Corporation) se acopló selectivamente a (E10C)hPYY₃₋₃₆ en el grupo sulfhidrilo de la cisteína en el residuo 10. El mPEG lineal de 12K-maleimida, disuelto en acetato de sodio 20mM (Sigma Chemical) pH 4,5, se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para proporcionar una concentración del péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5 a 24 horas. Las mezclas de reacción en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, se cargaron directamente en la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se determinaron por SEC-HPLC o SDS-PAGE.

25

(b) Purificación de mPEG lineal de 12K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

30 La especie (E10C)hPYY₃₋₃₆ pegilada se purificó de la mezcla de reacción hasta >95% usando una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico. El (E10C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado se separó del PEG libre, el (E10C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y las especies de mayor peso molecular usando cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de mPEG lineal de 12K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg de proteína), como se ha descrito antes, se fraccionó en una columna SP-Sepharose Hitrap (5

35

745

mL) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 (Tampón A). La mezcla de reacción se cargó sobre la columna a un caudal de 1,0 mL/min. La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón A a un caudal de 2,5 mL/min. Subsiguientemente, las diversas especies de (E10C)hPYY₃₋₃₆ se eluyeron de la columna en 25 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl de 0-200 mM a un caudal de 2,5 mL/min. El eluyente se monitorizó por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se reunieron cuando se completó la pegilación, determinada por SEC-HPLC. La masa reunida purificada se concentró luego a 0,5-5 mg/mL usando un concentrador Vivaspin 10K (Vivascience Sartorius Group). La concentración de proteína de la masa reunida purificada se determinó por absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción obtenido experimentalmente. Se obtuvo el perfil de un mPEG de 12K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ usando SEC-HPLC o SDS-PAGE .

15 (c) Preparación de mPEG ramificado de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG ramificado-maleimida de PM aproximadamente 20.000 (Sunbright GL2-200MA, NOF Corporation) se acopló selectivamente a (E10C)hPYY₃₋₃₆ en el grupo sulfhidrilo de la cisteína en el residuo 10. El mPEG ramificado de 20K-maleimida, disuelto en acetato de sodio 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para proporcionar una concentración de péptido de 1 mg/ mL y una relación molar relativa mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5 a 24 horas. Las mezclas de reacción en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, se cargaron directamente en la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se determinaron por SEC-HPLC o SDS-PAGE.

(d) Purificación de mPEG ramificado de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆

La especie (E10C)hPYY₃₋₃₆ pegilada se purificó de la mezcla de reacción hasta >95% usando una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico. El (E10C)hPYY₃₋₃₆ se separó del PEG libre, el (E10C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y las especies de mayor peso molecular usando cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de mPEG ramificado de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg de proteína), como se describió antes, se fraccionó en una columna SP-Sepharose Hitrap (5 mL)(Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5

(Tampón A). La mezcla de reacción se cargó en la columna a un caudal de 1,0 mL/min. La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón A a un caudal de 2,5 mL/min. Subsiguientemente, las diversas especies de (E10C)hPYY₃₋₃₆ se eluyeron de la columna en 25 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl de 0-200 mM a un caudal de 2,5 mL/min. El eluyente se monitorizó por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se reunieron cuando se completó la pegilación, determinada por SEC-HPLC. La masa reunida purificada se concentró luego a 0,5-5 mg/mL usando un concentrador Vivaspin 10K (Vivascience Sartorius Group). La concentración de proteína de la masa reunida purificada se determinó por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción obtenido experimentalmente. Se obtuvo el perfil de una masa reunida purificada de mPEG ramificado de 20K- maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ usando SEC-HPLC o SDS-PAGE.

(e) Preparación de mPEG lineal de 20K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG lineal-maleimida de PM aproximadamente 20.000 (Sunbright ME-200MA, NOF Corporation) se acopló selectivamente a (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el grupo sulfhidrido de la cisteína en el residuo 11. El mPEG lineal de 20K-maleimida, disuelto en acetato de sodio 20 mM (Sigma Chemical) pH 4,5, se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para proporcionar una concentración del péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5 a 24 horas. Las mezclas de reacción en acetato de sodio 20 mM, pH 4.5, se cargaron directamente en la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se determinaron por SEC-HPLC o SDS-PAGE.

(f) Purificación de mPEG lineal de 20K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

La especie (D11C)hPYY₃₋₃₆ pegilada se purificó de la mezcla de reacción hasta >95% usando una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico. El (D11C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado se separó del PEG libre, el (D11C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y las especies de mayor peso molecular usando cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de mPEG lineal de 20K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg de proteína), como se describió antes, se fraccionó en una columna SP-Sepharose Hitrap (5 mL) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 (Tampón A). La mezcla de reacción se cargó en la columna a un caudal de

107

1,0 mL/min. La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón A a un caudal de 2,5 mL/min. Subsiguientemente, las diversas especies de (D11C)hPYY₃₋₃₆ se eluyeron de la columna en 25 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl de 0-200 mM a un caudal de 2,5 mL/min. El eluyente se monitorizó por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se reunieron cuando se completó la pegilación, determinada por SEC-HPLC. La masa reunida purificada se concentró luego a 0,5-5 mg/mL usando un concentrador Vivaspin 10K (Vivascience Sartorius Group). La concentración de proteínas de la masa reunida purificada se determinó por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción obtenido experimentalmente. Se obtuvo el perfil de una masa reunida purificada de mPEG de 20K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆ usando SEC-HPLC o SDS-PAGE.

(g) Preparación de mPEG lineal de 12K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG lineal-maleimida de PM aproximadamente 12.000 (Sunbright ME-120MA, NOF Corporation) se acopló selectivamente a (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el grupo sulfhidrido de la cisteína en el residuo 10. El mPEG lineal de 12K-maleimida, disuelto en acetato de sodio 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para proporcionar una concentración de péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5 a 24 horas. Las mezclas de reacción en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, se cargaron directamente en la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se determinaron por SEC-HPLC o SDS-PAGE.

(h) Purificación de mPEG lineal de 12K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

La especie (D11C)hPYY₃₋₃₆ pegilada se purificó de la mezcla de reacción hasta >95% usando una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico. El (D11C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado se separó del PEG libre, el (D11C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y las especies de mayor molecular usando cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de mPEG lineal de 12K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg de proteína), como se describió antes, se fraccionó en una columna SP-Sepharose Hitrap (5 mL) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 (Tampón A). La mezcla de reacción se cargó en la columna a un caudal de 1,0 mL/min. La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón A a un caudal de

2,5 mL/min. Subsiguientemente, las diversas especies de (D11C)hPYY₃₋₃₆ se eluyeron de la columna en 25 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl de 0-200 mM a un caudal de 2,5 mL/min. El eluyente se monitorizó por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se reunieron cuando se completó la pegilación, determinada por SEC-HPLC. La masa reunida purificada se concentró luego a 0,5-5 mg/mL usando un concentrador Vivaspin 10K (Vivascience Sartorius Group). La concentración de proteína de la masa reunida purificada se determinó por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción obtenido experimentalmente. Se obtuvo el perfil de una masa reunida purificada de mPEG de 12K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆ usando SEC-HPLC o SDS-PAGE.

(i) Preparación de mPEG ramificado de 20K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

El reactivo mPEG ramificado-maleimida de PM aproximadamente 20.000 (Sunbright GL2-200MA, NOF Corporation) se acopló selectivamente a (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el grupo sulfhidrilo de la cisteína en el residuo 10. El mPEG ramificado de 20K-maleimida, disuelto en acetato de sodio 20 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hizo reaccionar inmediatamente con el péptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ por adición directa del péptido para proporcionar una concentración de péptido de 1 mg/mL y una relación molar relativa mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ de aproximadamente 1:1. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 0,5 a 24 horas. Las mezclas de reacción en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, se cargaron directamente en la columna de cromatografía de intercambio catiónico. Los productos de reacción se determinaron por SEC-HPLC o SDS-PAGE.

(j) Purificación de mPEG ramificado de 20K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆

La especie (D11C)hPYY₃₋₃₆ pegilada se purificó de la mezcla de reacción hasta >95% usando una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico. El (D11C)hPYY₃₋₃₆ monopegilado se separó del PEG libre, el (D11C)hPYY₃₋₃₆ no modificado y las especies de mayor tamaño molecular usando cromatografía de intercambio catiónico. Una mezcla de reacción típica de mPEG ramificado de 20K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg de proteína), como se ha descrito antes, se fraccionó en una columna SP-Sepharose Hitrap (5 mL) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 (tampón A). La mezcla de reacción se cargó en la columna a un caudal de 1,0 mL/min. La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón A a un caudal de 2,5 mL/min. Subsiguientemente, las diversas especies de (D11C)hPYY₃₋₃₆

se eluyeron de la columna en 25 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl de 0-200 mM a un caudal de 2,5 mL/min. El eluyente se monitorizó por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron las fracciones de tamaño apropiado. Las fracciones se recogieron hasta que se completó la pegilación, determinada por SEC-HPLC. La masa reunida purificada se concentró luego a 0,5-5 mg/mL usando un concentrador Vivaspin 10K (Vivascience Sartorius Group). La concentración de proteína de la masa reunida purificada se determinó por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción obtenidos experimentalmente. Se obtuvo el perfil de una masa reunida purificada de mPEG ramificado de 20K-maleimida- (D11C)hPYY₃₋₃₆ usando SEC-HPLC o SDS-PAGE.

10

Ejemplo 5

Caracterización bioquímica

El (E10C)hPYY₃₋₃₆, el (D11C)hPYY₃₋₃₆ y las formas pegiladas de (E10C)hPYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆ se caracterizaron por diversos métodos bioquímicos incluyendo espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI-MS), electroforesis sobre dodecilsulfato sódico-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cromatografía de exclusión por tamaño molecular - cromatografía de líquidos de alta resolución (SEC- HPLC) y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (RP HPLC), respectivamente.

(A) La espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI-MS) se llevó a cabo en un espectrómetro de masas con ionización por electropulverización serie 1100 LC/MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) en el modo positivo. (Ejemplo 1(a), 2(a)).

(B) La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (RP HPLC) se llevó a cabo para análisis del péptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ (Figuras 1 y 4) en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C8, de 4,6 x 150 mm, 5 mm (nº de catálogo 993967-906, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) usando un gradiente lineal de 100 % de disolvente A, 0 % de disolvente B hasta 95% de disolvente A, 5% de disolvente B en 3 minutos, luego de 95 % de disolvente A, 5 % de disolvente B hasta 50% de disolvente A, 50% de disolvente B en 12 minutos a un caudal 1,5 ml/minuto (Ejemplo 1 (a)). El disolvente A es una solución acuosa al 0,1% de TFA. El disolvente B es una solución al 0,1% de TFA en acetonitrilo.

La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (RP HPLC) para la cuantificación de (E10C)PYY₃₋₃₆ y (D11C)hPYY₃₋₃₆ pegilados (no mostrada) se llevó a cabo en una columna Vydac C18 (2,1 x 250 mm) (nº de catálogo 218MS552,

35

Vydac Hesperia, CA) usando un gradiente lineal de 80% de disolvente A, 20% de disolvente B hasta 40% de disolvente A, 60% de disolvente B en 48 minutos a un caudal 0,2 mL/minuto. (Ejemplo 1 C, 2C). El disolvente A es una solución acuosa al 0,1% de TFA. El disolvente B es una solución al 0,085% de TFA en acetonitrilo.

5 (C) Cromatografía de exclusión por tamaño molecular – Cromatografía de líquidos de alta resolución (SEC-HPLC)

Las mezclas de reacción de PEG lineal de 30K o ramificado de 43K con (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆, sus masas reunidas de la purificación por intercambio catiónico y los productos purificados finales se determinaron usando SEC-HPLC no desnaturizante (Ejemplo 1(b) y (c), 2(b) y (c)). La SEC-HPLC analítica no desnaturizante se llevó a cabo usando una columna Shodex KW804 o TSK G4000PWXL (Tosohaas) en fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM a un caudal de 1,0 mL/minuto (opcionalmente Superdex 200 7,8 mm X 30 cm, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). La pegilación aumenta grandemente el volumen hidrodinámico de la proteína dando como resultado un desplazamiento a un tiempo de retención más corto. En las mezclas de reacción de mPEG de 30K-maleimida más (E10C)hPYY₃₋₃₆ se observó un pequeño pico correspondiente a (E10C)hPYY₃₋₃₆ no modificado residual, así como nuevos picos correspondientes a especies peptídicas pegiladas (Figura 2). Se observaron nuevas especies en las mezclas de reacción de mPEG de 30K-(D11C)hPYY₃₋₃₆ y mPEG ramificado de 43K-(E10C)hPYY₃₋₃₆ con muy poco de (D11C)hPYY₃₋₃₆ o (E10C)hPYY₃₋₃₆ no modificado remanente (Figuras 5 y 8). Estas especies pegiladas y no pegiladas se fraccionaron por cromatografía sobre SP-Sepharose, y las especies mono-mPEG-(E10C)hPYY₃₋₃₆ y mPEG-(D11C)hPYY₃₋₃₆ purificadas resultantes se mostraron subsiguientemente eluyéndose como un solo pico por SEC no desnaturizante con > 95% de pureza, (Figuras 6, 7 y 9). La etapa de cromatografía sobre SP-Sepharose separó eficazmente el mPEG libre, el (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆, y las especies de mayor peso molecular del mPEG lineal de 30K y ramificado de 43K-(E10C)hPYY₃₋₃₆ o mPEG(D11C)hPYY₃₋₃₆ mono-pegilado.

30 (D) SDS PAGE

También se usó la SDS-PAGE (Ejemplo 1 (c)) para determinar la mezcla de reacción, las fracciones de purificación por intercambio catiónico (Figura 3) y los productos purificados finales. La SDS-PAGE se llevó a cabo en geles de 1 mm de espesor de 10-NuPAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras y no reductoras y usando el kit de tinción Novex Colloidal Coomassie™ G-250 (Invitrogen, Carls-

bad, CA.

Ensayos biológicos

La utilidad de los agonistas de PYY de la presente invención como agentes farmacéuticamente activos en la reducción de la ganancia de peso y el tratamiento de obesidad en mamíferos (particularmente, seres humanos), puede demostrarse por la actividad de los agonistas en ensayos convencionales y en los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos a continuación. Dichos ensayos también proporcionan medios mediante los cuales pueden compararse las actividades de los agonistas de PYY con las actividades de otros compuestos conocidos.

Estudios de ingesta de alimentos (IA)

Ensayo de realimentación inducida por ayuno: Se alojaron en jaulas ratones machos C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) a razón de 2 por jaula. Se mantuvieron en un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas:12 horas (las luces se encienden a las 5:00 AM y se apagan a las 5:00 PM), se alimentaron con comida para roedores en forma de pelets RMH3000 Purina (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) y se les permitió libre acceso al agua. Los ratones llegaron al ensayo con una edad de 7-8 semanas y se aclimataron un mínimo de 10 días antes del estudio. El día del estudio, los ratones tenían 9-12 semanas. El día antes del comienzo del estudio los ratones se colocaron en jaulas con un nuevo lecho sin alimento, pero se les permitió el libre acceso al agua. Se dejaron en ayunas durante una noche (20-24 horas). El día del estudio se administró a dichos ratones una inyección IP dosificada (volumen de la dosis = 5 mL/kg), se devolvieron a sus jaulas, y se pesaron previamente justo antes de colocarlos en las jaulas. El vehículo de dosificación usado fue acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, NaCl 50 mM y se calculó la dosis para la entidad PYY activa sin pegilación. Se ensayaron el vehículo de control, PYY natural, mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ y mPEG de 43K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ a tres dosis (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, y 1,0 mg/kg). Se volvió a pesar el alimento a las 2, 4, 6, y 24 horas después de la dosis. Se inspeccionó el lecho para detectar desperdicios, los cuales se pesaron y se incluyeron en los cálculos. La ingesta de alimentos acumulativa se calculó restando el peso de alimento en cada momento del peso de alimento de partida. El porcentaje (%) de inhibición se calculó por $(IA_{trat} - IA_{veh})/IA_{veh} * 100$.

La Figura 10 muestra la ingesta acumulativa en 6 horas después de la inyección IP de tres dosis de PYY₃₋₃₆ natural (Figura 10A) y de mPEG de 30K -maleimida-

(E10C)hPYY₃₋₃₆ (Figura 10B). Tanto el PYY₃₋₃₆ como el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ demostraron una disminución dependiente de la dosis en la ingesta acumulativa de alimentos en el curso de 6 horas.

5 El mPEG de 43K -maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ también produjo una disminución dependiente de la dosis en 6 horas (Figura 11A) y una ingesta de alimentos acumulativa en 24 horas (Figura 11B). Sin embargo, el efecto de mPEG de 43K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ en reducir la ingesta de alimentos acumulativa no fue tan grande como el demostrado por el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ a lamisca dosis (0,1 mg/kg) tanto después de 6 horas como de 24 horas.

10 También se compararon los efectos del mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ sobre la realimentación inducida por ayuno después de la inyección de 0,1 mg/kg (SC) con los efectos de mPEG de 30K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆. Aunque el mPEG de 30K-maleimida-polipéptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ no causó una ingesta de alimentos acumulativa reducida durante el curso de 24 horas, como se muestra en la
15 Tabla siguiente, el efecto no fue tan grande como el observado para el mPEG de 30 K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆.

<u>Tratamiento</u>		<u>2h IA</u>	<u>% de cambio</u>	<u>4h IA</u>	<u>% de cambio</u>	<u>6h IA</u>	<u>% de cambio</u>	<u>24h IA</u>	
Vehículo	Media	2,03	0,00	2,93	0,00	4,06	0,00	10,79	0,00
	SEM	0,16	8,06	0,22	7,46	0,46	11,30	0,67	6,23
E10C	Media	1,89	-6,99	2,16	-26,21	2,45	-39,62	8,04	-25,48
	SEM	0,27	13,45	0,27	9,09	0,26	6,33	0,88	8,14
D11C	Media	2,14	5,22	2,56	-12,56	3,09	-24,02	9,08	-15,88
	SEM	0,15	7,30	0,23	7,72	0,27	6,68	0,42	3,88

20 Se compararon los efectos de mPEG lineal de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ con los mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (ambos del Ejemplo 1). En un estudio en el cual se inyectó 0,1 mg/kg (IP) en ratones machos, los resultados son los que se presentan en la Tabla siguiente.

% de cambio de ingesta de alimento (IA) acumulativa frente a los animales tratados con el vehículo

Tratamiento	2h IA	4h IA	6h IA	24h IA	48h IA
E10C de 30K	-56	-65	-78	-47	-20
E10C de 20K	-65	-73	-79	-36	-17

153

5 Similarmente, en un segundo estudio que compara los efectos sobre la alimentación de mPEG lineal de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ y mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆, después de una dosis (SC) de 0,1 mg/kg, los resultados son como se muestran en la Tabla siguiente.

% de cambio en ingesta de alimento acumulativa frente a los animales tratados con el vehículo

Tratamiento	2 h IA	4 h IA	6 h IA	24 h IA	48 h IA	72 h IA
E10C de 30K	-13	-24	-29	-20	-12	-2
E10C de 20K	-45	-55	-58	-28	-14	-5

10 Las concentraciones de PYY en plasma después de la inyección SC fueron como sigue.

Tratamiento	2 h	4 h	6 h	24 h	30 h	48 h
E10C de 30K	151±58	204±48	308±29	139±27	79±14	40±6
E10C de 20K	110±21	186±37	204±14	62±16	45±12	13±3

Ensayo de ingesta espontánea de alimentos: Ratones machos C57BL/6J (The Jackson Laboratory) se alojaron individualmente en jaulas y se les permitió una aclimatación de 2 semanas antes del estudio. Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12horas/12horas, se alimentaron con comida en polvo *ad libitum* y se les permitió libre acceso al agua. Un día antes de la dosificación, los ratones se colocaron en cámaras de ingesta de alimentos y se les permitió una aclimatación de 1 día. Al día siguiente, a los ratones se les administró una dosis con inyección IP o subcutánea (SC) justo antes de apagar la luz (4:00 PM). La ingesta de alimentos se monitorizó automáticamente a intervalos de 10 minutos durante el tiempo completo y se midieron diariamente los pesos corporales. Los resultados se muestran para la inyección IP de PYY₃₋₃₆ natural y el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (Figura 12) y para inyección SC de PYY₃₋₃₆ natural y el PEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (Figura 13). Aunque tanto el PYY₃₋₃₆ natural como el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ producían una reducción inmediata en la ingesta de alimentos acumulativa comparados con los ratones tratados con vehículo, el efecto de ingesta de alimentos reducida hizo que el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ fuera de mucha mayor duración que el efecto causado por el PYY₃₋₃₆ natural. Acoplado con un efecto de ingesta de alimentos de más duración, el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ también demostró

una exposición prolongada en plasma después de la única inyección (0,1 mg/kg, IP) (Figura 14). Aunque el PYY₃₋₃₆ natural tenía una tasa de eliminación de 16 ml/min/kg y una C_{max} de 38 nM, el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ tenía una tasa de eliminación de 0,2 ml/min/kg y una C_{max} de 267 nM. Los valores de PYY en plasma se midieron en ratones usando un kit de radioinmunoensayo de hPYY (Linco Research, Inc., St. Louis, MO).

Ensayo en mini-bomba con ratones ob/ob: Ratones ob/ob machos (The Jackson Laboratory), de 8-9 semanas (n=26), se mantuvieron con comida normal y se les implantaron mini-bombas osmóticas (Alza Corp., Mountain View, CA) durante 14 días, las cuales administraban bien vehículo (solución salina), bien PYY₃₋₃₆ (0,1 mg/kg/día), o bien PEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ (0,03 mg/kg/día). Se midieron diariamente los pesos de alimentos y los pesos corporales. Se determinó la composición de grasas del cuerpo el día 0 y el día 13. Se tomaron muestras de sangre al final del estudio. Para estos grupos no hubo diferencias significativas en ingesta de alimentos, peso corporal o composición de grasa del cuerpo. El PYY en plasma se determinó a la terminación del estudio por radioinmunoensayo como se ha descrito previamente. En el grupo tratado con PYY₃₋₃₆ natural se midieron los niveles de PYY en plasma dando 15±2 ng/ml; en el grupo tratado con mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ los niveles de PYY en plasma fueron 132±22 ng/ml.

Estudios de unión *in vitro*

Ensayo de proximidad de centelleo (abreviadamente en lo sucesivo SPA por la expresión inglesa *Scintillation Proximity Assay*) **para unión de ligandos:**

El ensayo de proximidad de centelleo para la unión de ligandos mide el desplazamiento competitivo de PYY radiomarcado desde los receptores Y2 y utiliza microesferas que contienen perlas centelleantes (perlas para SPA) revestidas lectina-aglutinina de germen de trigo (abreviadamente WGA por la expresión inglesa *wheat germ agglutinin*) obtenida de Amersham Biosciences (nº de catálogo RPNQ 0085). Se prepararon suspensiones de células neuroblastomas humanas KAN-TS que expresan los receptores Y2 en su superficie (Fuhlendorf, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 182-186, 1990) usando un tampón de recogida de células compuesto de tampón Hepes 50 mM (pH 7,4), NaCl 145 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 10 mM, BSA al 0,1%, DMSO al 5% e inhibidores de proteasa Roche. Los ensayos SPA se realizaron en formato de 96 pocillos por triplicado usando 50.000 células/pocillo, ¹²⁵I-PYY (40.000 cpm/pocillo) y perlas para SPA (0,5 mg/pocillo) en un tampón de ensayo com-

155

5 puesto de tampón Hepes 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM, BSA al 0,1% (p/v), bacitracina al 0,025% (p/v) y azida de sodio al 0,025%. Se añadieron ligandos de ensayo a diversas concentraciones (0,032 a 500 nM) a la mezcla de ensayo que luego se incubó durante 16-24 horas a temperatura ambiente, mientras se agitaba. Las placas se dejaron reposar durante una hora y luego se sometieron a recuento usando un detector MicroBeta® Trilux (Perkin Elmer, Boston, MA). En la Figura 15 se muestran los resultados para hPYY₃₋₃₆ y mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ del Ejemplo 1.

Ensayos de unión de GTPγ [³⁵S] a los receptores Y2R de NPY

10 El ensayo funcional es un ensayo de unión de GTPγ [³⁵S] realizado en placas NEN *FlashPlates* (formato de 96 pocillos). Se prepararon membranas a partir de células KAN-TS como se ha descrito en Bass et al., Mol. Pharm. 50: 709-715, 1990. Los ensayos de unión de GTPγ [³⁵S] se realizaron por duplicado en formato de *FlashPlate*TM de 96 pocillos usando GTPγ [³⁵S] 100 pM y membranas de 10 µg por pocillo en
15 tampón de ensayo constituido por Tris HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 3 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, EGTA 20 mM, NaCl 100 mM, GDP 5µM, seroalbúmina bovina al 0,1% y los siguientes inhibidores de proteasas: 100 µg/mL de bacitracina, 100 µg/mL de benzamidina, 5 µg/mL de aprotinina, 5 µg/mL de leupeptina. La mezcla de ensayo se incubó luego con concentraciones crecientes de compuesto de ensayo (curva de con-
20 centración de 6 puntos; diluciones logarítmicas en el intervalo de 10⁻¹² M a 10⁻⁵ M) durante 60 minutos a 30°C. Las *FlashPlates*TM se centrifugaron luego a 2000 x g durante 10 minutos. La estimulación de la unión de GTPγ [³⁵S] se cuantificó luego usando un detector MicrobetaTM. Los cálculos de la CE₅₀ y de la actividad intrínseca se realiza-
25 ron usando el programa *Prism by Graphpad*. En la Figura 16 se muestran los resultados para hPYY₃₋₃₆ y el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ del Ejemplo 1. Los valores de la CE₅₀ para el mPEG de 30K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ y mPEG de 20K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ de Ejemplo 1 eran comparables (por ejemplo, 4,3 nM y 4,6 nM cuando se miden en el mismo ensayo).

156

REIVINDICACIONES

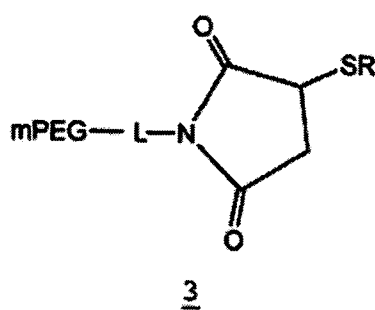
1. El polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ que tiene la secuencia de aminoácidos IKPEAPGCDASPEELNRYYYASLRHILNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID No.: 3] o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. El polipéptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ que tiene la secuencia de aminoácidos IKPEAPGECASPEELNRYYYASLRHILNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID No.: 4] o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

10

3. Un conjugado que comprende un polietilenglicol (PEG) y el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆.

4. El conjugado de la reivindicación 3, que tiene la Fórmula 3



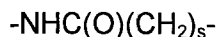
15

en donde el PEG es metoxi-PEG (mPEG) y es lineal o ramificado y tiene un peso molecular medio ponderal en el intervalo de aproximadamente 1 kD a 50 kD,

L es un grupo de la fórmula:



20 en la cual cada uno de p y r es independientemente un número entero de 1 a 6, o L es un grupo de la fórmula:



en la cual s es un número entero de 1 a 6, y

-SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ o (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína.

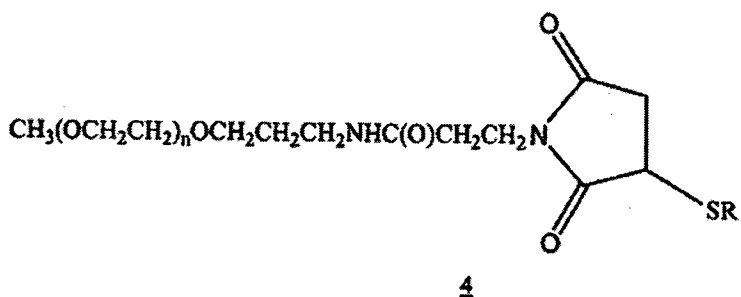
25

5. El conjugado de la reivindicación 4, en donde el mPEG es lineal.

6. El conjugado de la reivindicación 5, que tiene la Fórmula 4

30

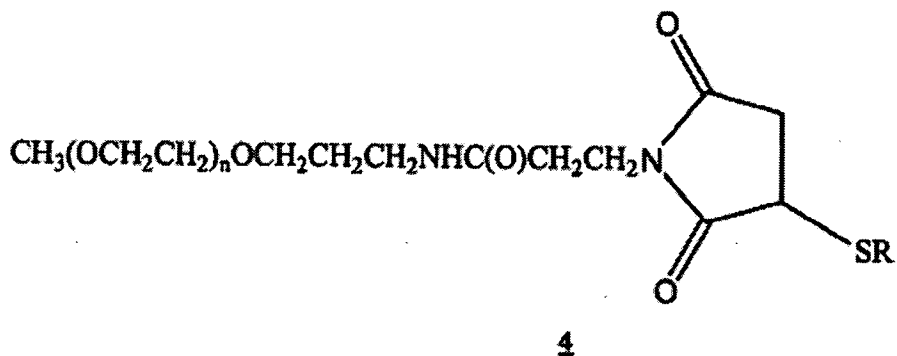
157



5 en donde n es un número entero en el intervalo de aproximadamente 600 a 750 y -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína.

7. El conjugado de la reivindicación 6, en donde el resto (OCH₂CH₂)_n tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 30 kD.

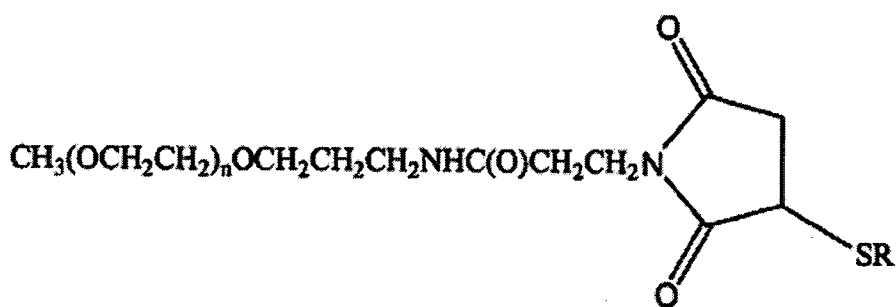
10 8. El conjugado de la reivindicación 5, que tiene la Fórmula 4



en donde n es un número entero en el intervalo de aproximadamente 375 a 525 y -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína.

15 9. El conjugado de la reivindicación 8, en donde el resto (OCH₂CH₂)_n tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 20 kD.

10. El conjugado de la reivindicación 5 que tiene la fórmula 4



4

en donde n es un número entero en el intervalo de aproximadamente 600 a 750 y -SR es el polipéptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína.

5

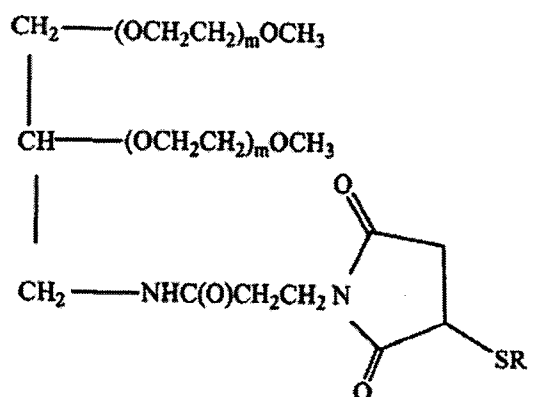
11. El conjugado de la reivindicación 10, en donde el resto $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 30 kD.

12. El conjugado de la reivindicación 4, en donde el mPEG es ramificado.

10

13. El conjugado de la reivindicación 12, en donde el mPEG es un glicerol-ramificado.

14. El conjugado de la reivindicación 13, que tiene la Fórmula 5



5

15

en donde cada m es aproximadamente el mismo y es un número entero en el intervalo de aproximadamente 450 a 500 y -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína.

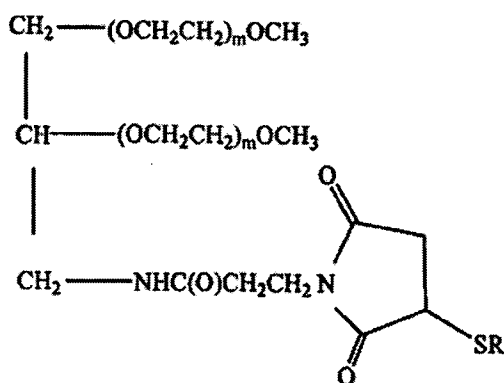
20

15. El conjugado de la reivindicación 14, en donde cada resto $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ tiene un peso molecular medio ponderal en el intervalo de aproximadamente 20 kD a

159

22 kD.

16. El conjugado de la reivindicación 13, que tiene la Fórmula 5

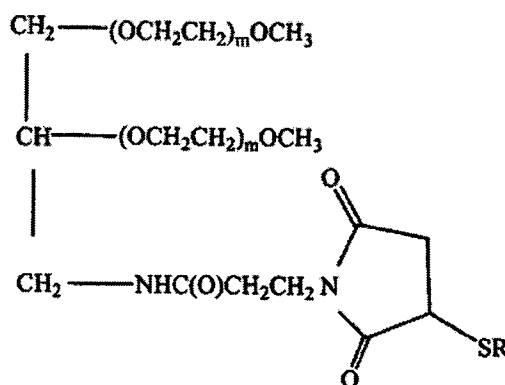


5

5 en donde cada m es el mismo y es un número entero en el intervalo de aproximadamente 450 a 500 y -SR es el polipéptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína.

10 17. El conjugado de la reivindicación 16, en donde cada resto (OCH₂CH₂)_m tiene un peso molecular medio ponderal en el intervalo de aproximadamente 20 kD a 22 kD.

18. Un conjugado de glicerol-mPEG ramificado de 43 K-maleimida-(E10C)hPYY₃₋₃₆ que tiene la fórmula 5



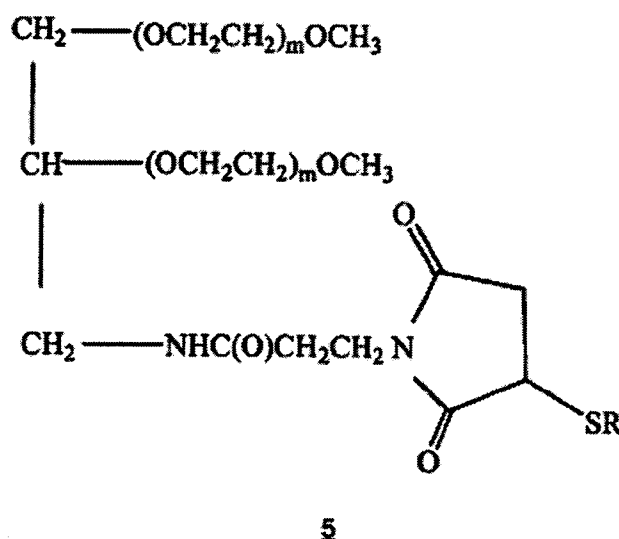
5

15

en donde cada m es aproximadamente el mismo y -SR es el polipéptido (E10C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

160

19. Un conjugado de glicerol-mPEG ramificado de 43 K-maleimida-(D11C)hPYY₃₋₃₆ que tiene la fórmula 5



5 en donde cada m es aproximadamente el mismo y -SR es el polipéptido (D11C)hPYY₃₋₃₆ en el cual S es el átomo de azufre del grupo tiol de la cisteína, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

20. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, o el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 3-19 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, que comprende además un segundo agente que es un agente anti-obesidad.

22. Un método de tratar la obesidad o un estado de sobrepeso en un mamífero que necesite dicho tratamiento, que comprende administrar periféricamente al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de la reivindicación 1 ó 2 o el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 3-19 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

23. Un método de inhibir la ganancia de peso, reducir la ingesta de alimentos o reducir la ingesta calórica en un mamífero, que comprende administrar periféricamente al mamífero una cantidad del polipéptido de la reivindicación 1 ó 2 o el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 3-19 o una de sus sales terapéuticamente eficaces y farmacéuticamente aceptables.

161

24. El método de la reivindicación 22 ó 23, en el cual el polipéptido, conjugado o sal se administra en combinación con un segundo agente que es un agente anti-obesidad.

5

25. El uso de un polipéptido de la reivindicación 1 ó 2 o el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 3-19 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la fabricación de un medicamento para tratar la obesidad o un estado de sobrepeso en mamíferos o para inhibir la ganancia de peso, reducir la ingesta de alimentos o reducir la ingesta calórica en un mamífero.

10

26. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 ó 2.

27. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ. ID NO:3 o SEQ ID NO:4.

15

28. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 27, en el que dicho polipéptido está pegilado en el residuo de cisteína.

20

RESUMEN

La invención proporciona variantes del péptido PYY₃₋₃₆ y sus derivados pegilados y composiciones y métodos útiles en el tratamiento de estados modulados por el agonista del receptor Y2 del neuropéptido Y (NPY).

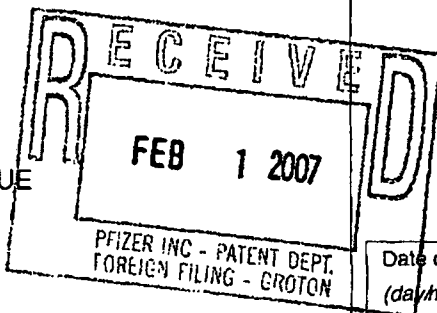
PATENT COOPERATION TREATY

162
N

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

FULLER, Grover, F., Jr.
c/o LAWRENCE, Jackie
Pfizer Inc. MS8260-1615
Eastern Point Road
Groton, CT 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE



PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

24.01.2007

Applicant's or agent's file reference
PC32768B

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2006/000270

International filing date (day/month/year)
30.01.2006

Priority date (day/month/year)
04.02.2005

Applicant
PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



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

Authorized Officer

Wallentin, Marko

Tel. +31 70 340-3991



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC32768B		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA416
International application No. PCT/B2006/000270		International filing date (day/month/year) 30.01.2006		Priority date (day/month/year) 04.02.2005
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K14/575				
Applicant PFIZER PRODUCTS INC. et al.				
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).				
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application				
Date of submission of the demand 23.03.2006		Date of completion of this report 24.01.2007		
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized officer GROENENDIJK, M Telephone No. +31 70 340-		



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

169
International application No.
PCT/IB2006/000270

Box No. I Basis of the report

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

Description, Pages

1-43 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-3 as originally filed

Claims, Numbers

1-28 as originally filed

Drawings, Sheets

1/16-16/16 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2006/000270

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 22-24 as to IA

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 22-24 as to IA relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*);
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*);
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

166

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2006/000270

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-28
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-28
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-21,25-28
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item III.

Claims 22-24 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V.

Reference is made to the following documents:

D1 : WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 April 2003 (2003-04-03) cited in the application

I. Novelty

Document D1, which is considered to represent the most relevant state of the art, discloses PYY(3-36) and related structure analogs and their use in the treatment of obesity. Furthermore the document describes the use of PEG for improving the solubility, stability and circulation time of said PYY analogs, preferably attached at the N-terminal or lysine sidechain amino group. (see particularly pages 81-85).

From this, the subject-matter of independent claims 1-3, 18 and 19 differs in that the PYY(3-36) analogs have a cysteine residue in either position 10 or 11, to which a PEG entity can be attached.

The subject-matter of said claim 1-3, 18 and 19 and the dependent or related claims 4-17, 20-28 is therefore novel (Article 33(2) PCT).

II. Inventive step

- 1) The closest prior art is considered to be D1 as discussed in the previous section.
- 2) The preset subject-matter differs from said prior art in the presence of a cysteine residue in either position 10 or 11 of PYY(3-36) to which residue a PEG entity can be/is attached. It appears that attachment of a PEG entity to the N-terminal or lysine sidechain residue inactivates the PYY analog. This problem can be avoided by attachment at position 10 or 11 of PYY(3-36). Additionally the cysteine modified PYY(3-36) residues must retain the agonistic activity.
- 3) The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded to be the

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

167
International application No.

PCT/IB2006/000270

provision of active PYY(3-36) analogs having an increased circulation time.

4) In the prior art there was no indication or suggestion that attachment of a PEG entity to the residue in position 10 or 11 would maintain the activity of the PYY analog. Therefore the pegylated constructs exhibit an unexpected advantageous property and are considered to be inventive.

5) It is true that the cysteine modified PYY analogs of claims 1 and 2 of the present application do not exhibit an increased circulation time and therefore do not have the same advantage as the pegylated analogs. However they may be considered to be active intermediate products to which the inventive merits of the pegylated analogs radiate back.

6) Hence inventive step can be acknowledged to the present claims 1-28 under Art.33(3) PCT.

III. Industrial applicability

For the assessment of the present claims 22-24 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-079239-00000-0000

Fecha: 2007-08-02 16:30:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 167



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-079239-00000-0000

Fecha: 2007-08-02 16:30:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 167

PATENTE DE INVENCION []

- ◆ 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 _____

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