



13T



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-35909

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

ja

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

TITULO: MODULADORES DE RECEPTOR PTH Y USOS DE LOS MISMOS

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

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

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 07 de Abril de 2009

997



No. 09-035909- -00000-0000

Fecha: 2009-04-07 16:42:33 Dep: 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 151

**PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

P2009/000030

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center,
Indianápolis, Indiana 46285 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: 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 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: 1) Patricia, Lea BROWN-AUGSBURGER; 2) Wayne David KOHN,

Dirección: 1) 107701 Windermere Boulevard, Fishers, Indiana 46037 E.U.A.;
2) 7905 Beechwood Farms Drive, Avon, Indiana 46123 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: 1) Estadounidense y Canadiense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/080367 Fecha Octubre 4, 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/048784 Fecha Abril 24, 2008

6

Título (54) MODULADORES DE RECEPTOR PTH Y USOS DE LOS MISMOS

Clasificación Internacional (51) C07K 14/635, A61K 47/48, A61K 38/29, A61P 19/10

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Octubre 13, 2006

(31) Número de Solicitud

60/829,383

9

Comprobante de pago No. 09-25655

Fecha Abril 1 de 2009

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. Adjunto copia simple Ver Expediente No. 07-128.249

☒

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 Btá T.P. 74.295

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-035909- -00000-0000

Fecha: 2009-04-07 16:42:33 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYI Evs: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 151

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 25,655
FECHA : ABRIL 1 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	91394656	01/04/2009	7,928,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ELI LILLY AND COMPANY

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

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

- 1961
ico
Circuitto enrry para
o en y para el estado

1279
no
retario de

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, fax (317) 233-3203

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

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

Firma del notario público Catherine Michel certifica

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

Sello de notario público de Indiana

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

Marlen Neira C.



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

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

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

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

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

Signature/Firma

Date/Fecha: 17 July 2003

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

Poder

El suscrito,

domiciliado en

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

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



Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA

APOSTILLE

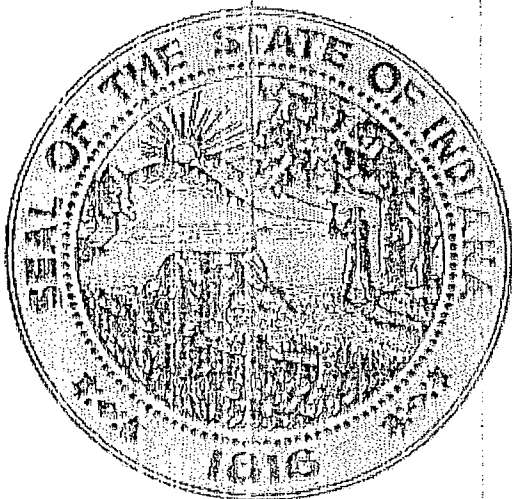
(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

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

10. Signature:



Todd Rokita

Indiana Secretary of State

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

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

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

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

www.olarteraisbeck.com

8

Notarial Certification

On this date,

/ 7 July 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana 46256 US
signed the foregoing document.

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

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

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

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

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

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

NOTARY PUBLIC (Signature):



Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Peter G. Stringer

mayer de edad y domiciliado

Indianapolis, Indiana 46256 US
suscribió el documento que antecede.

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

de

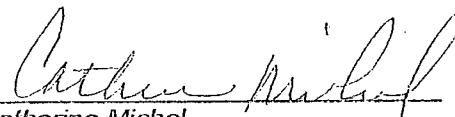
4. Que

con sede principal ubicada en

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

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

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


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

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 April 2008 (24.04.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/048784 A1 ✓

(51) International Patent Classification:

C07K 14/635 (2006.01) A61K 38/29 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/080367 ✓

(22) International Filing Date: 4 October 2007 (04.10.2007) ✓

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/829,383 ✓ 13 October 2006 (13.10.2006) ✓ US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BROWN-AUGS-BURGER, Patricia, Lea** [US/US]; 10771 Windermere Boulevard, Fishers, Indiana 46037 (US); **KOHN, Wayne, David** [CA/US]; 7905 Beechwood Farms Drive, Avon, Indiana 46123 (US).

(74) Agents: **WISKERCHEN, MaryAnn** et al.; Eli Lilly And Company, Patent Division, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

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

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

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

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: PEGYLATED PTH AS PTH RECEPTOR MODULATORS AND USES THEREOF

(57) Abstract: Pharmaceutical compositions and methods are provided for the treatment and prevention of bone loss diseases including osteoporosis in a mammal.

WO 2008/048784 A1

PEGYLATED PTH AS PTH RECEPTOR MODULATORS AND USES THEREOF

This patent application claims the benefit of United States Provisional Patent Application No. 60/829,383 filed October 13, 2006.

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to parathyroid hormone receptor (PTHr) modulator compounds and to methods of making and using them.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Bone degenerative diseases such as osteoporosis occur in a substantial portion of the senior adult population. Osteoporosis encompasses a heterogeneous group of disorders that represent a major risk for bone fractures, and a substantial burden on the health care system. Billions of dollars are spent annually on medical care for the treatment of osteoporosis. Clinically, osteoporosis is characterized by diminished bone mass, decreased bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC), and loss of bone architecture resulting in decreased bone strength and increased risk of bone fracture.

While a number of antiresorptive agents including calcitonin, bisphosphonates, estrogen, and SERMs prevent further bone loss, they do not rebuild bone once it has been lost. The first FDA approved anabolic bone building agent for the treatment of osteoporosis is human PTH(1-34), also known as teriparatide, which is marketed under the brand name FORTEO® (Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN). PTH or PTH(1-34) is thought to exert its effects through receptor-mediated activation of two intracellular signaling pathways via (1) adenylate cyclase and protein kinase A, and (2) phospholipase C and protein kinase C. PTH(1-34) builds bone mass, restores bone architecture, and reduces the risk of vertebral and non-vertebral bone fractures in osteoporotic patients who are at high risk of fracture. (R. Neer, NEJM, 344:1434, 2001). As a peptide product, PTH(1-34) requires daily subcutaneous injections. International Publication Number WO2004/060386 discloses an enormous genus of PTH/PTHrP modulators comprising a vehicle that cause greater hypercalcemic response than PTH(1-34).

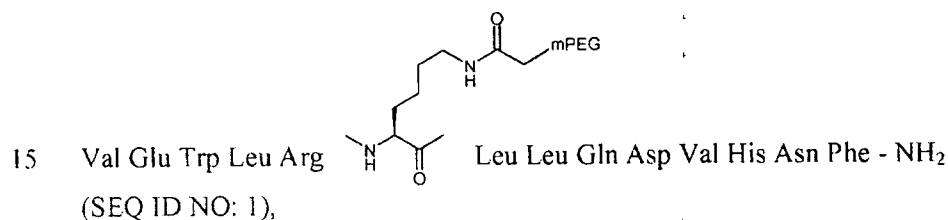
-2-

There remains a need for novel, therapeutic PTH analogs that demonstrate bone building efficacy as reflected by increased bone mineral content (BMC) and/or bone strength while preferably maintaining a hypercalcemia effect similar to, or less than, that of the current PTH(1-34) therapeutic and which requires less frequent administration than PTH(1-34). The compounds of the present invention satisfy these needs and provide related advantages.

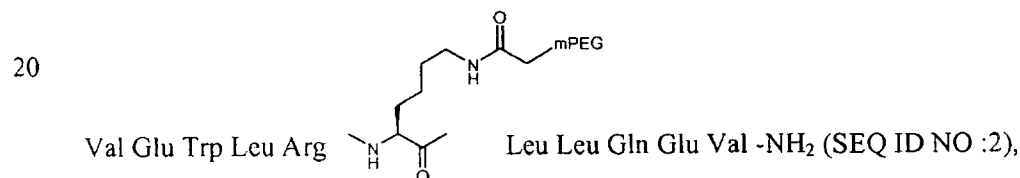
SUMMARY OF THE INVENTION

A pegylated compound of the invention is a compound with a sequence selected from the group consisting of:

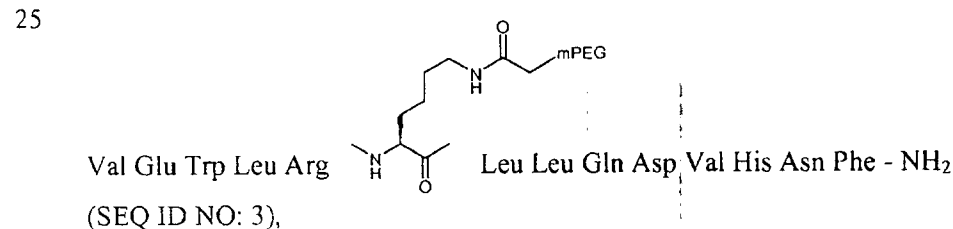
a) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Met Glu Arg



b) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg



c) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Met Glu Arg



30

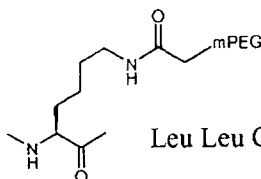
12

-3-

d) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

5

Val Glu Trp Leu Arg



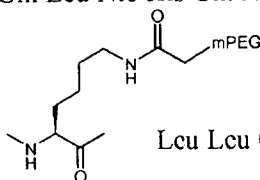
Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe -NH₂

(SEQ ID NO:4), and

e) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

10

Val Glu Trp Leu Arg



Leu Leu Gln Glu Val His Gln Phe -NH₂

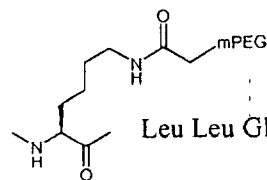
(SEQ ID NO: 5); wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In a preferred embodiment, the invention provides a compound with the sequence of:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Met Glu Arg

20

Val Glu Trp Leu Arg



Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe -NH₂

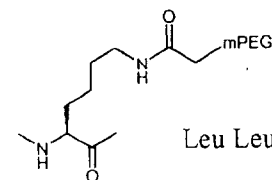
(SEQ ID NO:1), wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In another preferred embodiment, the invention provides a compound with the sequence of:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

30

Val Glu Trp Leu Arg

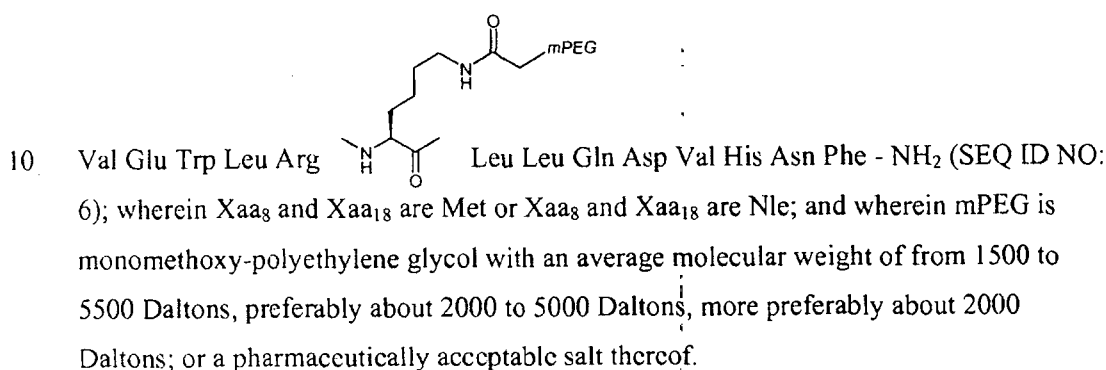


Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe -NH₂

-4-

(SEQ ID NO:4), wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

- 5 In one embodiment, the invention provides a compound with the sequence of:
Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa₈ His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Xaa₁₈ Glu Arg



- 15 In one embodiment, the invention provides an intermediate with a sequence selected from the group consisting of:
- a) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe (SEQ ID NO: 8),
 - b) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg
 - 20 Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Glu Val (SEQ ID NO :9),
 - c) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe (SEQ ID NO: 10),
 - d) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe (SEQ ID NO:11), and
 - 25 c) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Glu Val His Gln Phe (SEQ ID NO: 12);
- or the C-terminal amide thereof.

- The invention provides a method of inducing bone formation in a mammal comprising administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a
- 30 compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons,

14

-5-

preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The invention provides a method of treating a disease or condition in which new bone formation and/or an increase in bone mass and bone biomechanical strength would be beneficial in a mammal, including osteoporosis, osteopenia, bone fracture, spinal fusions, bone implants, joint implants, dental implants, and periodontal disease, comprising administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The invention provides a method of treating osteoporosis or osteopenia in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The present invention also provides a method of preventing osteoporosis or osteopenia in a mammal comprising administering to a mammal in need of such prevention an effective amount of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The invention provides method of treating a bone fracture in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In one embodiment, the invention provides a pharmaceutical formulation comprising a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is

monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof; in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

5 In one embodiment, this invention provides a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in therapy.

10 In one embodiment, this invention provides a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in the induction of bone formation in a mammal, preferably a human.

15 In one embodiment, this invention provides a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in treating a disease or condition in which new bone formation and/or an increase in bone
20 mass and bone biomechanical strength would be beneficial in a mammal, preferably a human, including osteoporosis, osteopenia, bone fracture healing, spinal fusion, bone implants, joint implants, dental implants, and periodontal disease.

In one embodiment, this invention provides a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6 wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular
25 weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in treating osteoporosis in a mammal, preferably a human.

In one embodiment, this invention provides a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular
30 weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in

-7-

preventing osteoporosis in a mammal, preferably a human.

In one embodiment, the invention provides a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in treating a bone fracture in a mammal, preferably a human.

The invention provides the use of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof; for the manufacture of a medicament for treating a disease or condition capable of being improved or prevented by induction of bone formation.

The invention provides the use of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof; for the manufacture of a medicament for the treatment of conditions in which new bone formation and/or an increase in bone mass and bone biomechanical strength would be beneficial in a mammal, preferably a human, including osteoporosis, osteopenia, bone fracture healing, spinal fusion, bone implants, joint implants, dental implants, and periodontal disease.

The invention also provides the use of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof; for the manufacture of a medicament for treating osteoporosis in a mammal, preferably a human.

The invention also provides the use of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof; for the manufacture of a medicament for preventing osteoporosis or osteopenia in a mammal, preferably a human.

The invention also provides the use of a compound of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000 Daltons, more preferably about 2000 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof; for the manufacture of a medicament for use in treating a bone fracture in a mammal, preferably a human.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Bone formation occurs during fetal development and post-natal growth and also during adult life either at a low rate as part of normal bone remodeling or at an accelerated rate in response to injury or abnormal bone loss. Bone formation involves a number of processes, including osteoblast progenitor cell proliferation, osteoblast differentiation from progenitor cells and mineralisation of matrix produced by the osteoblasts. The term "inducing bone formation" or "inducing new bone formation" is taken to mean a net increase in bone mass (e.g., as demonstrated by an increase in bone mineral content ("BMC")) and/or bone biomechanical strength as determined using the method of Example 4B herein.

The term "effective amount" as used herein is a dose of a compound of the invention necessary to achieve the desired pharmacological effect.

The term "*in vitro* activity" refers to the activity of a compound of the invention in one or more suitable *in vitro* assays including, for example, the ability to activate a PTH receptor in a cell-based assay. Activity may be expressed as "EC₅₀" which identifies an effective concentration of a compound that results in 50% of maximal activation in the assay of choice. Any suitable *in vitro* assay may be used to test for binding and activation of the PTH receptor, including activation of adenylate cyclase resulting in increased cyclic AMP (cAMP) levels (see Example 3 herein). Compounds of the invention have variable agonistic activity leading to an increase in intracellular cAMP.

In its typical form, mPEG (monomethoxy polyethylene glycol) is a linear polymer with terminal hydroxyl groups having the formula $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, wherein n is from about 8 to about 4000. The mPEG used in the present invention have an average molecular weight of from 1,500 to 5,500 Daltons, more preferably about 2,000

to 5,000 Daltons, more preferably about 2,000 to 2,300, even more preferably about 2,000 Daltons. Commercially available mPEG reagents (e.g., NOF SUNBRIGHT® ME-020AS) generally have some degree of polydispersity, meaning that "n" varies over a range in a roughly Gaussian distribution, preferably over a narrow range. The terminal hydrogen generally may substituted with a terminating group such as an alkyl or aromatic group. Although in the the mPEG molecule the terminal hydrogen is substituted with a methoxy group, it is contemplated that the terminal hydrogen may be substituted with a carbon chain of varying length, e.g. up to a 10 carbon chain, linear or branched, and still fall within the invention.

10 A compound with a sequence as shown in SEQ ID NOs: 8-12 may be used as an intermediate in the synthesis of a pegylated compound of the invention. Preferably a compound with a sequence as shown in SEQ ID NOs: 8-12 is in the amide form at the carboxy-terminus of the compound.

The terms "linker," "linker moiety," and "spacer" are taken herein to refer to an atom or a collection of atoms optionally used to link interconnecting moieties such as a terminus of a polymer segment and a peptide. The linker moiety is the portion of the overall polymer that contains a reactive moiety to allow for covalent attachment to a mutually reactive site on a peptide.

15 The term "conjugated" (or interchangeably "conjugated peptide") is taken herein to indicate a heterogeneous molecule formed by the covalent attachment of a peptide to a PEG molecule.

The term "covalent attachment" means that a peptide and a polyethylene glycol molecule are either directly covalently joined to one another, or else are indirectly covalently joined to one another through an intervening moiety or moieties, such as a linker, linker moiety, or spacer.

25 The pegylated compounds of the present invention can react with any of a number of inorganic and organic acids or bases to form pharmaceutically acceptable salts. Preferred pharmaceutically acceptable salts are those formed with acetate acid, citrate acid and hydrochloric acid. Especially preferred are acetate salts of the compounds of SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 or 5, wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons, preferably about 2000 to 5000

Daltons, more preferably 2000 Daltons. Methods for preparation of pharmaceutically acceptable salts of compounds of the present invention are well known to the skilled artisan (See: Stahl et al., "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use," VCHA/Wiley-VCH (2002); and Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5 66:1-19, 1977).

Bone degenerative diseases, such as osteoporosis, are characterized by diminished bone mass, decreased BMD, and loss of bone architecture resulting in decreased bone strength, and increased risk of bone fracture. Pegylated compounds of the invention may build bone mass, increase bone biomechanical strength, restore bone architecture, and 10 reduce the risk of vertebral and non-vertebral bone fractures in osteoporotic patients who are at high risk of fracture. Thus, the pegylated compounds of the invention are useful as bone-building agents to treat or prevent bone degenerative diseases, such as osteoporosis. Moreover, the pegylated compounds of the invention are useful as bone-building agents to enhance fracture healing and stimulate bone growth at the location of bone implants, 15 joint implants or dental implants, or for treating periodontal disease.

Suitable patients include men, women, and children suffering from bone loss conditions or bone trauma, e.g., bone fracture, in which new bone formation, an increase in bone mass, and/or an increase in bone biomechanical strength would be beneficial. For example, the compounds of the invention can be administered as a means to induce bone 20 formation and/or increase bone mass and strength, thus reducing the risk of vertebral and non-vertebral bone fracture in a patient at risk of such fractures, including patients suffering from osteoporosis or osteopenia, for example patients having age-related osteoporosis, steroid induced osteoporosis, postmenopausal osteoporosis, idiopathic osteoporosis, and primary or secondary osteoporosis. Non-vertebral sites include, for 25 example, hip, forearm, humerus, tibia, radius, ankle, rib, foot, pelvis, and femur.

Pegylated compounds of the invention may also be administered to a patient to enhance or accelerate vertebral and/or non-vertebral fracture healing, for example, in a patient who has suffered a trauma resulting in a bone fracture, for example due to accident or sport injury, or who has suffered a fragility fracture associated with low bone 30 mass, including hip, forearm, humerus, tibia, radius, ankle, rib, foot, pelvis, and femur.

Compounds of the invention may be prepared as described in the following scheme exemplified for the synthesis of a compound with SEQ ID NO: 1:

5

Fmoc strategy, DIC/HOBt activation

10

2. rp-HPLC purification

15

3. acidify

4. reversed-phase HPLC purification

20



30

-12-

used according to the manufacturer's instructions for blocking interfering groups, protecting amino acids during reaction, coupling, deprotecting, and capping of unreacted amino acids.

Typically, an N^α-carbamoyl protected amino acid and the N-terminal amino acid on the growing peptide chain attached to a resin are coupled at room temperature in an inert solvent such as dimethylformamide, N-methylpyrrolidone or methylene chloride in the presence of coupling agents such as diisopropyl-carbodiimide (DIC) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt). The N^α-carbamoyl protecting group is removed from the resulting peptide resin using a reagent such as trifluoroacetic acid (TFA) or piperidine, and the coupling reaction is repeated with the next desired N^α-protected amino acid to be added to the peptide chain. Suitable amine protecting groups are well known in the art and are described, for example, in Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1991. The most commonly used examples include tBoc and fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc). After completion of synthesis, peptides are cleaved from the solid-phase support with simultaneous side-chain deprotection using standard treatment methods under acidic conditions.

The skilled artisan will appreciate that the peptide chain of the compounds of the invention can be synthesized with either a C-terminal free acid or carboxamide. The type of derivatized polystyrene resin used for the synthesis will determine the C-terminal moiety after cleavage. A number of linkers are well known and routinely used in the art. For the synthesis of C-terminal amide peptides, resins incorporating Rink amide MBHA or Rink amide AM linkers are typically used with Fmoc synthesis, while MBHA resin is generally used with tBoc synthesis. For the generation of C-terminal acid peptides, 2-Chlorotrityl or Wang resin is typically used for Fmoc synthesis, while tBoc synthesis generally employs PAM resin. Methods for loading the first amino acid to the resin are well known in the art.

Crude peptides typically are purified using Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (rp-HPLC) on C8 or C18 columns using water-acetonitrile gradients in 0.05 to 0.1% TFA. Purity can be verified by analytical rp-HPLC. Identity of peptides can be verified by mass spectrometry. Peptides can be solubilized in aqueous buffers over a wide pH range.

-13-

Conjugation of mPEG to a peptide may be carried out using well-characterized chemical synthetic reactions (See: Roberts et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 459-476 (2002) and Vcroncsc, F.M., *Biomaterials* 22:405-417 (2001) or according to the manufacturer's recommendations. It is preferable that the procedure uses a molar excess of a polymer relative to the peptide to drive the reaction to completion. Excess mPEG reagent is separated from the conjugated peptide products by conventional separation methods such as rp-HPLC.

The conjugation chemistry used in preparing pegylated compounds of the invention is amide bond formation between a mPEG-carboxylate activated as, for example, an NHS (N-hydroxysuccinimide) ester and an amino group on the peptide. The linker between the mPEG and peptide is CO-CH₂ (carboxy methyl). The peptide sequence of the invention is designed to contain a single Lys side chain to allow selective reaction with the incoming mPEG-NHS ester. Generally this also involves the derivatization of the amino terminus with a protecting group such as Fmoc or trifluoroacetyl, which is removed subsequently. Alternatively, the amino terminus can be left unprotected and partially selective acylation of the Lys side chain may be obtained under optimal pH and solvent conditions (See, U.S. Patent No. 5,646,242). The amide conjugation is preferably performed with a mPEG-NHS ester derivative and an N-terminal Fmoc-protected peptide containing a single Lys (or other amine-containing amino acid) in an aqueous mixture at pH of 9 to 10 and at room temperature for 20 to 60 min. Following the conjugation, the desired conjugated peptide is recovered and purified by conventional separation methods such as rp-HPLC.

Composition

A pegylated compound of the invention may be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration to a subject, particularly to a human. A pegylated compound of the invention may be administered alone or in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, and/or excipients. Specifically, a pegylated compound of the invention may be administered in a vehicle of 20 mM NaH₂PO₄ in 0.9% NaCl, 3 mg/ml mannitol, pH 5. The compositions for administration are designed to be appropriate for the selected mode of administration, and pharmaceutically acceptable

-14-

diluents, carrier, and/or excipients such as dispersing agents, buffers, surfactants, preservatives, solubilizing agents, isotonicity agents, stabilizing agents and the like are used as appropriate. Said compositions are designed in accordance with conventional techniques as in *e.g.*, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, 5 Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 which provides a compendium of formulation techniques as are generally known to practitioners.

A composition comprising a pegylated compound of the invention may be administered to a subject at risk for or exhibiting pathologies as described herein using standard administration techniques including intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, 10 pulmonary, transdermal, intramuscular, intranasal, buccal, sublingual, or suppository administration.

The route of administration of a pegylated compound of the invention may be parenteral, oral, or by inhalation or transdermal delivery. Preferably, the pegylated compounds of the invention can be incorporated into a pharmaceutical composition 15 suitable for parenteral administration. The term parenteral as used herein includes intravenous, intramuscular, subcutaneous, rectal, vaginal, or intraperitoneal administration. Peripheral systemic delivery by intravenous or intraperitoneal or subcutaneous injection is preferred.

A pegylated compound of the invention may be administered as an aerosol for 20 therapeutic purposes, which are to be administered with inhalation appliances and which contain a compound of the present invention. Aerosols and methods for the synthesis thereof are described in the art.

A pegylated compound of the invention may be administered regularly, for example, once daily or once weekly. Alternatively, a pegylated compound of the 25 invention may be administered, *e.g.* twice-weekly, or 3 times-weekly. Alternatively, compounds of the invention may be administered cyclically (*e.g.* regularly for a period of days or weeks followed by a period without administration). Preferably a pegylated compound of the invention is administered once-weekly for a period ranging from 3 months to 3 years.

30 The composition typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage in the container provided, including *e.g.*, a sealed vial or syringe.

24

-15-

Therefore, compositions may be sterile filtered after making the formulation, or otherwise made microbiologically acceptable. For parenteral administration a typical dose range for a compound of the invention is about 1 µg per week to about 10 mg per week. Preferably the human dose is in the range of 5 µg per week to about 1000 µg per week. More

5 preferably a dose in the range of 10 µg per week to 1000 µg per week including administering 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg, 55 µg, 60 µg, 65 µg, 70 µg, 75 µg, 80 µg, 85 µg, 90 µg, 95 µg, or 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 500 µg, 750 µg, or 1000 µg one time per week. Although these dose ranges are set forth in units per week, it is contemplated that other time intervals may be used.

10 These suggested amounts of a compound are subject to a great deal of therapeutic discretion. The key factor in selecting an appropriate dose and scheduling is the clinical result obtained. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the compound, the method of

15 administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners.

Therapeutic agents of the invention may be frozen or lyophilized for storage and reconstituted in a suitable sterile carrier prior to use. Lyophilization and reconstitution can lead to varying degrees of compound activity loss. Dosages may have to be adjusted

20 to compensate. Generally, pH of the preparation between 4 and 8 is preferred.

A compound of the invention may be administered alone or in combination with other agents, for example, bone antiresorptive agents, including calcitonin, bisphosphonates, SERMs (e.g. raloxifene), hormone replacement therapy (HRT), calcium, Vitamin D1, Vitamin D2, Vitamin D3, Vitamin D4 and estrogen. A compound

25 of the invention may be co-administered with another agent. Alternatively a compound of the invention may be administered sequentially with another agent; for example a compound of the invention is administered alone for a period from one week to one year followed by administration of another agent, either together with said compound or in the absence of said compound.

30

Articles of Manufacture

In another embodiment of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment or prevention of the diseases or conditions described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label. Suitable
5 containers include, for example, bottles, vials, syringes, pens, inhalers, patches and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass, metal or plastic. The container holds a composition of the invention which is effective for preventing or treating the diseases or conditions and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper
10 piercable by a hypodermic injection needle). The active agent in the container is a composition of the invention. The label on, or associated with, the container indicates that the composition is used for treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose
15 solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

20

Example 1: Peptide Synthesis

Peptide synthesis is performed on Rapp AM RAM Fmoc-amide polystyrene resin (Rapp Polymere Tubingen, Germany) (substitution 0.6 to 0.7 mmol/g). The synthesis is performed using the Fmoc main-chain protecting group strategy. In addition, any amino
25 acid side chains that are aromatic, acid, basic or highly polar are likely to be reactive. These must also be protected to prevent unwanted branched chains from forming. There are four main groups used in this way: tBoc (a tertiary butyloxycarbonyl) for Lys and Trp; Pbf (a 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group) for Arg; tBu (a tertiary butyl group) for Ser, Asp, and Glu; Trt (a triphenylmethyl group) for Gln, His, and Asn). Amino acid side-chain derivatives used are: Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(OtBu),
30 Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(OtBu), Trp(Boc). Coupling is

26

-17-

carried out with approximately 10 equivalents of amino acid activated with diisopropylcarbodiimide (DIC) and hydroxybenzotriazole (HOBt) (1:1:1 molar ratio) in dimethylformamide (DMF). The Fmoc protecting group of the amino acid at position 1 is left in place to allow for selective conjugation of a Lysine side chain (see example 2 below).

- Concomitant cleavage from the resin and side chain protecting group removal is carried out in a solution containing trifluoroacetic acid: triisopropylsilane: methanol: anisole 90:5:2.5:2.5 for 1.5 to 2 hours at room temperature. Cleavage of the peptide from the Rink amide resin generates the C-terminal carboxamide form of the peptide.
- 10 Peptides are precipitated with diethyl ether, redissolved in 30-40 mL of 10 % acetonitrile and purified on a C₁₈ reversed-phase HPLC column at a flow rate of 12-15 mL/min with a linear AB gradient where A = 0.05% TFA/water and B = 0.05% TFA/acetonitrile. The column used is either a Waters SymmetryPrep 7 μ m, 19 x 300 mm or a Kromasil 10 μ m, 22 x 250 mm. Peptide purity and molecular weight is confirmed on an Agilent 1100
- 15 Series LC-MS system with a single quadrupole MS detector. Analytical HPLC separation is done on a Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 micron, 4.6 mm i.d. x 15 cm column with a linear AB gradient of 10 to 100 % B over 15 minutes in which A = 0.05 % TFA/H₂O and B = 0.05% TFA in 60:40 CH₃CN:H₂O and the flow rate is 1 mL/min. All peptides are purified to > 95 % purity and are confirmed to have molecular weight
- 20 corresponding to the calculated value within 1 amu.

Example 2: Peptide Conjugation

- Unconjugated peptide with an N-terminal Fmoc group in place is dissolved in 1 mL of water/acetonitrile 50/50 (36.8 mg, 4272.9 g/mol, 0.0086 mmol). A 1.5 to 2 fold
- 25 molar excess of mPEG-2kDa NHS ester (NOF Sunbright ME-020AS) is weighed out (39.7 mg, 2280 ave MW, 0.017 mmol). The peptide solution is diluted with 2 mL of 40 mM sodium borate, pH 9.8 buffer and 2 mL of acetonitrile and then added to the mPEG solution. The resultant mixture is vortexed and then stirred at room temperature. The reaction mixture is monitored by analytical reversed phase HPLC (method as described in
- 30 Example 1), and typically after 20 to 30 min reaction time, shows complete disappearance of the peptide peak (at about 14.5 min) and emergence of a peak due to the peptide-PEG

27

-18-

conjugate (at about 15.7 min). The mixture is cooled on dry ice, and 2 mL of piperidine is added to remove the N-terminal Fmoc group. The mixture is stirred at room temperature for 30 min, then cooled on dry ice and neutralized with 2 mL of glacial acetic acid (final pH = approximately 6-7). From analytical HPLC there should now be a peak at about 13.2 min due to the piperidine-fluorene adduct and a peak at about 14.25 min due to the deprotected peptide-mPEG conjugate. The mixture is diluted to about 40 mL with water and purified on either a Waters SymmetryPrep 7 μ m, 19 x 300 mm or a Kromasil 10 μ m, 22 x 250 mm at 12 mL/min with a 2-stage linear AB gradient of 0 to 30% B over 20 min followed by 30 to 80% B over 100 min where A = 0.05% TFA/water and B = 0.05% TFA/ acetonitrile.

The combined fractions containing the product are lyophilized to obtain the trifluoroacetate salt form of the peptide. The product may subsequently be converted to another desired salt form by procedures known in the art. The purified peptide is quantitated by UV absorbance at 280 nm using a calculated molar extinction coefficient based on the peptide sequence. The average MW of the conjugate is (ave PEG-NHS MW + Fmoc-Peptide MW - Fmoc MW - NHS MW) = 2280 + 4273 - 115 - 222 = 6216. For the example in which 36.8 mg of an unconjugated peptide is used, 34.8 mg of the pegylated peptide may be obtained. Conjugation of other peptides described in this invention, in which mPEG-NHS ester is used, is performed essentially as described above.

All data in Examples below use compounds of the invention that are C-terminal amide peptides that are mPEG-conjugated at the Lys residue of position 26 of the peptide backbone of the invention and are trifluoroacetate salts (see, e.g., SEQ ID NOs: 1-5).

Example 3: *In Vitro* Assay of cAMP Induction

SaOS-2 osteosarcoma cells are resuspended at 5×10^5 cells/mL in stimulation buffer [1 M HEPES/10% BSA/250 μ M IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, MP Biomedicals)/HBSS]. 20 μ L/well of cell suspension is added per well of a 96 well black half-area assay plate (Costar) to yield 1×10^4 cells/well. Then 20 μ L of diluted test compound (e.g., PTH analog of the invention, n = 2) is added immediately to the cells. Test compounds are prepared as $\frac{1}{2}$ log dilutions and assayed across a titration range of 3

-19-

μM to 0.1 nM. Plates are incubated for one hour at room temperature. A separate 96 well assay plate is also prepared containing cAMP as a standard curve. The cAMP standard is prepared as ½ log dilutions in stimulation buffer across a titration range of 400 to 0.0012 pmoles/well (40 μL/well) (n = 6). Following the one hour incubation step, cAMP is

5 assayed using the HTRF® (homogeneous time resolved fluorescence) cAMP dynamic 2 kit (Cisbio) according to manufacturer's directions.

When the following compounds are tested essentially as described above, they are found to induce cAMP production as tabulated below. These data demonstrate that these compounds have the potent ability to activate the PTH receptor (PTH1R) in a manner not

10 unlike PTH.

Table 1

Compounds	Average EC50 (nM) (n=2)
SEQ ID NO: 1 with 2kD mPEG	7.7
SEQ ID NO: 2 with 2kD mPEG	2.1
SEQ ID NO: 4 with 2kD mPEG	6.9
SEQ ID NO: 5 with 2kD mPEG	2.6

Example 4: *In Vivo* Evaluation of Conjugated Compounds**A. Young Adult Osteopenic Ovariectomized Rats**

15 Female Sprague-Dawley rats about 3 months¹ of age are ovariectomized, except for sham controls, and maintained on a 12 hour light/dark cycle at 22°C with *ad lib* access to food (TD 89222 with 0.5% Ca and 0.4%P, Teklad, Madison, WI) and water. Ovariectomized (Ovx) rats are allowed to lose bone for 25 days, and then weighed and randomized into treatment groups. Treatment is by subcutaneous injection of a

20 compound of the invention at various doses (as indicated in Table 2 below) for 1 month in a vehicle of 20 mM NaH₂PO₄ in 0.9% NaCl, 3 mg/ml mannitol, pH 5. The rats are injected with the compounds every third or fourth day to approximate once weekly administration to a human. Sham and Ovx controls are treated with the vehicle only ("sham vehicle control" and "ovx vehicle control").¹ Sera are collected by cardiac

25 puncture approximately 24 hours after final injection under isoflurane anesthesia at necropsy (approximately 24 hours after the final injection), and analyzed using a clinical chemistry analyzer (Hitachi 917, Tokyo, Japan).

-20-

At necropsy, left femora are removed, cleaned of soft-tissue and stored in 50% ethanol/saline at 4°C. At room temperature, femora in 50% EtOH/saline are wrapped in Parafilm and centered with respect to the gantry for quantitative computed tomography (QCT) (Research M, Stratec). A coronal scout scan of the distal femur metaphysis is generated first in 2D before 3D analysis. QCT parameters are measured including bone mineral density (BMD, mg/ml of hydroxyl apatite) bone mineral content (BMC, mg hydroxyl apatite), and cross-sectional area (mm²) as detailed previously (Sato, et al., *JPET*, 272:1252-1259, 1995).

Hypercalcemia is defined herein as the upper 97.5 percentile serum calcium value of normal ovariectomized vehicle controls for the animal type used, using clinical chemistry data and sera collected from cardiac puncture (International Federation of Clinical Chemistry, HE Solberg in Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th edition, Burtis CA and Ashwood ER, editors, 2001, pp 251-261). The value reflecting the 97.5 percentile is 11.2 mg of calcium per dL of serum from ovx vehicle control. The "Hypercalcemic Dose", i.e., the dose at which hypercalcemia is observed 24 hours after injection of the test compound using clinical chemistry data and sera collected from cardiac puncture, is determined by interpolation, using regression analysis to fit the calcemic dose response observed 24 hours after administering the compound to ovariectomized rats.

Ovariectomy significantly reduces BMD in rats relative to sham vehicle controls over a 7.5 week period (3.5 week pretreatment phase plus 4 week treatment phase)(Sato et al. *J. Med. Chem.* 42:1-24, 1999). Pegylated compounds of the invention are able to restore BMD back to sham vehicle control levels by the end of the 4 week treatment phase. For preferred pegylated compounds of the invention, tested within the parameters of this assay, the dose required to restore BMD to Sham vehicle control levels ("BMD Dose") is not greater than the Hypercalcemic Dose. When tested essentially as described above, the compounds listed in Table 2 below are able to restore BMD of the Ovx rats to sham vehicle control level after four weeks of treatment with a certain dosage; but, a similar or higher dose of the compound is needed to induce the Hypercalcemic Dose. Factors that affect the Hypercalcemic Dose/BMD Dose ratio include, but may not be limited to, the amino acid sequence of the peptide backbone and the position of the amino

acid at which the PEG is attached. Preferred compounds of the invention tested within the parameters of this assay have a Hypercalcemic Dose/BMD Dose ratio of equal to or greater than about 1.0 as shown in Table 2 below.

Table 2

Compound	BMD Dose [*] (nmole/kg) (μg/kg)		Hypercalcemic Dose ⁺ (nmole/kg) (μg/kg)		Hypercalcemic Dose/BMD Dose
SEQ ID NO: 1 with 5kD mPEG	3.7	34.3	>32.5**	>300	>8.8
SEQ ID NO: 2 with 5kD mPEG	6.7	59.8	>34	>300	>5.1
SEQ ID NO: 4 with 5kD mPEG	31.8	297.9	>32	>300	>1.00
SEQ ID NO: 5 with 5kD mPEG	4.4	41.0	>32.2	>300	>7.3

- 5 * dose to restore BMD to Sham control level within the assay parameters (as fit to a regression line and determined by interpolation)
 + dose at which hypercalcemia is observed 24 hours after administration of the test compound within the assay parameters (as fit to a regression line and determined by interpolation)
 10 ** ">" indicates that the dose stated was the highest dose tested and that hypercalcemia, as defined herein, was not reached at that dose.

B. Aged Osteopenic Ovariectomized Rats

In this example, the ability of pegylated compounds of the invention to increase biomechanical bone strength, BMD and BMC of Ovx rats to sham vehicle control levels is determined. A compound's effect on bone biomechanical strength is expected to be a better predictor of clinical efficacy than BMD. Vertebral BMD marginally predicts the clinical efficacy of osteoporosis therapies to reduce the incidence of vertebral fractures (Cummings, et al. *Am. Journal of Medicine*, 112:281-289, 2002; Sarkar et al. *J. Bone & Mineral Research* 17:1-20, 2002). Because PTH(1-34) reduces the risk of both vertebral and nonvertebral fractures (Neer et al. *NEJM*, 344:1434-1441, 2001), the efficacy of compounds of the invention are analyzed to demonstrate whether they increase bone biomechanical strength at the lumbar vertebra and at two nonvertebral sites, i.e., the femoral midshaft and the femoral neck.

Female Sprague-Dawley rats about 6 months of age are ovariectomized, except for sham controls, and maintained on a 12 hour light/dark cycle at 22°C with *ad lib* access to food (TD 89222 with 0.5% Ca and 0.4%P, Teklad, Madison, WI) and water. Ovariectomized (Ovx) rats are allowed to lose bone for one month before treatment with compounds of the invention for two additional months. The compound to be tested is

-22-

subcutaneously administered at various doses (as indicated in Table 3 below) in a vehicle of 20 mM NaH_2PO_4 in 0.9% NaCl, 3 mg/ml mannitol, pH 5, every 6 or 7 days for two months. Sham and Ovx controls are treated with the vehicle only ("sham vehicle control" and "ovx vehicle control"). Sera are then collected by cardiac puncture under isoflurane anesthesia at necropsy, and analyzed using a clinical chemistry analyzer. Lumbar vertebra L4-6 and left femora are removed, cleaned of soft-tissue and stored in 50% ethanol/saline at 4°C. At room temperature, L-5 in 50% EtOH/saline are wrapped in Parafilm and centered with respect to the QCT gantry (Research M, Stratec). A coronal scout scan of the L-5 vertebra is generated first in 2D before 3D analysis. QCT parameters are measured including BMD (mg/cc), BMC (mg), and cross-sectional area (mm²). Lumbar vertebra L-5, femoral midshaft, and proximal femur are then prepared for biomechanical testing. Strength (N) is evaluated by loading the specimens to failure as described previously (Sato, et al., *Endocrinology*, 10:4330-4337, 1997).

Pegylated compounds of the invention are evaluated in this assay relative to a positive control of 3-5 µg/kg/d PTH(1-38). PTH(1-34) and PTH(1-38) are found to be indistinguishable in terms of skeletal efficacy or calcemic effects in osteopenic ovariectomized rats. It has been previously shown that rats administered 5 µg/kg/d (1 nmol/kg/d) PTH(1-34) have a systemic exposure that is about 3 times that of PTH(1-34) (i.e., FORTEO™) in humans (Tashjian and Chabner, *J. Bone Miner Res*, 17:1151-1161, 2002; Tashjian and Gagel, *J. Bone Miner Res*, 21:354-365, 2006). PTH(1-34) 5 µg/kg/d has also been previously shown to restore vertebral BMD from Ovx to sham vehicle control levels in the aged osteopenic ovariectomized rat model (Kishi et al. *Bone* 22:515-522, 1998; Kimmel et al. *Endocrinology* 132:1577-1584, 1993). This is confirmed for PTH(1-38) in this model with a dosing of 3-5 µg/kg/d.

Ovaricectomy significantly reduces BMD, BMC and bone strength relative to sham vehicle controls over a three month period in aged rats. Compounds in Table 3 below, when tested essentially as described above, restore BMC of the Ovx rats to sham vehicle control levels when treated for eight weeks with the dose listed in Table 3. Further, compounds listed in Table 3, when tested essentially as described above, restore bone biomechanical strength of the Ovx rats to sham vehicle control level at one, two or three of the vertebral, midshaft and femoral neck locations tested.

32

-23-

For certain preferred compounds of the invention, tested within the parameters of this assay, hypercalcemia is not observed up to the maximum dose tested of approximately 110 nmol/kg. Preferred compounds of the invention, tested within the parameters of this assay, are able to restore BMD and BMC to sham vehicle control levels while also having a Hypercalcemic Dose/BMD Dose ratio equal to or greater than about 1.0, 2.0, 3.0 or 4.0, or even more preferably, greater than about 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 or greater. Preferred compounds of the invention, tested within the parameters of this assay, are able to restore BMD and BMC to sham vehicle control levels while also restoring bone biomechanical strength at one, two or three of vertebral, midshaft and femoral neck locations to sham vehicle control levels. Even more preferably, compounds of the invention, tested within the parameters of this assay, are able to restore BMC and bone biomechanical strength at one or more of vertebral, midshaft and femoral neck locations to sham vehicle control levels while also having a Hypercalcemic Dose/BMD Dose ratio equal to or greater than about 1.0, 2.0, 3.0 or 4.0, or even more preferably, equal to or greater than about 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 or greater.

The compound with SEQ ID NO: 4 with 2kD mPEG (ave mw) attains sham vehicle control level strength at a dose of 11 nmol/kg for vertebral, midshaft and femoral neck sites, in the absence of hypercalcemia at the highest dose tested. Therefore, this compound with has Hypercalcemic Dose/Biomechanical Strength Dose ratio of >10 for all three sites. Similarly, SEQ ID NO: 1 with 2kD mPEG restores vertebral and femoral neck strength to sham vehicle control levels at a dose of 11 nmol/kg, in the absence of hypercalcemia at the highest dose tested, and therefore has a Hypercalcemic Dose/Biomechanical Strength Dose ratio of >10 for these two sites. These data indicate that the sequence of the peptide backbone of a compound of the invention as well as the size of the mPEG conjugated to the peptide backbone of the compound contributes to skeletal efficacy (as reflected by BMD, BMC and strength measurements) of the compound.

Table 3

Compound	Hypercal- cemia Dose ⁺ (nmol/kg)	Vertebral BMD Dose ⁺⁺ (nmol/kg)	Vertebral BMC Dose [*] (nmol/kg)	Vertebral Strength Dose ^{**} (nmol/kg)	Midshaft Strength Dose [^] (nmol/kg)	Fem Neck Strength Dose ^{^^} (nmol/kg)
SEQ ID NO: 1 with 5kD mPEG	>107	>108	32	108	108	11
SEQ ID NO: 2 with 5kD mPEG	>112	112	34	32	108	32
SEQ ID NO: 4 with 5kD mPEG	>110	>107	32	107	32	32
SEQ ID NO: 5 with 5kD mPEG	>110	11	11	107	32	107
SEQ ID NO: 1 with 2kD mPEG	>110	110	32	11	32	11
SEQ ID NO: 2 with 2kD mPEG	>117	34	34	>117	117	34
SEQ ID NO: 4 with 2kD mPEG	>110	11	11	11	11	11
SEQ ID NO: 3 with 2kD mPEG	97	>110	11	>110	11	11

+ Dose at which hypercalcemia is observed in sera 24 hours after administration of the test compound within the assay parameters (as fit to a regression line and determined by interpolation). ">" indicates that the dose stated is the highest dose tested and that hypercalcemia, as defined herein, is not reached at that dose.

++ Dose at which Sham level of vertebral bone mineral density (BMD) is achieved within the assay parameters

* Dose at which Sham level of vertebral bone mineral content (BMC) is achieved within the assay parameters

** Dose at which vertebral strength comparable to sham and the positive control (3-5 µg/kg/d PTH(1-38)) is achieved (within assay controls)

^ Dose at which midshaft strength comparable to sham vehicle control and the positive control of 3-5 µg/kg/d PTH (1-38) is achieved

^^ Dose at which femoral neck strength comparable to sham vehicle control and the positive control of 3-5 µg/kg/d PTH (1-34) is achieved.

Table 4 below sets forth ratios of interest which are derived from the values in Table 3. Preferred compounds of the invention have a Hypercalcemic Dose/Vertebral BMD Dose ratio achieved within the parameters of the assay of about 1.0 or greater, more preferably equal to or greater than 3, 5, 6, 7, 8, 9 or 10. Preferred compounds of the invention have a Hypercalcemic Dose/Vertebral BMC Dose ratio achieved within the

parameters of the assay of about 3.0 or greater, more preferably greater than 5, 6, 7, 8, 9 or 10. Preferred compounds of the invention have a Hypercalcemic Dose/Vertebral Strength Dose ratio achieved within the parameters of the assay of about 1.0 or greater, more preferably 3, 5, 6, 7, 8, 9 or 10 or greater. Preferred compounds of the invention

5 have a Hypercalcemic Dose/Midshaft Strength Dose ratio achieved within the parameters of the assay of about 1.0 or greater, more preferably greater than 3, 5, 6, 7, 8, 9 or 10. Preferred compounds of the invention have a Hypercalcemic Dose/Femoral Neck Strength Dose ratio, achieved within the parameters of the assay, of about 3.0 or greater, more preferably about 5, 6, 7, 8, 9 or 10 or greater.

10

Table 4

Compound	Hypercalcemic Dose/ Vertebral BMD Dose	Hypercalcemic Dose/ Vertebral BMC Dose	Hypercalcemic Dose/ Vertebral Strength Dose	Hypercalcemic Dose/ Midshaft Strength Dose	Hypercalcemic Dose/ Femoral Neck Strength Dose
SEQ ID NO: 1 with 5kD mPEG	>1.0	>3.34	>1.0	>1.0	>9.7
SEQ ID NO: 2 with 5kD mPEG	>1.0	>3.14	>3.34	>1.0	>3.34
SEQ ID NO: 4 with 5kD mPEG	>1.02	>3.43	>1.02	>3.43	>3.43
SEQ ID NO: 5 with 5kD mPEG	>10.0	>10.0	>1.02	>3.43	>10.0
SEQ ID NO: 1 with 2kD mPEG	>1.0	>3.43	>10.0	>3.43	>10.0
SEQ ID NO: 2 with 2kD mPEG	>3.4	>3.4	1	>1	>3.4
SEQ ID NO: 4 with 2kD mPEG	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
SEQ ID NO: 3 with 2kD mPEG	<0.9	8.8	<0.9	8.8	8.8

Example 5

A compound of the invention with SEQ ID NO: 1, wherein the mPEG to which it is conjugated is a 2kD mPEG, is directly compared to a compound of the invention with

SEQ ID NO: 1, wherein the mPEG to which it is conjugated is a 5kD mPEG. Aged osteopenic ovariectomized rats are permitted to lose bone for one month before dosing (nmol/kg as in Table 5 and 6) every 6 days with vehicle alone, or the 2kD pegylated SEQ ID NO:1 compound or the 5kD pegylated SEQ ID NO:1 compound for 8 weeks. Table 5 displays the average serum calcium (mg/dL) values 24 hours after dosing. Table 6 displays the average BMD (mg/cc).

Animals dosed with either compound have normal serum calcium levels 24 hours after dosing. However, the compound with the 2kD mPEG has less effect on serum calcium while exhibiting better BMD skeletal efficacy at low, middle and high doses than does the compound with the 5kD mPEG. These data demonstrate that the 2kD pegylated compound is similar to the 5kD pegylated compound in skeletal efficacy while having lower serum calcium effects.

Table 5 Serum Calcium (mg/dL)

Dose (nmol/kg)	Sham	Ovx	PEG 2kD	PEG 5kD
0	10.69	10.68		
11			10.45	10.86
32			10.38	10.79
108				11.03
110			10.25	

Table 6 Vertebral BMD (mg/cc)

Dose (nmol/kg)	Sham	Ovx	PEG 2kD	PEG 5kD
10.3	625	544		
11			590	567
32			603	589
108				612
110			623	

Example 6 PTH(1-34) in Aged Osteopenic Ovariectomized Rats

36

-27-

Six-month old ovariectomized Sprague-Dawley rats are maintained on a 12 hr light/dark cycle at 22°C with *ad lib* access to food (TD 89222 with 0.5% Ca and 0.4%P, Teklad, Madison, WI) and water. Ovariectomized rats are allowed to lose bone for 1 month, before treatment with rhPTH (1-34) for the following 3 months. The aged
 5 osteopenic ovariectomized rats are injected subcutaneously, weekly, with 0, 10 or 30 µg/kg human PTH(1-34) for 12 weeks. Sham and ovx controls are injected with the vehicle only. Lumbar vertebra are excised at necropsy and analyzed by micro-CT (Stratec), and then prepared for biomechanical testing. Strength in Newtons, (N), is evaluated by loading vertebra specimens to failure. Significance with respect to ovx
 10 vehicle controls is indicated by * in Table 7 below (Fishers PLSD, P<0.05). Model data are provided in Table 7 below.

Relative to Ovx vehicle controls, PTH(1-34) up to 30 µg/kg (7 nmol/kg) has no significant effect on vertebral BMD or vertebral biomechanical strength in osteopenic ovariectomized rats after 12 weeks of treatment. Serum calcium is normal when
 15 measured approximately 24 hours after the last dose. In comparison to data shown hereinabove, compounds of the invention have superior vertebral BMD and biomechanical vertebral strength relative to weekly PTH (1-34).

Table 7: Skeletal Efficacy of Weekly Dosing of PTH(1-34)

VERTEBRAL BMD:		
Group	Dose (µg/kg)	Average BMD mg/mL
Sham	0	605*
Ovx	0	512
PTH(1-34)	10	534
PTH(1-34)	30	529
VERTEBRAL STRENGTH:		
Group	Dose (ug/kg)	Average Load to Failure (N)
Sham	0	277*
Ovx	0	210
PTH(1-34)	10	222
PTH(1-34)	30	243

20

Example 7 PTH Receptor Internalization

The kinetics of PTHR1 (PTH Receptor 1) internalization for compounds of the invention are determined following ligand binding to membrane receptors. HEK 293 cells are transfected with PTHR-cmGFP plasmid (Invitrogen).

The cells are seeded at 7,000 cells/well, 100 μ L/well into clear bottomed, black, 96 well plate coated with poly-D lysine. 24 hours after being seeded into the 96 well plate, the cells are dosed with 10 μ L of a compound to be tested, at final concentrations of 100nM at staggered time points from 0 minutes to 3 hours. Media is aspirated at end point of dosing. Cells are fixed with 100 μ L Prefer (Anatech, Battle Creek, MI) for 30 minutes. Prefer is aspirated from the cells, and cells are washed three times with 100 μ L 1XPBS. Cells are stained with 100 μ L diluted Hoechst nuclear stain (diluted in 1XPBS) for 30 minutes. Hoechst stain is aspirated and replaced with 1XPBS. Plates are stored in the dark at 4°C until scanning. Cells are scanned within 48 hours using a Cellomics® ArrayScan. Representative data from various timepoints, set forth as percent of vehicle only control (baseline = 100%), are presented in Table 8.

Table 8

Compound*	20 min	40 min	60 min	180 min
PTH(1-38)	166	177	224	175
SEQ ID NO:4 but unpegylated and lysine at amino acid 26	136	132	136	151
SEQ ID NO:4 with 2kD mPEG	154	167	186	163
SEQ ID NO:4 with 5kD mPEG	106	96	98	107
SEQ ID NO:2 but unpegylated and lysine at amino acid 26	126	114	139	139
SEQ ID NO:2 with 2kD mPEG	148	102	107	96
SEQ ID NO:2 with 5kD mPEG	128	95	108	102
SEQ ID NO:1 but unpegylated and Lysine at amino acid 26	106	126	113	142
SEQ ID NO:1 with 2kD mPEG	160	120	104	102
SEQ ID NO:1 with 5kD mPEG	127	93	91	92

These data show that compounds of the invention have markedly different internalization kinetics than PTH(1-38), depending on the sequence of the peptide backbone, whether or not it is pegylated, and the PEG size. Note that the unpegylated

38

-29-

molecules have the backbone of the Sequence named with the exception that there is a lysine residue at position 26. The slower internalization kinetics indicates a reduced rate of PTHR1 receptor internalization when ligand-PTHr1 receptor complexes form using compounds of the invention, resulting in a greater magnitude of signaling in the cell after

5 ligand binding. This is likely part of the explanation for the improved skeletal efficacy observed for forms of compounds of the invention with 2kD PEG with weekly dosing over that observed with weekly PTH dosing.

10

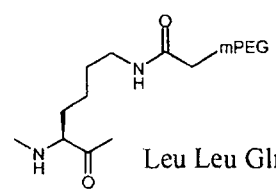
-30-

WE CLAIM:

1. A compound with the sequence of:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa₈ His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Xaa₁₈ Glu Arg

5

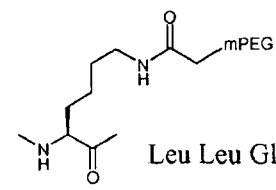
Val Glu Trp Leu Arg  Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe - NH₂ (SEQ ID NO: 6);

10 wherein Xaa₈ and Xaa₁₈ are Met or Xaa₈ and Xaa₁₈ are Nle; and wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. A compound of claim 1 having the amino acid sequence:

15 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Met Glu Arg

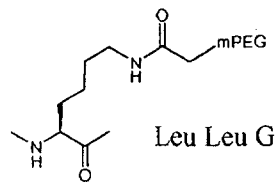
20 1).

Val Glu Trp Leu Arg  Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe - NH₂ (SEQ ID NO: 1).

3. A compound of claim 1 having the amino acid sequence:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

25

Val Glu Trp Leu Arg  Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe -NH₂
(SEQ ID NO:4);

30

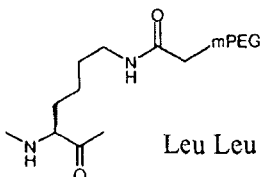
-31-

4. A compound selected from the group consisting of:

a) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

5

Val Glu Trp Leu Arg

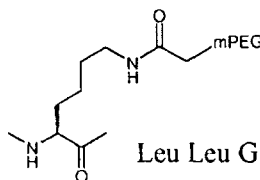


Leu Leu Gln Glu Val -NH₂ (SEQ ID NO :2);

b) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala Ser Met Glu Arg

10

Val Glu Trp Leu Arg



Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe - NH₂ (SEQ ID NO:

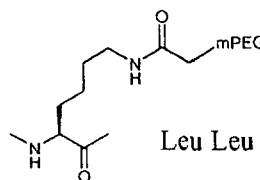
3);

15 and

c) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

20

Val Glu Trp Leu Arg



Leu Leu Gln Glu Val His Gln Phe -NH₂

(SEQ ID NO: 5);

wherein mPEG is monomethoxy-polyethylene glycol with an average molecular weight of from 1500 to 5500 Daltons; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

25 5. An intermediate with a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8-12.

6. The compound of any one of claims 1 to 4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein mPEG has an average molecular weight of from about 2000 to 5000

30 Daltons.

41

-32-

7. The compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein mPEG has an average molecular weight of about 2000 Daltons.

8. A composition comprising a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof; in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

9. The composition of claim 8, wherein mPEG has an average molecular weight of from about 2000 to 5000 Daltons.

10

10. The composition of claim 8, wherein mPEG has an average molecular weight of about 2000 Daltons.

11. A method of inducing bone formation in a mammal comprising administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

12. A method of treating a disease or condition in which new bone formation and/or an increase in bone mass and bone biomechanical strength would be beneficial in a mammal, including osteoporosis, osteopenia, bone fracture, spinal fusion, bone implants, joint implants, dental implants, and periodontal disease, comprising administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

13. A method of treating osteoporosis or osteopenia in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

14. A method of preventing osteoporosis or osteopenia in a mammal comprising administering to a mammal in need of such prevention an effective amount of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

42

-33-

15. A method of treating a bone fracture in a patient comprising administering to a patient in need of such treatment an effective amount of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
- 5 16. The method of any one of claims 11 to 15, wherein mPEG has an average molecular weight of from about 2000 to 5000 Daltons.
- 10 17. The method of any one of claims 11 to 15, wherein mPEG has an average molecular weight of about 2000 Daltons.
18. A compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in therapy.
- 15 19. A compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in the induction of bone formation in a mammal.
- 20 20. A compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in treating a disease or condition in which new bone formation and/or an increase in bone mass and bone biomechanical strength would be beneficial in a mammal, including osteoporosis, osteopenia, bone fracture, spinal fusion, bone implants, joint implants, dental implants, and periodontal disease.
- 25 21. A compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in treating osteoporosis in a mammal.
22. A compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in preventing osteoporosis or osteopenia in a mammal.
- 30 23. A compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in treating a bone fracture in a mammal.

-34-

24. The compound of any of claims 18 to 23, wherein mPEG has an average molecular weight of from about 2000 to 5000 Daltons.
- 5 25. The compound of any of claims 18 to 23, wherein mPEG has an average molecular weight of about 2000 Daltons.
26. The compound of any of claims 18 to 23 wherein the mammal is a human.
- 10 27. Use of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament for treating a disease or condition capable of being improved or prevented by induction of bone formation.
- 15 28. Use of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of conditions in which new bone formation and an increase in bone mass and bone biomechanical strength would be beneficial in a mammal, including osteoporosis, osteopenia, bone fracture, spinal fusion, bone implants, joint implants, dental implants, and periodontal disease.
- 20 29. Use of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament for treating osteoporosis or osteopenia in a mammal.
- 25 30. Use of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament for preventing osteoporosis or osteopenia in a mammal.
- 30 31. Use of a compound of any one of claims 1-4, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament for use in treating a bone fracture in a mammal.

44

-35-

32. The use of any of claims 27 to 31, wherein mPEG has an average molecular weight of from about 2000 to 5000 Daltons.

33. The use of any of claims 27 to 31, wherein mPEG has an average molecular weight of
5 about 2000 Daltons.

34. The use of any of claims 27 to 31, wherein the mammal is a human.

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> PEGYLATED PTH RECEPTOR MODULATORS AND USES THEREOF

<130> X17107

<140> PCTUS0780367

<141> 2007-10-04

<160> 12

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa at position 26 is a modified lysine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Amidation

<400> 1

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 is Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa at position 18 is Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa at position 26 is a modified lysine

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> AMIDATION

<400> 2

Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Glu Val
20 25 30

<210> 3
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa at position 26 is a modified Lysine

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Amidation

<400> 3

Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

47

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

<210> 4
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 is Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa at position 18 is Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa at position 26 is a modified lysine

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Amidation

<400> 4

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

<210> 5
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 is Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa at position 18 is Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa at position 26 is a modified lysine

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Amidation

<400> 5

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Glu Val His
20 25 30

Gln Phe

<210> 6
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 is Met if Xaa at position 18 is also Met; or
Xaa at position 8 is Norleucine if Xaa at position 18 is also
Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa at position 8 is Met if Xaa at position 18 is also Met; or
Xaa at position 8 is Norleucine if Xaa at position 18 is also
Norleucine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa at position 26 is a modified lysine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> AMIDATION

<400> 6

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

<210> 7

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Modified with FMOC

<400> 7

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

10

<210> 8
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> May or may not be amidated

<400> 8

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

<210> 9
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 is Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa at position 18 is Norleucine

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> May or may not be amidated

<400> 9

Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala

07

1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Glu Val
20 25 30

<210> 10
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> MAY OR MAY NOT BE AMIDATED

<400> 10

Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

<210> 11
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 is Norleucine

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa at position 18 is Norleucine

<220>
<221> MOD_RES

52

<222> (34)..(34)

<223> May or may not be amidated

<400> 11

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Arg His Leu Ala

1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His

20 25 30

Asn Phe

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> SYNTHETIC CONSTRUCT

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa at position 8 is Norleucine

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa at position 18 is Norleucine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> May or may not be amidated

<400> 12

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Gln Arg Gly Arg His Leu Ala

1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Glu Val His

20 25 30

Gln Phe

B

MODULADORES DE RECEPTOR PTH Y USOS DE LOS MISMOS

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos de América No. 60/829,383 emitida en octubre 13 de 2006.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona a compuestos del modulador de receptor de hormona paratifoidea (PTHR) y a métodos de producción y uso de ellos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades degenerativas de huesos tales como la osteoporosis ocurren en una porción sustancial de la población más adulta. La osteoporosis abarca un grupo de trastornos heterogéneos que representan un riesgo mayor para fracturas de huesos, y una carga sustancial en el sistema del cuidado de la salud. Billones de dólares se gastan anualmente en cuidado médico para el tratamiento de osteoporosis. Clínicamente, la osteoporosis se caracteriza por la masa ósea disminuida, densidad mineral en huesos disminuida (BMD) y contenido de mineral óseo (BMC), y pérdida de arquitectura ósea que resulta en resistencia ósea disminuida y riesgo incrementado de fractura de huesos.

Mientras que un sinnúmero de agentes anti-resorción que

incluyen calcitonina, bisfosfonatos, estrógeno, y SERM previenen mayor pérdida ósea, no reconstruirán el hueso una vez que ésta ha sido perdido. Al principio la FDA aprobó un agente de construcción de hueso anabólico para el tratamiento de osteoporosis en PTH (1-34) humano, también conocido como teriparatide, el cual se comercializa bajo la marca comercial de FORTEO® (Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN). El PTH o PTH(1-34) se cree que ejerce sus efectos a través de la activación mediada del receptor de dos rutas de señalización intracelular, vía (1) ciclase de adenilato y cinasa A de proteína, y (2) fosfolipasa C y cinasa C de proteína. El PTH(1-34) construye masa ósea, restaura la arquitectura ósea, y reduce el riesgo de fracturas de hueso vertebral y no vertebral en pacientes con osteoporosis quienes están en riesgo alto de fractura FORTEO® (Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN). PTH o PTH(1-34) (R. Neer, NEJM, 344:1434, 2001). Como un producto péptido, el PTH(1-34) requiere inyecciones subcutáneas diariamente. La Publicación Internacional Número 2004/060386 describe un género enorme de moduladores PTH/PTHrP que comprende un vehículo que provoca respuesta hipercalcémica mayor que PTH(1-34).

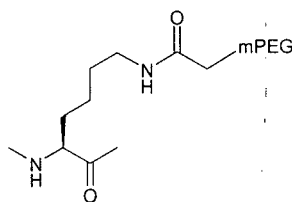
Permanece una necesidad para análogos PTH terapéuticos novedosos que demuestren eficacia de construcción ósea como se refleja mediante el contenido mineral óseo (BMC) y/o resistencia ósea mientras que preferiblemente mantienen un

5

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de:

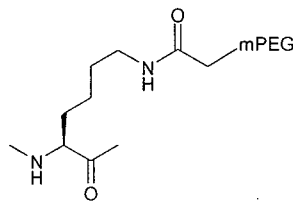
10



15

His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

20



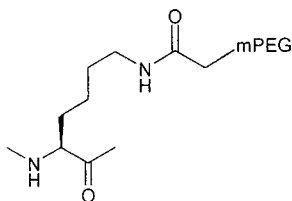
Val Glu Trp Leu Arg

(SEQ ID NO :2),

c) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg
His Leu Ala Ser Met Glu Arg

5

Val Glu Trp Leu Arg



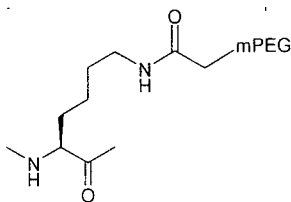
Leu Leu Gln Asp Val His

Asn Phe - NH₂ (SEQ ID NO: 3),

d) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly Arg
His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

10

Val Glu Trp Leu Arg

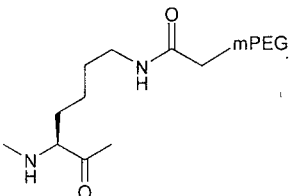


Leu Leu Gln Asp Val His

Asn Phe -NH₂ (SEQ ID NO:4), y

e) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg
15 His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

Val Glu Trp Leu Arg



Leu Leu Gln Glu Val His

Gln Phe -NH₂ (SEQ ID NO:5), en donde mPEG es monometoxi
20 polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500
hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta
5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000
Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

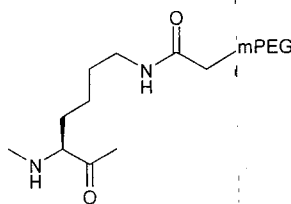
En una modalidad preferida, la invención proporciona un
25 compuesto con la secuencia de:

87

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His
Leu Ala Ser Met Glu Arg

5

Val Glu Trp Leu Arg



Leu Leu Gln Asp Val

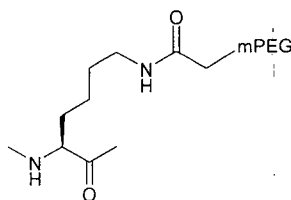
His Asn Phe - NH₂ (SEQ ID NO:1), en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

En otra modalidad preferida, la invención proporciona un compuesto con la secuencia de:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly Arg His
15 Leu Ala Ser Nle Glu Arg

Val Glu Trp Leu Arg



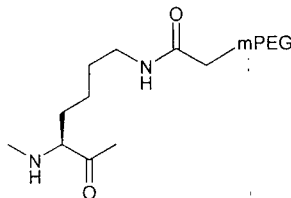
Leu Leu Gln Asp Val His

20 Asn Phe -NH₂ (SEQ ID NO:4), en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad preferida, la invención proporciona un compuesto con la secuencia de:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa₈ His Asn Leu Gly Arg His Leu
Ala Ser Xaa₁₈ Glu Arg

5



Val Glu Trp Leu Arg

Leu Leu Gln Asp Val His

Asn Phe - NH₂ (SEQ ID NO: 6);

10 en donde Xaa₈ y Xaa₁₈ son Met o Xaa₈ y Xaa₁₈ son Nle; y en
donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso
molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones,
preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más
preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal
15 farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, la invención proporciona un compuesto con la secuencia de:

a) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg
His Leu Ala Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
20 Gln Asp Val His Asn Phe (SEQ ID NO: 8),

b) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg
His Leu Ala Ser Nle Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
Gln Glu Val (SEQ ID NO :9),

89

c) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg
His Leu Ala Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
Gln Asp Val His Asn Phe (SEQ ID NO: 10),

d) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly Arg
5 His Leu Ala Ser Nle Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
Gln Asp Val His Asn Phe (SEQ ID NO:11), and

e) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg
His Leu Ala Ser Nle Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
Gln Glu Val His Gln Phe (SEQ ID NO: 12); o la amida de
10 terminal C de los mismos.

La invención proporciona un método de inducción de
formación de hueso en un mamífero que comprende la
administración a un mamífero en necesidad del mismo
tratamiento en una cantidad efectiva tal de un compuesto de
15 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi
polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500
hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta
5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000
Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 La invención proporciona un método de tratamiento de una
enfermedad o condición en la cual la formación de hueso nuevo
y/o un incremento en la masa ósea y resistencia biomecánica
ósea podría ser benéfica en un mamífero, incluyendo
osteoporosis, osteopenia, fractura ósea, fusiones espinales,
25 implantes óseos, implantes de articulaciones, implantes

60

dentales y enfermedad periodontal, que comprende la administración a un mamífero en necesidad de este tratamiento de una cantidad efectiva de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención proporciona un método de tratamiento de osteoporosis u osteopenia en un paciente, que comprende la administración a un paciente en necesidad del tratamiento de una cantidad efectiva de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona un método de prevención de osteoporosis u osteopenia en un mamífero que comprende la administración a un mamífero en necesidad de la prevención de una cantidad efectiva de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000

Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención proporciona un método de tratamiento de una fractura ósea en un paciente, que comprende la administración a un paciente en necesidad del tratamiento de una cantidad efectiva de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, esta invención proporciona un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del

mismo, para uso en terapia.

En una modalidad, esta invención proporciona un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de
5 desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la inducción de formación de hueso en un mamífero, preferiblemente un humano.

10 En una modalidad, esta invención proporciona un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de
15 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición en el cual la formación de hueso nuevo y/o un incremento en la masa ósea y la resistencia biomecánica ósea podría ser benéfica en un mamífero, preferiblemente un
20 humano, que incluye osteoporosis, osteopenia, fractura ósea, fusión espinal, implantes óseos, implantes de articulaciones, implantes dentales y enfermedad periodontal.

En una modalidad, esta invención proporciona un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es
25 monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de

desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de osteoporosis en un mamífero, preferiblemente un humano.

En una modalidad, esta invención proporciona un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención de osteoporosis en un mamífero, preferiblemente un humano.

En una modalidad, la invención proporciona un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de una fractura ósea en un mamífero, preferiblemente un humano.

La invención proporciona el uso de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta

5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición capaz de ser mejorada o prevenida por inducción de formación ósea.

La invención proporciona el uso de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de condiciones en las cuales la formación de hueso nuevo y/o un incremento en la masa ósea y una resistencia biomecánica ósea podría ser benéfica en un mamífero, preferiblemente un humano, incluyendo osteoporosis, osteopenia, recuperación de fractura ósea, fusión espinal, implantes óseos, implantes de articulaciones, implantes dentales, y enfermedad periodontal.

La invención también proporciona el uso de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de

65

osteoporosis en un mamífero, preferiblemente un humano.

La invención también proporciona el uso de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para la fabricación de un medicamento para la prevención de osteoporosis u osteopenia en un mamífero, preferiblemente un humano.

La invención también proporciona el uso de un compuesto de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, ó 6 en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para la fabricación de un medicamento para el uso en el tratamiento de una fractura ósea en un mamífero, preferiblemente un humano.

20

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La formación de hueso ocurre durante el desarrollo fetal y en el crecimiento postnatal y también durante la vida adulta ya sea en un grado bajo como parte de la remodelación del hueso normal o en un grado acelerado en respuesta a

bb

lesión o pérdida de hueso anormal. La formación de hueso involucra un sinnúmero de procesos, que incluyen proliferación de células progenitoras de osteoblastos, diferenciación de osteoblastos de células progenitoras y mineralización de la matriz producida por los osteoblastos. El término "inducción de formación de hueso" o "inducción de hueso nuevo" se toma para significar un incremento neto en la masa ósea (por ejemplo, como se demuestra por un incremento en el contenido mineral óseo" ("BMC") y/o resistencia biomecánica de hueso como se determina usando el método del Ejemplos 4B en la presente.

El término "cantidad efectiva" como se usa en la presente es una dosis de un compuesto de la invención necesario para lograr el efecto farmacológico deseado.

El término "actividad in Vitro" se refiere a la actividad de un compuesto de la invención en uno o más ensayos in Vitro apropiados que incluyen, por ejemplo, la capacidad para activar un receptor PTH en un ensayo basado en células. La actividad se puede expresar como "EC₅₀" el cual identifica una concentración efectiva de un compuesto que resulta en 50% de activación máxima en el ensayo de selección. Cualquier ensayo in Vitro apropiado se puede usar para evaluar el enlazamiento y activación del receptor PTH, incluyendo la activación de la ciclase adenilada que resulta en niveles de AMP cíclico (cAMP) incrementados (ver Ejemplo 3

en la presente). Los compuestos de la invención tienen actividad agonística variable que lleva a un incremento en el cAMP intracelular.

En su forma típica, mPEG (monometoxi polietilenglicol) es un polímero lineal con grupos hidroxilo terminales que tienen la fórmula $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, en donde n es desde alrededor de 8 hasta alrededor de 4000. El mPEG usado en la presente invención tiene un peso molecular promedio de desde 1,500 hasta 5,500 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2,000 hasta 5,000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2,000 hasta 2,300 Daltones, aún más preferiblemente alrededor de 2,000 Daltones. Los reactivos mPEG disponibles comercialmente (por ejemplo, NOF SUNBRIGHT® ME-020AS) generalmente tienen algún grado de polidispersividad, que significa que " n " varía en un rango en una distribución aproximadamente Gausiana, preferiblemente en un rango angosto. El hidrógeno Terminal generalmente se puede sustituir con un grupo de terminación tal como un grupo alquilo o aromático. Aunque en la molécula de mPEG el hidrógeno Terminal se sustituye con un grupo metoxi, se contempla que el hidrógeno Terminal se pueda sustituir con una cadena de carbón de longitud variada, por ejemplo, hasta una cadena de 10 carbonos, lineal o ramificada, y todavía cae dentro de la invención.

Un compuesto con una secuencia como se muestra en SEQ ID

bb

Nos: 8-12 se puede usar como un intermedio en la síntesis de un compuesto pegilado de la invención. Preferiblemente un compuesto con una secuencia como se muestra en SEQ ID Nos: 8-12 está en la forma de amida en la terminación carboxi del compuesto.

Los términos "ligadura", "porción de ligadura", y "espaciador" se toman en la presente para referirse a un átomo o una colección de átomos usados de forma opcional para ligar porciones de interconexión tales como una terminación de un segmento de polímero y un péptido. La porción de ligadura es la porción del polímero general que contiene una porción de reactivo para permitir el acoplamiento covalente a un sitio reactivo mutuamente en un péptido.

El término "conjugado" (o intercambiablemente "péptido conjugado") se toma en la presente para indicar una molécula heterogénea formada mediante el acoplamiento covalente de un péptido a una molécula PEG.

El término "acoplamiento covalente" significa que un péptido y una molécula de polietilén glicol están unidos ya sea covalentemente directamente una a la otra, o además están unidos covalentemente indirectamente una a la otra a través de una porción o porciones de intervención, tal como una ligadura, porción de ligadura o espaciador.

Los compuestos pegilados de la presente invención pueden reaccionar con cualquiera de un sinnúmero de ácidos o bases

69

inorgánicas y orgánicas para formar sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas son aquellas formadas con ácido de acetato, ácido de citrato y ácido clorhídrico. Especialmente preferidas son las sales de acetato de los compuestos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde mPEG es polietilén glicol monometoxi con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones, preferiblemente alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones, más preferiblemente alrededor de 2000 Daltones. Los métodos para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención son bien conocidos para los técnicos expertos (Ver: Stahl y colaboradores, "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use," VCHA/Wiley-VCH (2002); y Berge y colaboradores, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66:1-19, 1977).

Las enfermedades degenerativas de huesos, tales como osteoporosis, se caracterizan por masa ósea disminuida, BMD disminuida, y pérdida de arquitectura ósea que resulta en la resistencia ósea disminuida, y riesgo incrementado de fractura de hueso. Los compuestos pegilados de la invención pueden construir masa ósea, incrementar la resistencia biomecánica ósea, restaurar la arquitectura ósea, y reducir el riesgo de fracturas de hueso vertebral y no vertebral en pacientes con osteoporosis quienes están en riesgo alto de fractura. Así, los compuestos pegilados de la invención son

útiles como agentes de construcción de huesos para tratar o prevenir enfermedades degenerativas de huesos, tales como osteoporosis. Más aún, los compuestos pegilados de la invención son útiles como agentes de construcción de huesos para hacer posible la recuperación de fracturas y estimular el crecimiento de hueso en la ubicación de los implantes óseos, implantes de articulaciones o implantes dentales, o para tratamiento de enfermedad periodontal.

Los pacientes apropiados incluyen hombres, mujeres, y niños que sufren de condiciones de pérdida ósea y trauma óseo, por ejemplo, fractura de huesos, en la cual la formación de hueso nuevo, un incremento en la masa ósea, y/o un incremento en la resistencia biomecánica ósea podría ser benéfica. Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden administrar como un medio para inducir formación de hueso y/o incrementar la masa y la resistencia ósea, reduciendo así el riesgo de fractura ósea vertebral y no vertebral en un paciente en riesgo de tales fracturas, que incluyen pacientes que sufren de osteoporosis u osteopenia, por ejemplo, pacientes que tienen osteoporosis relacionada con la edad, osteoporosis inducida por esteroides, osteoporosis posmenopáusica, osteoporosis idiopática, y osteoporosis primaria o secundaria. Los sitios no vertebrales incluyen, por ejemplo, cadera, antebrazo, húmero, tibia, radio, tobillo, costilla, pie, pelvis, y fémur.

Los compuestos pegilados de la invención también pueden ser administrados a un paciente para mejorar o acelerar la recuperación de fractura vertebral y/o no vertebral, por ejemplo, en un paciente quien ha sufrido un trauma que resulta en una fractura de hueso, por ejemplo, debido a un accidente o lesión deportiva, o quien ha sufrido una fractura de fragilidad asociada con masa ósea baja, que incluye cadera, antebrazo, húmero, tibia, radio, tobillo, costilla, pie, pelvis, y fémur.

Síntesis del Compuesto.

Los compuestos de la invención se pueden preparar como se describe en el siguiente esquema ejemplificado para la síntesis de un compuesto con SEQ ID NO:1:

Resina de poliestireno de amida H₂N-Rink

↓

Síntesis de péptido en fase sólida
Estrategia Fmoc, activación de
DIC/HOBt

Resina de amida Fmoc-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Arg-His-Leu-Ala-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe (SEQ ID NO: 7)-Rink (grupos de protección de cadena lateral: Boc for Lys and Trp; Pbf for Arg; tBu for Ser, Asp, and Glu; Trt for Gln, His, y Asn)

↓

1. Desdoblamiento TFA

2. Purificación de CLAP de rp

Fmoc-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Arg-His-

Leu-Ala-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-

5 Asp-Val-His-Asn-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 7)

1. mPEG-NHS

2. piperidina (remoción Fmoc)

3. acidez

4. purificación de CLAP en fase

10

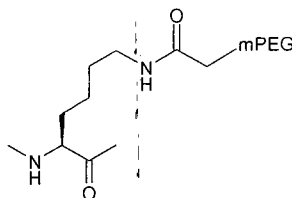
inversa

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Arg-His-Leu-

Ala-Ser-Met-

15

Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg



Leu-Leu-Gln-Asp-

Val-His-Asn-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 1)

20

La cadena de péptido de los compuestos de la presente invención se puede sintetizar usando procedimientos de síntesis de fase sólida manual o automática estándar. Los sintetizadores de péptido automatizados están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA) y Protein Technologies, Inc. (Tucson, AZ). Los reactivos para síntesis en fase líquida están disponibles fácilmente de fuentes comerciales. Los sintetizadores en fase

25

73

líquida se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante para bloquear grupos de interferencia, protección de aminoácidos durante reacción, acoplamiento, desprotección, y tapado de aminoácidos no reaccionados.

5 Comúnmente, un aminoácido protegido por N^α-carbamoilo y el aminoácido de terminal N en la cadena de péptido de crecimiento acoplada a una resina están acoplados a temperatura ambiente en un solvente inerte tal como dimetilformamida, N-metilpirrolidona o cloruro de metileno en
10 la presencia de agentes de acoplamiento tal como carbamida de diisopropilo (DIC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). El grupo de protección de N^α-carbamoilo se remueve de la resina de péptido que resulta usando un reactivo tal como ácido trifluoroacético (TFA) o piperidina, y la reacción de
15 acoplamiento se repite con el siguiente aminoácido protegido con N^α- deseado para ser agregado a la cadena de péptido. Los grupos de protección de amina apropiados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and
20 Sons, 1991. Los ejemplos más comúnmente usados incluyen tBoc y fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Después de terminar la síntesis, los péptidos se desdoblan para el soporte de fase sólida con desprotección de cadena lateral simultánea usando métodos de tratamiento estándar bajo condiciones ácidas.

M

El técnico experto apreciará que la cadena de péptido de los compuestos de la invención se puede sintetizar ya sea con un ácido libre de terminal C o carboxamida. El tipo de resina de poliestireno derivado usado para la síntesis determinará la porción de terminal C después de ser desdoblado. El tipo de resina de poliestireno derivado usado para la síntesis determinará la porción de la terminal C después de desdoblamiento. Un sinnúmero de ligaduras son bien conocidas y rutinariamente usadas en el arte. Para la síntesis de péptidos de amida de terminal C, resinas de incorporación de ligaduras de MBHA de amida Rink o AM de amida de Rink se usan comúnmente con síntesis de Fmoc, mientras la resina de MBHA generalmente se usa con síntesis de tBoc. Para la generación de péptidos de ácido de terminal C, 2-Cloronitrilo o resina Wang se usa comúnmente para síntesis de Fmoc, mientras la síntesis de tBoc generalmente emplea resina PAM. Los métodos para cargar el primer aminoácido para la resina son bien conocidos en la técnica.

Los péptidos crudos comúnmente se purifican usando Cromatografía Líquida de Alto Desempeño de Fase Inversa (rp-CLAP) en columnas de C8 ó C18 que usan gradientes de agua-acetonitrilo en 0.05 a 0.1% TFA. La pureza se puede verificar mediante CLAP de rp. La identidad de péptidos se puede verificar por espectrometría de masas. Los péptidos pueden

ser solubilizados en soluciones amortiguadoras en un amplio rango de pH.

La conjugación de mPEG a un péptido se puede llevar a cabo usando reacciones sintéticas químicas bien
5 caracterizadas (Ver: Roberts y colaboradores, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 459-476 (2002) y Veronese, F.M., *Biomaterials* 22:405-417 (2001) o de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Es preferible que el procedimiento utilice un
exceso molar de un polímero relativo con el péptido para
10 llevar la reacción a término. El reactivo mPEG en exceso se separa de los productos del péptido conjugado mediante los métodos de separación convencional tal como CLAP rp.

La química de conjugación usada en la preparación de compuestos pegilados de la invención es la formación de
15 enlace de amida entre un mPEG-carboxilato activado como, por ejemplo, un NHS éster (N-hidroxisuccinimida) y un grupo amino en el péptido. La ligadura entre el mPEG y el péptido es CO-CH₂ (carboxi metilo). La secuencia del péptido de la invención se diseña para contener una cadena lateral de Lys
20 sencilla para permitir la reacción selectiva con el éste de mPEG-NHS que se produce. Generalmente esto también involucra la derivación del término amino con un grupo de protección tal como Fmoc o trifluoroacetilo, el cual se remueve subsecuentemente. Alternativamente, la terminación amino se
25 puede dejar no protegida y la acilación parcialmente

76

selectiva de la cadena lateral de Lys se puede obtener bajo pH óptimo y condiciones de solvente (Ver, Patente de EUA No. 5,646,242). La conjugación de amida se realiza preferiblemente con un éster mPEG-NHA derivado y un péptido protegido de Fmoc de terminal N que contiene un Lys sencillo (u otro aminoácido que contiene amina) en una mezcla acuosa a pH de 9 a 10 y a temperatura ambiente por 20 a 60 minutos. Después de la conjugación, el péptido conjugado deseado se recupera y purifica mediante métodos de separación convencional tal como CLAP rp.

Composición

Un compuesto pegilado de la invención puede ser incorporado en composiciones farmacéuticas aceptables para administración a un sujeto, particularmente a un humano. Un compuesto pegilado de la invención se puede administrar solo o en combinación con un portador, diluyente, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Específicamente un compuesto pegilado de la invención se puede administrar en un vehículo de 20 mM de NaH_2PO_4 en 0.9% de NaCl, 3 mg/ml de manitol, pH 5. Las composiciones para la administración se diseñan para ser apropiadas para el modo seleccionado de administración, y diluentes, portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de dispersión, soluciones amortiguadoras, agentes tensoactivos, conservadores, agentes

77

de solubilización, agentes de isotonicidad, agentes de estabilización y lo similar se usa como apropiado. Las composiciones se designan de acuerdo con técnicas convencionales como en, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, el cual proporciona un compendio de técnicas de formulación como generalmente se conocen para profesionales.

Una composición que comprende un compuesto pegilado de la invención se puede administrar a un sujeto en riesgo para o que exhibe patologías como se describen en la presente, al usar técnicas de administración estándar que incluyen administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdermal, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o de supositorio.

La ruta de administración de un compuesto pegilado de la invención puede ser parenteral, oral, o por inhalación o administración transdermal. Preferiblemente, los compuestos pegilados de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica apropiada para administración parenteral. El término parenteral como se usa en la presente incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal, o intraperitoneal. Es preferida la administración sistémica periférica por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea.

78

Un compuesto pegilado de la invención puede ser administrado como un aerosol para propósitos terapéuticos, los cuales se administran con aplicadores de inhalación y los cuales contienen un compuesto de la presente invención. Los aerosoles y métodos para la síntesis de los mismos se describen en la técnica.

Un compuesto pegilado de la invención se puede administrar regularmente, por ejemplo, una vez al día o una vez a la semana. Alternativamente, un compuesto pegilado de la invención se puede administrar, por ejemplo, dos veces a la semana, o tres veces a la semana. Alternativamente, los compuestos de la invención se pueden administrar cíclicamente (por ejemplo, regularmente por un período de días o semanas después de un período sin administración). Preferiblemente un compuesto pegilado de la invención se administra una vez a la semana por un período en el rango de 3 meses a 3 años.

La composición comúnmente debe ser estéril y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento en el recipiente proporcionado, que incluye, por ejemplo, un frasco o jeringa sellada. Por lo tanto, las composiciones pueden ser estériles filtradas después de producir la formulación, o de otra manera hechas microbiológicamente aceptables. Para administración parenteral un rango de dosis común para un compuesto de la invención es alrededor de 1 μ g por semana hasta alrededor de 10 mg por semana. Preferiblemente la dosis

humana está en el rango de 5 µg por semana hasta alrededor de 1000 µg por semana. Más preferiblemente una dosis en el rango de 10 µg por semana hasta 1000 µg por semana que incluye la administración de 10 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg, 40 µg, 45 µg, 50 µg, 55 µg, 60 µg, 65 µg, 70 µg, 75 µg, 80 µg, 85 µg, 90 µg, 95 µg, ó 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 500 µg, 750 µg, ó 1000 µg una vez por semana. Aunque estos rangos de dosis se establecen en unidades por semana, se contempla que otros intervalos de tiempo se pueden usar.

10 Estas cantidades sugeridas de un compuesto se someten a una gran cantidad de discreción terapéutica. El factor clave en la selección de una dosis apropiada y la programación es el resultado clínico obtenido. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del compuesto, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por profesionales médicos.

20 Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar para almacenamiento y ser reconstituidos en un portador estéril apropiado antes de uso. La liofilización y reconstitución puede llevar a grados de variación de compuestos de pérdida de actividad. Las dosis

pueden haber sido ajustadas para compensar. Generalmente, el pH de la preparación entre 4 y 8 se prefiere.

Un compuesto de la invención se puede administrar solo o en combinación con otros agentes, por ejemplo, agentes anti-resorción de hueso, que incluyen calcitonina, bisfosfonatos, SERM (por ejemplo, raloxifen), terapia de reemplazo de hormona (HRT), calcio, Vitamina D1, Vitamina D2, Vitamina D3, Vitamina D4 y estrógeno. Un compuesto de la invención puede ser coadministrado con otro agente. Alternativamente, un compuesto de la invención puede ser administrado secuencialmente con otro agente; por ejemplo, un compuesto de la invención se administra solo por un período de una semana hasta un año después de administración del otro agente, ya sea junto con el compuesto o en la ausencia del compuesto.

15

Artículos de Fabricación.

En otra modalidad de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento o prevención de las enfermedades o condiciones descritas anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes apropiados incluyen, por ejemplo, botes, frascos, jeringas, plumas, inhaladores, parches y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como cristal, metal o plástico. El recipiente contiene una

25

composición de la invención la cual es efectiva para la
prevención o tratamiento de las enfermedades o condiciones y
puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el
recipiente puede ser una bolsa o un frasco de solución
5 intravenosa que tiene un tapón que se perfora por una aguja
de inyección hipodérmica). El agente activo en el recipiente
es una composición de la invención. La etiqueta encima, o
asociada con el recipiente indica que la composición se usa
para tratamiento de la condición de selección. El artículo de
10 fabricación además puede comprender un segundo recipiente que
comprende una solución amortiguadora farmacéuticamente
aceptable, tal como una solución amortiguadora salina de
fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además se
pueden incluir otros materiales deseables para un punto de
15 vista comercial y del usuario, que incluye otras soluciones
amortiguadoras, diluentes, filtros, agujas, jeringas, e
insertos de empaque con instrucciones para uso.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para propósitos
ilustrativos solamente, y no se proyectan para limitar el
20 alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Síntesis de Péptidos

La síntesis de péptido se realiza en resina de
poliestireno de amida de Rapp AM RAM Fmoc (Rapp Polymere
25 Tubingen, Alemania) (sustitución de 0.6 a 0.7 mmol/g). La

síntesis se realiza usando la estrategia del grupo de protección de cadena principal de Fmoc. Además, cualquier cadena lateral de aminoácido que es aromático, ácido, básico o altamente polar probablemente es reactiva. Estas también
5 deben estar protegidas para prevenir cadenas ramificadas indeseadas para formación. Existen cuatro grupos principales usados en esta forma: tBoc (un butiloxycarbonilo terciario) para Lys y Trp; Pbf (un grupo 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonyl) para Arg; tBu (un
10 grupo de butilo terciario) para Ser, Asp, and Glu; Trt (un grupo de trifenilmetilo) para Gln, His, y Asn). Los derivados de cadena lateral de aminoácido usados son: Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(OtBu), Trp(Boc). El acoplamiento se
15 lleva a cabo con aproximadamente 10 equivalentes de aminoácido activado con diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (relación molar 1:1:1) en dimetilformamida (DMF). El grupo de protección Fmoc del aminoácido en la posición 1 se deja en un lugar para permitir
20 la conjugación selectiva de una cadena lateral de Lisina (ver ejemplo 2 a continuación).

El desdoblamiento concomitante para la remoción de la resina y el grupo de protección de cadena lateral se lleva a cabo en una solución que contienen ácido trifluoroacético:
25 triisopropilsilano: metanol: anisol 90:5:2.5:2.5 por 1.5 a 2

horas a temperatura ambiente. El desdoblamiento del péptido de la resina de amida Rink genera la carboxamida de Terminal C a partir del péptido. Los péptidos se precipitan con éter de dietilo, se vuelven a disolver en 30-40 mL de acetonitrilo al 10% y se purifican en una columna de CLAP de fase inversa C₁₀ a una velocidad de flujo de 12-15 mL/min con un gradiente AB lineal donde A = 0.05% TFA/agua y B = 0.05% de TFA/acetonitrilo. La columna usada es ya sea una Waters Symmetry Prep 7 μ m, 19 x 300 mm o una Kromasil 10 μ m, 22 x 250 mm. La pureza y el peso molecular del péptido se confirman en un sistema de CL-EM Agilent 1100 Serie con un detector de EM cuádruple sencillo. La separación de CLAP analítica se hace en una columna Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 micras, 4.6 mm i.d. x 15 cm con un gradiente AB lineal de 10 hasta 100 % B durante 15 minutos en los cuales A = 0.05 % TFA/H₂O y B = 0.05% TFA en 60:40 CH₃CN:H₂O y la velocidad de flujo es 1 mL/min. Todos los péptidos se purifican hasta > 95 % de pureza y se confirman para tener el peso molecular que corresponde al valor calculado dentro de 1 amu.

20

Ejemplo 2: Conjugación de Péptidos

El péptido no conjugado con un grupo Fmoc de Terminal N en el lugar se disuelve en 1 mL de agua/acetonitrilo 50/50 (36.8 mg, 4272.9 g/mol, 0.0086 mmol). Un exceso molar de 1.5 hasta 2 múltiplos de éster de NHS mPEG-2kDa (NOF Sunbright

ME-020AS) se pesan fuera (39.7 mg, PM promedio 2280, 0.017 mmol). La solución de péptido se diluye con 2 mL de 40 mM de borato de sodio, solución amortiguadora pH 9.8 y 2 ml de acetonitrilo y luego se agregan a la solución mPEG. La mezcla de reacción se monitorea por CLAP de fase inversa analítica (método como se describe en Ejemplo 1), y comúnmente después de 20 a 30 minutos de tiempo de reacción, muestra desaparición completa del pico de péptido (en alrededor de 14.5 minutos) y emergencia de un pico debido al conjugado de PEG de péptido (en alrededor de 15.7 minutos). La mezcla se enfría sobre hielo seco, y se agregan 2 mL de piperidina para remover el grupo Fmoc de Terminal N. La mezcla se agita a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se enfría en hielo seco y se neutraliza con 2 mL de ácido acético glacial (aproximadamente pH final = 6-7). De la CLAP analítica ahora debería haber un pico en alrededor de 13.2 minutos debido al aducto de fluoreno de piperidina y un pico en alrededor de 14.25 minutos debido al conjugado de mPEG de péptido desprotegido. La mezcla se diluye hasta alrededor de 40 mL con agua y se purifica en cualquiera de un Waters SymmetryPrep 7 μ m, 19 x 300 mm o un Kromasil 10 μ m, 22 x 250 mm a 12 mL/min con un gradiente de AB lineal de 2 etapas de 0 a 30% B durante 20 minutos seguido por 30 hasta 80% B durante 100 minutos donde A = 0.05% TFA/agua y B = 0.05% TFA/acetonitrilo.

Las fracciones combinadas que contienen el producto son liofilizadas para obtener la forma de sal de trifluoroacetato del péptido. El producto subsiguientemente se puede convertir en otra forma de sal deseada por los procedimientos conocidos en la técnica. El péptido purificado se cuantifica por absorbanza de UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar calculado con base en la secuencia del péptido. EL PM promedio del conjugado es (PM promedio de PEG-NHS + PM de Fmoc-Péptido - PM de Fmoc - PM de NHS) = 2280 + 4273 - 115 - 222 = 6216. Para el ejemplo en el cual se usa 36.8 mg de un péptido desconocido, se puede obtener 34.8 mg del péptido pegilado. La conjugación de otros péptidos descritos en esta invención, en la cual el éster mPEG-NHS se usa, se realiza esencialmente como se describe anteriormente.

Todos los datos en los Ejemplos a continuación usan compuestos de la invención que son péptidos de amida de Terminal C que son conjugados de mPEG en el residuo de Lys de posición 26 de la estructura del péptido de la invención y son sales de trifluoroacetato (ver, por ejemplo, SEQ ID Nos: 1-5).

Ejemplo 3: Ensayo In Vitro de Inducción de cAMP

Las células de osteosarcoma SaOS-2 se vuelven a suspender en 5×10^5 células/mL en solución amortiguadora de estimulación [1 M HEPES/10% BSA/250 μ M IBMX (3-isobutil-1-

metilxantina, MP Biomedicals)/HBSS]. 20 μ L/pozo de suspensión de células se agrega por pozo de una placa de ensayo de área media oscura de 96 pozos (Costar) para producir 1×10^4 células/pozo. Luego los 20 μ L de compuesto de prueba diluida
5 (por ejemplo, PTH análogo de la invención, $n = 2$) se agrega inmediatamente a las células. Los compuestos de prueba se preparan como diluciones de log $\frac{1}{2}$ y se evalúan a través un rango de titulación de 3 μ M a 0.1 mM. Las placas se incuban por una hora a temperatura ambiente. Una placa de ensayo de
10 96 pozos separada también se prepara para contener cAMP como una curva estándar. El estándar de cAMP se prepara como diluciones de log $\frac{1}{2}$ en solución amortiguadora sustituta a través de un rango de titulación de 400 a 0.0012 pmoles/pozo (40 μ L/pozo) ($n = 6$). Después de una hora del paso de
15 incubación, el cAMP se ensaya usando el kit cAMP dinámico 2 HTRF® (fluorescencia resulta de tiempo homogéneo) (Cisbio) de acuerdo con las direcciones del fabricante.

Cuando los siguientes compuestos se evalúan esencialmente como se describe a continuación, se encuentran
20 para inducir la producción de cAMP como se tabula a continuación. Estos datos demuestran que estos compuestos tienen la capacidad potente para activar al receptor PTH (PTHR1) de una manera no diferente a PTH.

87

5

Tabla 1

10

Compuestos	EC50 Promedio (nM) (n=2)
SEQ ID NO: 1 con 2kD mPEG	7.7
SEQ ID NO: 2 con 2kD mPEG	2.1
SEQ ID NO: 4 con 2kD mPEG	6.9
SEQ ID NO: 5 con 2kD mPEG	2.6

Ejemplo 4: Evaluación In Vivo de Compuestos Conjugados.**A. Ratas Ovarioectomizadas Osteopénicas Adultas Jóvenes.**

15 Las ratas Sprague-Dawley hembras de aproximadamente 3 meses de edad fueron ovariectomizadas, excepto para controles simulados, y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a 22°C con acceso ad lib al alimento (TD 89222 con 0.5% Ca y 0.4%P, Teklad, Madison, WI)

20 y agua. Las ratas ovariectomizadas (Ovx) se dejan para pérdida de hueso por 25 días, y luego se pesan y sortean en grupos de tratamiento. El tratamiento es mediante inyección subcutánea de un compuesto de la invención en varias dosis (como se indica en la Tabla 2 a continuación) por 1 mes en un

25 vehículo de 20 mM de NaH_2PO_4 en 0.9% NaCl, 3 mg/ml manitol, pH

78

5. Las ratas se inyectan con los compuestos cada tercero o cuarto día para administración aproximada de una vez por semana a un humano. Los controles del grupo de referencia y Ovx se tratan con el vehículo solamente ("control de vehículo del grupo de referencia" y "control de vehículo ovx"). Los sueros se recolectan mediante piquete cardíaco aproximadamente 24 horas después de la inyección final bajo anestesia de isofluorano en necropsia (aproximadamente 24 horas después de la inyección final), y se analiza usando un analizador de química clínico (Hitachi 917, Tokyo, Japan).

En necropsia, los fémures izquierdos se remueven, se limpia de tejido suave y se almacena en 50% de etanol/solución salina a 4°C. A temperatura ambiente, los fémures en 50% de etanol/solución salina se envuelve en Parafilm y se centra con respecto a la señal de tomografía de computación cuantitativa (QCT) (Research M, Stratec). Un escaneo de reconocimiento coronal de la metafisis de fémur distal se genera primero en 2D antes del análisis de 3D. Los parámetros de QCT se miden incluyendo densidad mineral ósea (BMD, mg/ml de hidroxil apatita) contenido mineral óseo (BMC, mg de hidroxil apatita), y área seccional de cruce (mm²) como se describió previamente (Sato, y colaboradores, JPET, 272:1252-1259, 1995).

La hipercalcemia se define en la presente como el valor de calcio de suero percentil superior a 97.5% de controles de

vehículo ovariectomizados normales para el tipo de animal usado, que usa datos de química clínica y suero recolectado de perforación cardiaca (International Federation of Clinical Chemistry, HE Solberg in Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th edition, Burtis CA and Ashwood ER, editors, 5 2001, pp 251-261). El valor que refleja el 97.5 del percentil es 11.2 mg de calcio por dL de suero de control de vehículo ovx. La "Dosis de hipercalcemia", esto es, la dosis en la cual se observa hipercalcemia 24 horas después de inyección del compuesto de prueba que usa datos químicos 10 clínicos y sueros recolectados de perforación cardiaca, se determina por interpolación, usando análisis de regresión para fijar la respuesta de dosis calcémica 24 horas después de administración del compuesto a las ratas 15 ovariectomizadas.

La ovariectomía reduce significativamente el BMD en ratas relativo a controles de vehículo simulados en un período de 7.5 semanas (fase de pretratamiento de 3.5 semanas más fase de tratamiento de 4 semanas) (Sato y colaboradores, 20 *J. Med. Chem.* 42:1-24, 1999). Los compuestos pegilados de la invención son capaces de restaurar el BMD de regreso a niveles de control de vehículo simulado mediante la terminación de la fase de tratamiento de 4 semanas. Para los compuestos pegilados preferidos de la invención, evaluados 25 dentro de los parámetros de este ensayo, la dosis requerida

para almacenar BMD a niveles de control de vehículo simulado ("Dosis BMD") no es mayor que la Dosis Hipercalcémica. Cuando se evalúa esencialmente como se describe anteriormente, los compuestos listados en la Tabla 2 a continuación son capaces de restaurar el BMD de las ratas Ovx a nivel de control de vehículo simulado después de cuatro semanas de tratamiento con una cierta dosis; pero, una dosis similar o mayor del compuesto se necesita para inducir la Dosis Hipercalcémica. Los factores que afectan la relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis BMD incluyen, pero pueden no estar limitados a, la secuencia de aminoácido de la estructura de péptido y la posición del aminoácido en el cual el PEG se acopla. Los compuestos preferidos de la invención se evalúan dentro de los parámetros de este ensayo tiene una relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis BMD igual o mayor que alrededor de 1.0 como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Compuesto	Dosis* BMD (nmole/kg) (µg/kg)	Dosis [†] Hipercalcémica (nmole/kg) (µg/kg)	Dosis Hipercalcémica /Dosis BMD
SEQ ID NO: 1 con 5kD mPEG	3.7 34.3	>32.5** >300	>8.8
SEQ ID NO: 2 con	6.7	>34	>5.1

91

5kD mPEG	59.8	>300	
SEQ ID NO: 4 con	31.8	>32	>1.00
5kD mPEG	297.9	>300	
SEQ ID NO: 5 con	4.4	>32.2	>7.3
5kD mPEG	41.0	>300	

* dosis para restaurar BMD al nivel de control del grupo de referencia dentro de los parámetros de ensayo (como se establece para una regresión lineal y se determina por interpolación)

5 + dosis a la cual la hipercalcemia se observa 24 horas después de administración del compuesto de prueba dentro de los parámetros de ensayo (como se establece para una regresión lineal y se determina por interpolación)

10 ** ">" indica que la dosis establecida fue la dosis más grande evaluada y que la hipercalcemia, como se define en la presente, no se logró en esa dosis.

B. Ratas Ovarioectomizadas Osteopénicas Grandes.

15 En este ejemplo, se determina la capacidad de los compuestos pegilados de la invención para incrementar la resistencia ósea biomecánica, BMD y BMC de ratas Ovx a niveles de control de vehículo simulado. Un efecto del compuesto en la resistencia biomecánica ósea se espera que sea un mejor pronóstico de eficacia clínica que BMD. El BMD
20 vertebral marginalmente predice la eficacia clínica de

R

terapias de osteoporosis para reducir la incidencia de fracturas vertebrales (Cummings, y colaboradores, *Am. Journal of Medicine*, 112:281-289, 2002; Sarkar y colaboradores, *J. Bone & Mineral Research* 17:1-20, 2002). Debido a que el PTH(1-34) reduce el riesgo de ambas fracturas vertebrales y no vertebrales (Neer y colaboradores, *NEJM*, 344:1434-1441, 2001), la eficacia de compuestos de la invención se analizan para demostrar si incrementan la resistencia biomecánica ósea en la vértebra lumbar y en dos sitios no vertebrales, esto es, en el medio eje femoral y el cuello femoral.

Las ratas Sprague-Dawley hembras de alrededor de 6 meses de edad son ovariectomizadas, excepto para controles del grupo de referencia, y se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a 22°C con acceso ad lib a alimento (TD 89222 con 0.5% Ca y 0.4%P, Teklad, Madison, WI) y agua. Las ratas ovariectomizadas (Ovx) se dejan para pérdida ósea por un mes antes de tratamiento con compuestos de la invención por dos meses adicionales. EL compuesto a ser evaluado se administra subcutáneamente en varias dosis (como se indica en la Tabla 3 a continuación) en un vehículo de 20 mM NaH_2PO_4 en 0.9% NaCl, 3 mg/ml manitol, pH 5, cada 6 ó 7 días durante dos meses. Los controles del grupo de referencia y Oxv se tratan con el vehículo solamente ("control de vehículo simulado" y "control de vehículo ovx"). Los sueros se recolectan luego por perforación cardíaca bajo anestesia

de isofluorano en necropsia, y se analizan usando un
analizador químico clínico. La vértebra lumbar L4-6 y los
fémures izquierdos se remueven, se lavan de tejido suave y se
depositan en 50% de etanol/solución salina a 4°C. A
5 temperatura ambiente, L-5 en 50% de EtOH/solución salina se
envuelve en Parafilm y se centra con respecto a la señal de
QCT (Research M, Stratec). Un escaneo de reconocimiento
coronal de la vértebra L-5 se genera primero en 2D antes de
análisis de 3D. Los parámetros de QCT se miden incluyendo BMD
10 (mg/cc, BMC (mg), y área de sección transversal (mm²). La
vértebra lumbar L-5, medio eje femoral, y el fémur proximal
se preparan luego para evaluación biomecánica. La resistencia
(N) se evalúa mediante carga de la especie para lesión como
se describe previamente (Sato, y colaboradores,
15 *Endocrinology*, 10:4330-4337, 1997).

Los compuestos pegilados de la invención se evalúan en
este ensayo relativo a un control positivo de 3-5 µg/kg/d
PTH(1-38). Los PTH(1-34) y PTH(1-38) se encuentran que son
indistintos en términos de eficacia esquelética o efectos
20 calcémicos en ratas ovariectomizadas osteopénicas. Se ha
demostrado previamente que las ratas administradas con 5
µg/kg/d (1 nmol/kg/d) de PTH(1-34) tienen una exposición
sistémica que es alrededor de 3 veces aquella de PTH(1-34)
(esto es, FORTEO™) en humanos (Tashjian and Chabner, *J. Bone*
25 *Miner Res*, 17:1151-1161, 2002; Tashjian and Gagel, *J. Bone*

Miner Res, 21:354-365, 2006). El PTH(1-34) 5 µg/kg/d también ha sido mostrado previamente para restaurar MBD vertebral de Ovx para niveles de control de vehículo del grupo de referencia en la el modelo de rata ovariectomizada osteopénica de edad (Kishi y colaboradores, *Bone* 22:515-522, 1998; Kimmel y colaboradores, *Endocrinology* 132:1577-1584, 1993). Esto se confirma para PTH(1-38) en este modelo con una dosificación de 3-5 µg/kg/d.

La ovariectomía reduce significativamente BMD, BMC y la resistencia ósea relativa a controles de vehículo del grupo de referencia durante un período de tres meses en ratas de edad. Los compuestos en la Tabla 3 a continuación, cuando se evaluaron esencialmente como se describió anteriormente, restauran el BMC de las ratas Ovx a niveles de control de vehículo del grupo de referencia cuando se tratan por ocho semanas con la dosis listada en la Tabla 3, cuando se evalúan esencialmente como se describe anteriormente, restauran resistencia biomecánica ósea de las ratas Ovx a niveles de control de vehículo del grupo de referencia en uno, dos o tres de las ubicaciones vertebral, de medio eje y cuello femoral evaluadas.

Para ciertos compuestos preferidos de la invención, evaluados dentro de los parámetros de este ensayo, la hipercalcemia no se observa hasta la dosis máxima evaluada de aproximadamente 110 nmol/kg. Los compuestos preferidos de la

95

invención, evaluados dentro de los parámetros de este ensayo, están disponibles para restaurar el BMD y BMC para niveles de control de vehículo del grupo de referencia mientras que también tiene una relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis de BMD igual o mayor que alrededor de 1.0, 2.0, 3.0 ó 4.0, o aún más preferiblemente, mayor que alrededor de 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 o mayor. Los compuestos preferidos de la invención, evaluados dentro de los parámetros de este ensayo, son capaces de restaurar BMD y BMC a niveles de control de vehículo del grupo de referencia mientras que también restaura la resistencia biomecánica ósea en uno, dos o tres de las ubicaciones: vertebral, de medio eje y cuello femoral a niveles de control de vehículo del grupo de referencia. Aún más preferiblemente, los compuestos de la invención, evaluados dentro de los parámetros de este ensayo, son capaces de restaurar BMC y tensión biomecánica ósea en una o más de ubicaciones vertebrales, de medio eje y cuello femoral a niveles de control de vehículo del grupo de referencia mientras que también tiene una relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis de BMD igual o mayor que alrededor de 1.0, 2.0, 3.0 ó 4.0, o aún más preferiblemente, igual o mayor que alrededor de 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 o mayor.

El compuesto con SEQ ID NO: 4 con 2kD mPEG (PM Prom.) logra resistencia de nivel de control de vehículo del grupo de referencia a una dosis de 11 nmol/kg para sitios

vertebrales, de medio eje y cuello femoral, en la ausencia de hipercalcemia en la dosis más alta evaluada. Por lo tanto, este compuesto tiene relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis de Resistencia Biomecánica de >10 para los tres sitios.

5 Similarmente, SEQ ID NO: 1 con 2kD mPEG restaura la resistencia vertebral y de cuello femoral a niveles de control de vehículo del grupo de referencia en una dosis de 11 nmol/kg, en la ausencia de hipercalcemia en la dosis más alta evaluada, y por lo tanto tiene una relación de Dosis

10 Hipercalcémica/Dosis de Resistencia Biomecánica de >10 para estos dos sitios. Estos datos indican que la secuencia de la estructura del péptido de un compuesto de la invención además del tamaño del conjugado⁹ mPEG a la estructura del péptido del compuesto contribuye a eficacia esquelética (como se

15 refleja por BMD, BMC y mediciones de resistencia) del compuesto.

20

25

5

Tabla 3

10

15

20

Compuesto	Dosis ⁺ de hiper calcemi a (nmol/k g)	Dosis ⁺⁺ de BMD Vertebr al (nmol/k g)	Dosis ⁺ de BMC Vertebr al (nmol/k g)	Dosis ⁺⁺ de Resiste ncia Vertebr al (nmol/k g)	Dosis ⁺ de Resiste ncia de medio eje (nmol/k g)	Dosis ⁺⁺ de Resiste ncia de cuello Femoral (nmol/k g)
SEQ ID NO: 1 con 5kD mPEG	>107	>108	32	108	108	11
SEQ ID NO: 2 con 5kD mPEG	>112	112	34	32	108	32
SEQ ID NO: 4 con 5kD mPEG	>110	>107	32	107	32	32
SEQ ID NO: 5 con 5kD mPEG	>110	11	11	107	32	107
SEQ ID NO: 1 con 2kD mPEG	>110	110	32	11	32	11
SEQ ID NO: 2 con 2kD mPEG	>117	34	34	>117	117	34
SEQ ID NO: 4 con 2kD mPEG	>110	11	11	11	11	11
SEQ ID NO: 3 con 2kD mPEG	97	>110	11	>110	11	11

- + Dosis en la cual la hipercalcemia se observa en sueros de 24 horas después de administración del compuesto de prueba dentro de los parámetros de ensayo (como establece una regresión lineal y se determina por interpolación). ">"
- 5 indica que la dosis establecida es la dosis más alta evaluada y que la hipercalcemia, como se define en la presente, no se logra en esa dosis.
- ++ Dosis a la cual el nivel del grupo de referencia de densidad mineral ósea vertebral (BMD) se logra dentro de los
- 10 parámetros de ensayo.
- + Dosis a la cual el nivel del grupo de referencia de contenido mineral óseo vertebral (BMC) se logra dentro de los parámetros de ensayo.
- ** Dosis a la cual la resistencia vertebral comparable con
- 15 del grupo de referencia y el control positivo (3-5 $\mu\text{g/kg/d}$ PTH(1-38)) se logra (dentro de controles de ensayo)
- ^ Dosis a la cual la resistencia de medio eje comparable con el control de vehículo del grupo de referencia y el control positivo de (3-5 $\mu\text{g/kg/d}$ PTH(1-38)) se logra
- 20 ^^ Dosis a la cual la resistencia de cuello femoral comparable con el control de vehículo del grupo de referencia y el control positivo de 3-5 $\mu\text{g/kg/d}$ PTH(1-34) se logra.

La Tabla 4 a continuación establece relaciones de

25 interés las cuales se derivan de los valores en la Tabla 3.

Los compuestos preferidos de la invención tienen una relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis BMD Vertebral que se logra dentro de los parámetros del ensayo de alrededor de 1.0 o mayor, más preferiblemente igual o mayor que 3, 5, 6, 7, 8, 9
5 ó 10. Los compuestos preferidos de la invención tienen una relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis BMD Vertebral lograda dentro de los parámetros del ensayo de alrededor de 3.0 o mayor, más preferiblemente mayor que 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Los compuestos preferidos de la invención tienen una relación de
10 Dosis Hipercalcémica/Dosis de Resistencia Vertebral lograda dentro de los parámetros del ensayo de alrededor de 1.0 o mayor. Los compuestos preferidos de la invención tienen una relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis de Resistencia de Medio Eje lograda dentro de los parámetros del ensayo de
15 alrededor de 1.0 o mayor, más preferiblemente mayor que 3, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Los compuestos preferidos de la invención tienen una relación de Dosis Hipercalcémica/Dosis de Resistencia de Cuello Femoral, lograda dentro de los parámetros del ensayo de alrededor de 3.0 o mayor, más
20 preferiblemente alrededor de 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o mayor.

5

Tabla 4

10

15

20

25

Compuesto	Dosis Hipercal-cémica/ Dosis BMD Vertebral	Dosis Hipercal-cémica/ Dosis BMC Vertebral	Dosis Hipercal-cémica/ Dosis de Resistencia Vertebra 1	Dosis Hipercal-cémica/ Dosis de Resistencia de Medio Eje	Dosis Hipercal-cémica/ Dosis de Resistencia de Cuello Femoral
SEQ ID NO: 1 con 5kD mPEG	>1.0	>3.34	>1.0	>1.0	>9.7
SEQ ID NO: 2 con 5kD mPEG	>1.0	>3.14	>3.34	>1.0	>3.34
SEQ ID NO: 4 con 5kD mPEG	>1.02	>3.43	>1.02	>3.43	>3.43
SEQ ID NO: 5 con 5kD mPEG	>10.0	>10.0	>1.02	>3.43	>10.0
SEQ ID NO: 1 con 2kD mPEG	>1.0	>3.43	>10.0	>3.43	>10.0
SEQ ID NO: 2 con 2kD mPEG	>3.4	>3.4	1	>1	>3.4
SEQ ID NO: 4 con 2kD mPEG	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
SEQ ID NO: 3 con 2kD mPEG	<0.9	8.8	<0.9	8.8	8.8

Ejemplo 5:

Un compuesto de la invención con SEQ ID NO: 1, en donde
5 el mPEG al cual se conjuga es un 2kD mPEG, se compara
directamente con un compuesto de la invención con SEQ ID NO:
1, en donde el mPEG al cual se conjuga es un 5kD mPEG. Las
ratas ovariectomizadas osteopénicas de edad se dejan que
pierdan hueso por un mes antes de la dosificación (nmol/kg
10 como en la Tabla 5 y 6) cada 6 días con vehículo solo, o el
compuesto SEQ ID NO: 1 pegilado 2kD o el compuesto SEQ ID NO:
1 pegilado 5kD por 8 semanas. La Tabla 5 exhibe los valores
de calcio en suero promedio (mg/dL) 24 horas después de
dosificación. La Tabla 6 exhibe el BMD promedio (mg/cc).

15 Los animales dosificados con cualquier compuesto tienen
niveles de calcio en suero normal 24 horas después de
dosificación. Sin embargo, el compuesto con el 2kD mPEG tiene
menos efecto en calcio en suero mientras que exhibe mejor
eficacia esquelética de BMD en dosis baja, media y alta que la
20 dosis del compuesto con el 5kD mPEG. Estos datos demuestran
que el compuesto pegilado 2kD es similar al compuesto
pegilado 5kD en eficacia esquelética mientras que tiene
efectos de calcio en suero menores.

102

5

Tabla 5. Calcio en Suero (mg/dL)

Dosis (nmol/kg)	Del grupo de referencia	Ovx	PEG 2kD	PEG 5kD
0	10.69	10.68		
11			10.45	10.86
32			10.38	10.79
108				11.03
110			10.25	

10

Tabla 6. BMD Vertebral (mg/cc)

Dosis (nmol/kg)	Del grupo de referencia	Ovx	PEG 2kD	PEG 5kD
10.3	625	544		
11			590	567
32			603	589
108				612
110			623	

15

20

Ejemplo 6 PTH(1-34) en ratas Ovarioectomizadas Osteopénicas de Edad.

Ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas de seis meses de edad se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad de 12 hr a 22°C con acceso ad lib a alimento (TD 89222 con 0.5% Ca y 0.4%P, Teklad, Madison, WI) y agua. Las ratas

25

ovarioectomizadas se dejan para pérdida de hueso por 1 mes, antes de tratamiento con rhPTH (1-34) por los siguientes 3 meses. Las ratas ovarioectomizadas osteopénicas de edad se inyectan subcutáneamente, semanalmente, con 0, 10 ó 30 µg/kg de PTH(1-34) humano por 12 semanas. Los controles del grupo de referencia y ovx se inyectan con el vehículo solamente. La vértebra lumbar se extirpa en necropsia y se analiza mediante micro-CT (Stratec), y luego se prepara para evaluación biomecánica. La resistencia en Newtons, (N), se evalúa mediante cargar la especie de vértebra para lesión. La significancia con respecto a los controles del vehículo ovx se indica por * en la Tabla 7 a continuación (Fishers PLSD, $P < 0.05$). Los datos del modelo se proporcionan en la Tabla 7 a continuación.

Relativo a los controles de vehículo Ovx, el PTH(1-34) hasta 30 µg/kg (7 nmol/kg) no tiene efecto significativo en la BMD vertebral o la resistencia biomecánica vertebral en ratas ovarioectomizadas osteopénicas después de 12 semanas de tratamiento. El calcio en suero es normal cuando se mide aproximadamente 24 horas después de la última dosis. En comparación con los datos mostrados en la presente anteriormente, los compuestos de la invención tienen BMD vertebral superior y resistencia vertebral biomecánica relativa al PTH(1-34) semanal.

104

5 **Tabla 7:** Eficacia Esqueletal de Dosificación Semanal de PTH(1-34).

10	BMD VERTEBRAL:		
	Grupo	Dosis (µg/kg)	BMD Promedio mg/mL
	Del grupo de referencia	0	605*
	Ovx	0	512
	PTH(1-34)	10	534
15	PTH(1-34)	30	529
	RESISTENCIA VERTEBRAL:		
	Grupo	Dosis (ug/kg)	Carga Promedio para lesión (N)
	Del grupo de referencia	0	277*
	Ovx	0	210
	PTH(1-34)	10	222
	PTH(1-34)	30	243

Ejemplo 7 Internalización de Receptor de PTH.

20 La cinética de internalización de PTHR1 (Receptor de PTH 1) para compuestos de la invención se determina después de enlazamiento del ligando a receptores de membrana. Las células HEK 293 son transfectadas con plásmido PTHR-emGFP (Invitrogen).

100

Las células se siembran a 7,000 células/pozo, 100 μ L/pozo en placa de 96 pozos negra de fondo claro recubierta con poli-D lisina. 24 horas después de ser sembrada en la placa de 96 pozos, las células se dosifican con 10 μ L de un compuesto para ser evaluado, en concentraciones finales de 100 nM en momentos escalonados de 0 minutos hasta 3 horas. El medio se aspira en el punto final de dosificación. Las células se fijan con 100 μ L de (Anatech, Battle Creek, MI) por 30 minutos. Se prefiere aspirar las células, y las células se lavan tres veces con 100 μ L de colorante nuclear de Hoechst diluido (diluido en 1XPBS) por 30 minutos. El colorante de Hoechst se aspira y reemplaza con 1XPBS. Las placas se almacenan en la luz a 4°C hasta escaneo. Las células se escanean dentro de 48 horas usando un Cellomics® ArrayScan.

Los datos representativos para varios momentos, se establecen como por ciento de control solamente de vehículo (línea base = 100%), se presentan en la Tabla 8.

20

25

105

Tabla 8

Compuesto*	20 min	40 min	60 min	180 min
PTH(1-38)	166	177	224	175
SEQ ID NO:4 pero no pegilado y lisina en el aminoácido 26	136	132	136	151
SEQ ID NO:4 con 2kD mPEG	154	167	186	163
SEQ ID NO:4 con 5kD mPEG	106	96	98	107
SEQ ID NO:2 pero no pegilado y lisina en el aminoácido 26	126	114	139	139
SEQ ID NO:2 con 2kD mPEG	148	102	107	96
SEQ ID NO:2 con 5kD mPEG	128	95	108	102
SEQ ID NO:1 pero no pegilado y lisina en el aminoácido 26	106	126	113	142
SEQ ID NO:1 con 2kD mPEG	160	120	104	102
SEQ ID NO:1 con 5kD mPEG	127	93	91	92

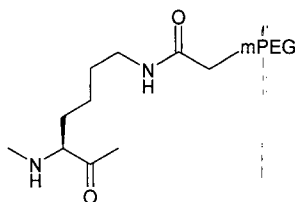
Estos datos muestran que los compuestos de la invención tienen cinética de internalización marcadamente diferente que PTH(1-38), dependiendo de la secuencia de la estructura de péptido, si está o no pegilada, y el tamaño de PEG. Nótese que las moléculas no pegiladas tienen la estructura de la Secuencia nombrada con la excepción de que existe un residuo de lisina en la posición 26. La cinética de internalización más lenta indica un grado reducido de internalización del receptor PTHR1 cuando los complejos del receptor PTHR1 de ligando se forman usando compuestos de la invención, que resultan en una magnitud mayor de señalización en la célula después de enlazamiento de ligando. Esto es probablemente

parte de la explicación para la eficacia esquelética mejorada observada para formas de compuestos de la invención con 2kD PEG con dosificación semanal sobre aquella observada con dosificación de PTH semanal.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con la secuencia de:

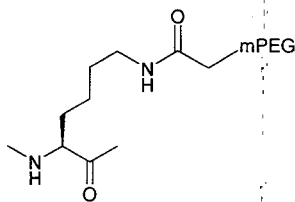
Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa₈ His Asn Leu Gly Arg His Leu
5 Ala Ser Xaa₁₈ Glu Arg



Val Glu Trp Leu Arg Leu Leu Gln Asp Val His
10 Asn Phe - NH₂ (SEQ ID NO: 6);
caracterizado porque Xaa₈ y Xaa₁₈ son Met o Xaa₈ y Xaa₁₈ son
Nle; y en donde mPEG es monometoxi polietilenglicol con un
peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones; o
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 2. El compuesto de la reivindicación 1 caracterizado
porque tiene la secuencia de aminoácidos:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu
Ala Ser Met Glu Arg



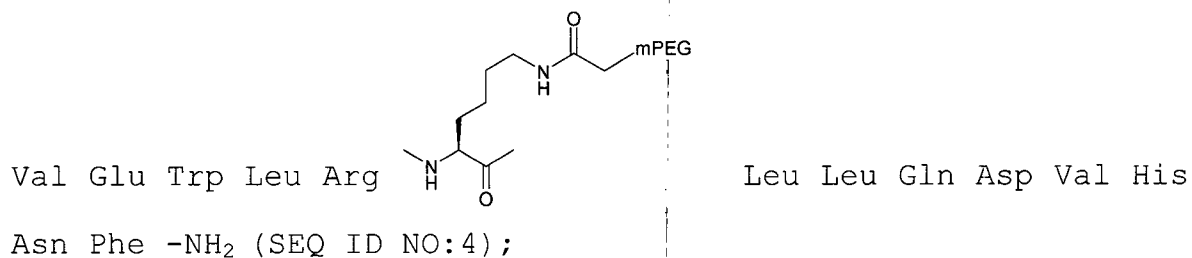
20 Val Glu Trp Leu Arg Leu Leu Gln Asp Val His
Asn Phe - NH₂ (SEQ ID NO: 1).

25

3. El compuesto de la reivindicación 1, caracterizado porque tiene la secuencia de aminoácidos:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Asn Leu Gly Arg His Leu
Ala Ser Nle Glu Arg

5

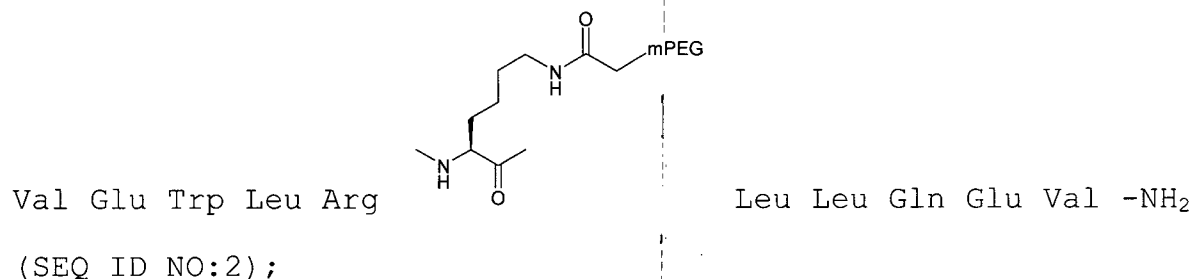


4. El compuesto seleccionado del grupo que consiste de:

10

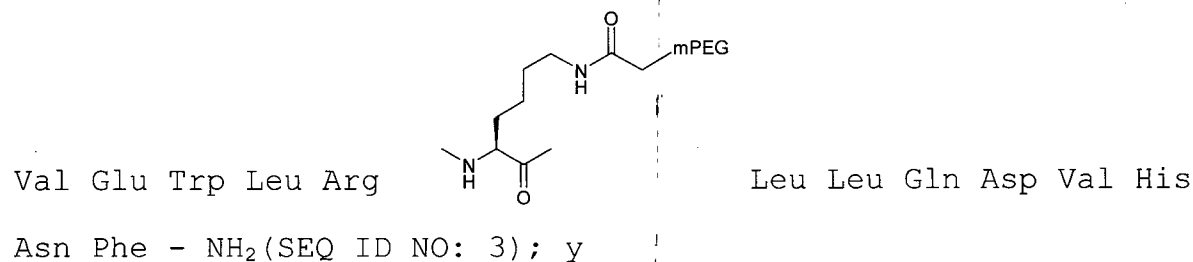
a) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg
His Leu Ala Ser Nle Glu Arg

15



b) Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg
His Leu Ala Ser Met Glu Arg

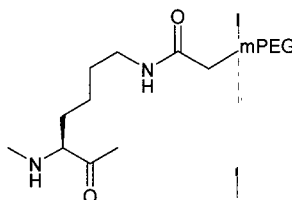
20



25

(cl)

c) Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Nle His Gln Arg Gly Arg
His Leu Ala Ser Nle Glu Arg



5 Val Glu Trp Leu Arg Leu Leu Gln Glu Val His
Gln Phe -NH₂ (SEQ ID NO:5);

caracterizado porque mPEG es monometoxi polietilenglicol con un peso molecular promedio de desde 1500 hasta 5500 Daltones; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 5. Un intermediario con una secuencia caracterizado porque se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID Nos: 8-12.

6. El compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, caracterizado porque mPEG tienen un peso molecular promedio de alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones.

7. El compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, caracterizado porque mPEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 Daltones.

8. Una composición que comprende un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; caracterizada porque está en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

9. La composición de la reivindicación 8, caracterizada porque mPEG tiene un peso molecular promedio de desde alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones.

10 5 10. La composición de la reivindicación 8, en donde mPEG tienen un peso molecular promedio de alrededor de 2000 Daltones.

11. Un método de inducción de formación ósea en un mamífero, caracterizado porque comprende la administración a un mamífero en necesidad del tratamiento de una cantidad efectiva de un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

12. Un método de tratamiento de una enfermedad o condición en la cual la formación de hueso nuevo y/o un aumento en la masa ósea y la resistencia biomecánica sería benéfica en un mamífero, que incluye osteoporosis, osteopenia, fractura ósea, fusión espinal, implantes óseos, implantes en articulación, implantes dentales, y enfermedad periodontal, caracterizado porque comprende la administración a un mamífero en necesidad de un tratamiento tal, de una cantidad efectiva de un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

13. Un método de tratamiento de osteoporosis u osteopenia en un paciente, caracterizado porque comprende la

W

administración a un paciente en necesidad de un tratamiento tal de una cantidad efectiva de un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5 14. Un método de prevención de osteoporosis u osteopenia en un mamífero caracterizado porque comprende la administración a un mamífero en necesidad de una prevención tal, de una cantidad efectiva de un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal
10 farmacéuticamente aceptable de los mismos.

 15. Un método de tratamiento de una fractura de hueso en un paciente, caracterizado porque comprende la administración a un paciente en necesidad de un tratamiento tal, de una cantidad efectiva de un compuesto de cualquiera de una de las
15 reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

 16. El método de cualquiera de una de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizado porque el mPEG tiene un peso molecular promedio de desde alrededor 2000 hasta 5000
20 Daltones.

 17. El método de cualquiera de una de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizado porque el mPEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 Daltones.

18. Un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en terapia.

5 19. Un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en la inducción de formación ósea en un mamífero.

10 20. Un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición en la cual la formación de hueso nuevo y/o un incremento en la masa ósea y resistencia biomecánica ósea podría ser benéfica en un mamífero, que incluye osteoporosis, osteopenia, fractura ósea, fusión espinal, implantes óseos, 15 implantes de articulaciones, implantes dentales y enfermedad periodontal.

20 21. Un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en el tratamiento de osteoporosis en un mamífero.

22. Un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en la prevención de osteoporosis u osteopenia en un mamífero.

23. Un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en el tratamiento de una fractura ósea un mamífero.

5 24. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, caracterizado porque el mPEG tiene un peso molecular promedio desde alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones.

10 25. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, caracterizado porque el mPEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 Daltones.

26. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23 caracterizado porque el mamífero es un humano.

15 27. El uso de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición capaz de ser mejorada o prevenida por inducción de formación ósea.

20 28. El uso de un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de condiciones en las cuales la formación de hueso nuevo y un incremento en la masa ósea y resistencia biomecánica ósea podría ser benéfica en un mamífero, que incluye osteoporosis, osteopenia, fractura ósea, fusión

114

espinal, implantes óseos, implantes de articulaciones, implantes dentales y enfermedad periodontal.

29. El uso de un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de osteoporosis u osteopenia en un mamífero.

30. El uso de un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la fabricación de un medicamento para la prevención de osteoporosis u osteopenia en un mamífero.

31. El uso de un compuesto de cualquiera de una de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el uso en el tratamiento de una fractura ósea un mamífero.

32. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en donde mPEG tiene un peso molecular promedio desde alrededor de 2000 hasta 5000 Daltones.

33. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en donde mPEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 Daltones.

34. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, en donde el mamífero es un humano.

115

RESUMEN DE LA INVENCION

Las composiciones farmacéuticas y métodos se proporcionan para el tratamiento y prevención de enfermedades
5 de pérdida ósea que incluye osteoporosis en un mamífero.

Listado de Secuencias

<110> Eli Lilly and Company

5 <120> MODULADORES DEL RECEPTOR PTH PEGILADOS Y USOS DE LOS
MISMOS

<130> X17107

10 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

15 <211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> CONSTRUCTO SINTETICO

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (26)..(26)

25 <223> Xaa en la posición 26 es una lisina modificada

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Amidación

5

<400> 1

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu
Ala

10

1

5

10

15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Asp Val
His

20

25

30

15

Asn Phe

<210> 2

<211> 31

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CONSTRUCTO SINTETICO

25

118

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (8)..(8)

<223> Xaa en la posición 8 es Norleucina

5

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Norleucina

10

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (26)..(26)

<223> Xaa en la posición 26 es una lisina modificada

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> AMIDACIÓN

20

<400> 2

Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Gln Arg Gly Arg His Leu

Ala

25

1

5

10

15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Glu Val

20

25

30

<210> 3

5 <211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CONSTRUCTO SINTETICO

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (26)..(26)

15 <223> Xaa en la posición 26 es una lisina modificada

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

20 <223> Amidación

<400> 3

Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu

25 Ala

170

5

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Asp Val
His

5 20 25 30

Asn Phe

- <210> 4
- 10 <211> 34
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> CONSTRUCTO SINTETICO
- <220>
- <221> CARACTERISTICAS DIVERSAS
- <222> (8)..(8)
- 20 <223> Xaa en la posición 8 es Norleucina
- <220>
- <221> CARACTERISTICAS DIVERSAS
- <222> (18)..(18)
- 25 <223> Xaa en la posición 18 es Norleucina

(2)

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (26)..(26)

<223> Xaa en la posición 26 es una lisina modificada

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Amidación

10

<400> 4

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Arg His Leu
Ala

15

1

5

10

15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Asp Val
His

20

25

30

20

Asn Phe

<210> 5

<211> 34

25

<212> PRT

na

<213> Artificial

<220>

<223> CONSTRUCTO SINTETICO

5

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (8)..(8)

<223> Xaa en la posición 8 es Norleucina

10

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Norleucina

15

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (26)..(26)

<223> Xaa en la posición 26 es una lisina modificada

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Amidación

25

123

<400> 5

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Gln Arg Gly Arg His Leu
Ala

5 1

5

10

15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Glu Val
His

20

25

30

10

Gln Phe

<210> 6

<211> 34

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CONSTRUCTO SINTETICO

20

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (8)..(8)

<223> Xaa en la posición 8 es Met si Xaa en la posición 18

25 es también Met; o

124

Xaa en la posición 8 es Norleucina si Xaa en la
posición 18 es también Norleucina

<220>

5 <221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 8 es Met si Xaa en la posición 18
es también Met; o

10 Xaa en la posición 8 es Norleucina si Xaa en la
posición 18 es también Norleucina

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (26)..(26)

15 <223> Xaa en la posición 26 es una lisina modificada

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

20 <223> AMIDACIÓN

<400> 6

25 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Arg His Leu
Ala

125

10

1

5

10

15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu Gln Asp Val
His

5

20

25

30

Asn Phe

<210> 7

10

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> CONSTRUCTO SINTETICO

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

20

<223> Modificado con FMOC

<400> 7

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu

25

Ala

126

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
His

5 20 25 30

Asn Phe

- 10 <210> 8
- <211> 34
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 15 <220>
- <223> CONSTRUCTO SINTETICO

- <220>
- <221> MOD_RES
- 20 <222> (34)..(34)
- <223> Puede o no ser amidado

- <400> 8
- Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu
- 25 Ala

128

12

1

5

10

15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
His

5

20

25

30

Asn Phe

<210> 9

10

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> CONSTRUCTO SINTETICO

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (8)..(8)

20

<223> Xaa en la posición 8 es Norleucina

<220>

<221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (18)..(18)

25

<223> Xaa en la posición 18 es Norleucina

178

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

5 <223> Puede o no ser amidado

<400> 9

10 Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Gln Arg Gly Arg His Leu
Ala

1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Glu Val
20 25 30

15

<210> 10

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> CONSTRUCTO SINTETICO

<220>

25 <221> MOD_RES

129

<222> (34) .. (34)

<223> PUEDE O PUEDE NO SER AMIDADO

<400> 10

5

Pro Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Arg His Leu
Ala

1 5 10 15

10 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
His

20 25 30

Asn Phe

15

<210> 11

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> CONSTRUCTO SINTETICO

<220>

25 <221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (8)..(8)

<223> Xaa en la posición 8 es Norleucina

<220>

5 <221> CARACTERISTICAS DIVERSAS

<222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Norleucina

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Puede o puede no ser amidado

<400> 11

15

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Arg His Leu
Ala

1 5 10 15

20 Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
His

20 25 30

Asn Phe

25

<210> 12
<211> 34
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> CONSTRUCTO SINTETICO

<220>

10 <221> CARACTERISTICAS DIVERSAS
<222> (8)..(8)
<223> Xaa en la posición 8 es Norleucina

<220>

15 <221> CARACTERISTICAS DIVERSAS
<222> (18)..(18)
<223> Xaa en la posición 18 es Norleucina

<220>

20 <221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Puede o puede no ser amidado

<400> 12

132

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Gln Arg Gly Arg His Leu
Ala

1

5

10

15

5 Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Glu Val
His

20

25

30

Gln Phe

PATENT COOPERATION TREATY RECEIVED

133

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

FEB 25 2008

PCT

To:

ELI LILLY AND COMPANY
Attn. Wiskerchen, MaryAnn ✓
P.O. Box 6288
Indianapolis, Indiana 46206-6288
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

ELI LILLY AND COMPANY
Patent Division

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year) 22/02/2008	
Applicant's or agent's file reference X17107 ✓	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2007/080367 ✓	International filing date (day/month/year) 04/10/2007 ✓
Applicant ELI LILLY AND COMPANY	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel (431-70) 340-2040 Tx 31 651 ann nl

Authorized officer

Barbara Berruti

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X17107	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2007/080367	International filing date (day/month/year) 04/10/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13/10/2006
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

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

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

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

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

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

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

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

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

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

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

PEGYLATED PTH AS PTH RECEPTOR MODULATORS AND USES THEREOF

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

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

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

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

- ☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/080367

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

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

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

on paper

☒

in electronic form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in electronic form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/080367

137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/635 A61K47/48 A61K38/29
ADD. A61P19/10

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, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	✓ EP 1 477 496 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 17 November 2004 (2004-11-17) page 5, paragraph 34; example 1	1-34
A	✓ WO 2004/084918 A (SEKISUI CHEMICAL CO LTD [JP]; SHIMIZU TATSUO [JP]; KURIYAMA KIYOSHI [J]) 7 October 2004 (2004-10-07) cited in the application examples 15-22	1
	----- -/--	

☒ 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

5 February 2008

Date of mailing of the international search report

22/02/2008

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.

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/080367

138

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NA DONG HEE ET AL: "Capillary electrophoretic characterization of PEGylated human parathyroid hormone with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 15 AUG 2004, vol. 331, no. 2, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 322-328, XP002467456 ISSN: 0003-2697 page 327, left-hand column, line 14 - line 18; figure 1 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/080367

139

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

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 11-17 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/080367

40

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1477496	A	17-11-2004	WO 03064462 A1	07-08-2003
			US 2005148763 A1	07-07-2005
WO 2004084918	A	07-10-2004	EP 1607095 A1	21-12-2005
			US 2006105988 A1	18-05-2006

PATENT COOPERATION TREATY

141

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

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

13 Aug 2008

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

X 17607

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

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No
PCT/US2007/080367

International filing date (day/month/year)
04.10.2007

Priority date (day/month/year)
13.10.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/635 A61K47/48 A61K38/29
ADD. A61P19/10

Applicant
ELI LILLY AND COMPANY

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

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

2. **FURTHER ACTION**

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA



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

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Fuhr, Christian



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/080367

42

Box No. I Basis of the opinion

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

143

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/080367

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

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. 11-17 (all partially) with respect to industrial applicability

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 11-17 (all partially) with respect to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international search (*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 whole application or for 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 Searching 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 Searching 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 13*ter*.1(a) or (b).
- ☐ 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 Searching 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 Supplemental Box for further details

144

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/080367

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-34</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-34</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-10,18-34</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

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

see separate sheet

1 Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 1.1 **Claims 11-17** 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). With respect to novelty and inventive step, an opinion will be formulated which is based on the assumption, that the subject matter of **claims 11-17** was directed to the use of the compounds or compositions disclosed therein.

2 Re Item V

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

2.1 **Prior Art**

Reference is made to the following document/s/:

- D1: EP-A-1 477 496 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 17 November 2004 (2004-11-17)
- D2: NA DONG HEE ET AL: "Capillary electrophoretic characterization of PEGylated human parathyroid hormone with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 15 AUG 2004, vol. 331, no. 2, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 322-328, XP002467456/ISSN: 0003-2697
- D3: WO 2004/084918 A (SEKISUI CHEMICAL CO LTD [JP]; SHIMIZU TATSUO [JP]; KURIYAMA KIYOSHI [J] 7 October 2004 (2004-10-07) cited in the application

2.2 **Novelty**

- 2.2.1 The subject matter of **claims 1-34** is regarded to be novel, since no anticipating

prior art could be retrieved (Article 33(2) PCT).

2.3 Inventive Step

- 2.3.1 D1 is identified as closest prior art; it discloses pegylated hPTH derivatives, being those having an uncontrolled PEG conjugation site, and those having a controlled PEG conjugation site. The first group of conjugates is made by reacting PEG with hPTH(1-34), whereby D1 discloses that the N-terminal amine or the ϵ -amino groups of Lysine 13, 26 or 27 react with PEG (example 1(1); page 5, paragraph 34). The other group of conjugates is made by introduction of a Cys-residue into the hPTH, e.g. to the C-terminus like in PTH(1-34)-Cys and the controlled conjugation to the thiol group (example 1(2)). D1 further elaborates that said 'uncontrolled' pegylated hPTH derivatives have 'lower activity in vivo and in vitro' tests (page 5, paragraph 34).
- 2.3.2 The difference between the subject matter of **claim 1** and D1 is that hPTH is pegylated at Lys26 only, whereas Lys13 is mutated to Arg, and Lys27 is mutated to Leu. Furthermore the hPTH derivative of application has a Ala16, instead of Asn16.
- 2.3.3 The problem underlying the present application can therefor be defined as the provision of further pegylated hPTH derivatives.
- 2.3.4 The solution as stated in claim 1 is found to be inventive (Article 33(3) PCT), since the application discloses a pattern of substitutions, which was not hinted nor suggested in the prior art. The choice of a controlled pegylation of Lys26 is regarded to be non-obvious for the following reasons:
- in native hPTH 1-34, there were several potential (lysine) residues as targets for pegylation, as disclosed in D2; D2 discloses further that Lys 26 is the least easily pegylated in native hPTH (see fig. 1, page 327, lines 14-18);
 - until the filing date, cysteine residues were known for a controlled pegylation (see D1);
 - until the filing date, prior art also disclosed uncontrolled and unspecific pegylation (D3, see example 15-22)
- 2.3.5 The subject matter of dependent **claims 2-4, 6-7, and of claims 8-34**, which

use and employ said compounds of **claims 1-4 and 6-7** are considered to be inventive, too (Article 33(3) PCT).

- 2.3.6 Claim 5 is directed to intermediates to prepare the compounds of invention; as intermediates, they are considered to be inventive, too (Article 33(3) PCT).

2.4 Industrial applicability

- 2.4.1 For the assessment of the present **claims 11-17** 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.

- 2.4.2 The subject matter of **claims 1-10, 18-34** is regarded to be industrially applicable (Article 33(4) PCT).

3 Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 3.1 Claims 27-28 have to be objected under Article 6 PCT. Said claims are formulated as second-medical-use claims but based on a technical property, i.e. the induction of bone formation. Second medical use claims, however, should be directed to real and defined diseases.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/080367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/635 A61K47/48 A61K38/29
ADD. A61P19/10

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, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 477 496 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 17 November 2004 (2004-11-17) page 5, paragraph 34; example 1	1-34
A	WO 2004/084918 A (SEKISUI CHEMICAL CO LTD [JP]; SHIMIZU TATSUO [JP]; KURIYAMA KIYOSHI [J]) 7 October 2004 (2004-10-07) cited in the application examples 15-22	1

☒ 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

5 February 2008

Date of mailing of the international search report

22/02/2008

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

Fuhr, Christian

149

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/080367

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NA DONG HEE ET AL: "Capillary electrophoretic characterization of PEGylated human parathyroid hormone with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 15 AUG 2004, vol. 331, no. 2, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 322-328, XP002467456 ISSN: 0003-2697 page 327, left-hand column, line 14 - line 18; figure 1	1

150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/080367

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

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 11-17 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

101

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/080367

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1477496	A	17-11-2004	WO 03064462 A1	07-08-2003
			US 2005148763 A1	07-07-2005
WO 2004084918	A	07-10-2004	EP 1607095 A1	21-12-2005
			US 2006105988 A1	18-05-2006



No. 09-035909- -00000-0000

Fecha: 2009-04-07 16:42:33
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 151Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIAREQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒INCOMPLETA ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

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

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐INCOMPLETA ☐
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia