



BT

**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

PCT



SOLICITUD  
**PATENTE DE INVENCION**

09-97899

21. EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

54. TÍTULO **COAGONISTAS DE  
RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL \_\_\_\_\_

71. SOLICITANTE **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH  
AND TECHNOLOGY CORP.**DOMICILIO **INDIANA, USA**74. APODERADO **CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ**22. BOGOTÁ, D.C., **11/9/2009**

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-097899- -00000-0000

Fecha: 2009-09-11 14:41:00 Dep 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 414

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1.

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capitulo I

☐ Capitulo II

2.

SOLICITANTE

(71)

Nombre: INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION.

Dirección: 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202, USA.

Domicilio: Indianapolis, IN 46202, USA

Lugar de Constitución: ESTADO DE INDIANA, USA

Teléfono Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. NIT

C.E. Otro

Cual

Número:

3.

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ

Dirección: Cr. 13 A No 28-38, Mz 2 Bufete 230. Parque Central Bavaria

Teléfono 3419841 Fax: 2435423

E-mail: patent@tmtamayo.net

IDENTIFICACION

C.C. X NIT

C.E. Otro

Cual

Número: 17.117.818 TP: 17.402

4.

INVENTOR(ES)

(72)

Nombres: 1.- Jonathan Day; 2.- James Patterson; 3.- Joseph Chabenne; 4.- Maria Dimarchi; OTROS INVENTORES EN HOJA ANEXA

Dirección: 1.- 1331 South Adams Street, Apt. 11, Bloomington, IN 47402, USA. 2.- 890 East Columbus Street, Martinsville, IN 46151, USA. 3.- 13505 East 114th Street, Fishers, IN 46037, USA. 4.- 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033, USA.

Nacionalidad o Domicilio: 1 Ciudadano de USA 2 Ciudadano de USA 3 Ciudadano de USA 4 Ciudadano de USA

5. PCT (86)

Solicitud internacional No. PCT/US2008/053857

Fecha: FEBRERO 13/2008

Publicación internacional No. WO 2008/101017 A2

Fecha: AGOSTO 21/2008

6. Título (54)

COAGONISTAS DE RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1

7. Clasificación Internacional (51)

8. Prioridad

Si ☒ No ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número deSolicitud

USA 15-Feb-07 60/890,087

USA 17-May-07 60/938,565

9. Comprobante de pago No. 09-67,549 Y 09-67,550

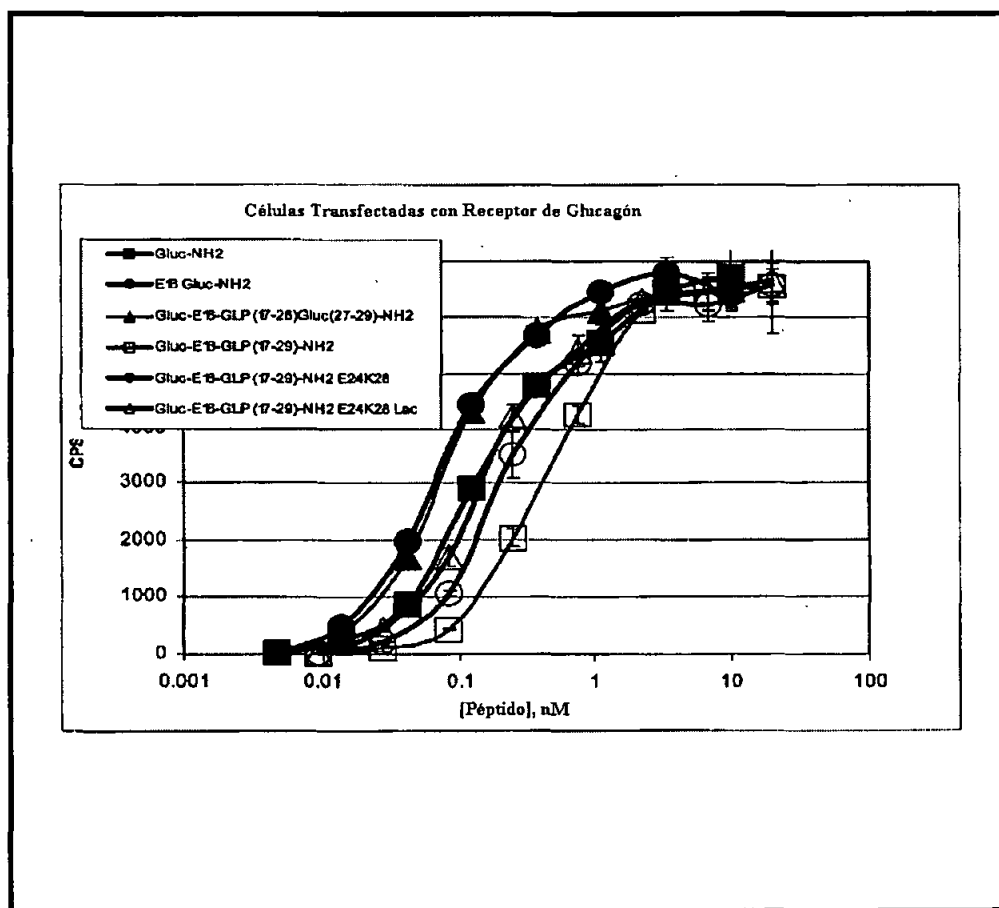
Fecha SEPTIEMBRE 10/2009

10.

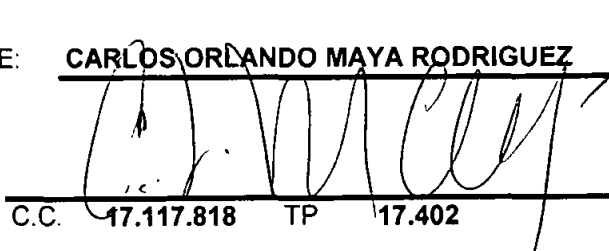
## Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros ( CARATULA DE LA PUBLICACION INTERNACIONAL y FORMULARIOS: PCT/RO101, ISA 220, ISA 210 Y ISA 237) Y EL COMPROBANTE DE PAGO POR EXCEDENTE EN REIVINDICACIONES No.- 09-67,550.

## 11. FIGURA CARACTERISTICA



12. Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZFIRMA: C.C. 17.117.818 TP 17.402





SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-097899-00000-0000

Fecha: 2009-09-11 14:41:00 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 414

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 67,549  
FECHA : SEPTIEMBRE 10 DE 2009

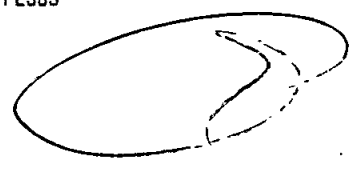
\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE               | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|---------------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| CARLOS TAMAYO Y ASOCIADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 114681803 | 10/09/2009 | 2,969,000.00 |

\*\*\*\*\* 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. \_\_\_\_\_



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 67,550  
FECHA : SEPTIEMBRE 10 DE 2009

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE               | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|---------------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| CARLOS TAMAYO Y ASOCIADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 114681803 | 10/09/2009 | 2,969,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO    | TOTAL CONCEPTO                        |
|-------|-------------|-------------|---------------------------------------|
| 50    | 50005-01-01 | SOLICITUDES | *** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL |
|       |             |             | 1,250,000.00                          |
|       |             | TOTAL :     | \$ 1,250,000.00                       |

SON: UN MILLON DOSCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

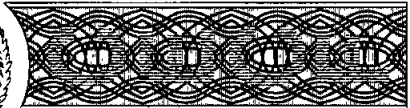
RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

16000  
Cdouline 6



ACTUACION NOTARIAL  
LEY 404



N 011163010

090821 371811



11:04:42  
336.00  
21/08/2009

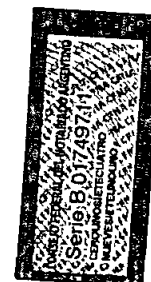
**FOLIO 1.532.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NUMERO SETECIENTOS SETENTA Y DOS.-** En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a catorce de agosto de dos mil nueve, ante mi, Escribano Autorizante, **COMPARECE** don **Daniel GOYTIA**, argentino, mayor de edad, casado, L.E. número 4.526.965, domiciliado en Bartolomé Mitre 226, 4º piso de esta Ciudad.- El compareciente es persona de mi conocimiento, doy fe, así como que **DICE**: I.- Que por escritura de fecha 7 de abril del 2008, pasada ante mi al folio 876 del Protocolo de este Registro, al que me remito, doy fe, se protocolizó un **Poder con Cesión**, otorgado por: **Jonathan Day**, con domicilio en 1331 South Adams Street, Bloomington, IN 47402, USA - **James Patterson**, con domicilio en 890 East Columbus Street, Martinsville, IN 46151, USA - **Joseph Chabenne**, con domicilio en 13505 East 114<sup>th</sup> Street, Fishers, IN 46037, USA - **Maria DiMarchi**, con domicilio en 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033, USA - **David Smiley**, con domicilio en 3823 South Laura Way, Bloomington, IN 47401, USA - **Richard DiMarchi**, con domicilio en 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033, USA y **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY**, con domicilio en 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202, US, a su favor, el que transcripto en sus partes pertinentes **DICE**: "... nombran por el presente a **DANIEL GOYTIA Y ASOCIADOS** como apoderados con poder especial suficiente para solicitar y obtener de las autoridades nacionales **"COAGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN / GLP-1"** - basado en: Datos de la prioridad - No. de Prioridad - Fecha de Presentación - País - US - 60/890,087 - 02 de febrero de 2007 - US - 60/938,565 - 17 de mayo de 2007, cuyo título deberá entenderse a nombre de **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY**, con domicilio en 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202, US, a quién ha cedido todos sus derechos a la invención arriba citada en cuanto se refiere a los países arriba citados sin restricción de ninguna clase, mediante el pago de un dólar que declara haber recibido. El cesionario firma también el presente en prueba de aceptación de la cesión y autoriza a los

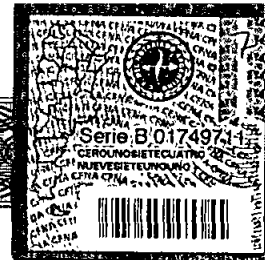
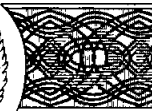


N 011163010

expresados apoderados para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al  
objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones y reclamos; formular y firmar descripcio-  
nes, enmiendas y apelaciones; pagar todos los impuestos y cuotas y efectuar toda clase de  
pagos determinados por la ley y retirar los mismos si fuere necesario; recibir todos los do-  
cumentos y valores dando el descargo respectivo; desistir y percibir; llenar cualesquier  
otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo  
de los intereses del demandante, el que ratifica y confirma por el presente todo cuanto  
hicieren legalmente dichos apoderados en virtud del presente poder, con plena facultad de  
sustitución y révocation. La CESIÓN de la invención mencionada tiene vigencia a partir de  
la primera: 1) fecha de otorgamiento indicada anteriormente o 2) la fecha de presentación  
de la solicitud mencionada...".- II.- Que viene por la presente a **SUSTITUIR** el citado man-  
dato, reservándose para si las facultades, a favor de **"CARLOS TAMAYO & ASOCIADOS"**  
**y/o Carlos Orlando Maya Rodriguez y/o Gustavo Calderon Rosero y/o Carmen Gracie-**  
**la Florez y/o Clara Cortes Charry y/o Mayerling Rocio Castelblanco S.,** con domicilio en  
Carrera 13A N° 28-38, Buffette 245, Manzana 02, Parque Central Bavaria, Bogotá, **CO-**  
**LOMBIA,** para actuar exclusivamente en dicho país con todas y cada una de las facultades  
enumeradas precedentemente.- LO TRANSCRIPTO ES COPIA FIEL, doy fe, de las partes  
pertinentes del mandato relacionado.- LEIDA y ratificada, así lo expresó, otorgó, aceptó y  
firmó, por ante mi, doy fe.- "SIGUE UNA FIRMA".- Esta mi sello.- Ante mi: ALEJANDRO M.  
LIPORACE.- CONCUERDA con su matriz que pasó ante mi, al folio 1.532 del Protocolo del  
Registro 1331 a mi cargo.- PARA LOS APODERADOS expido esta **PRIMERA COPIA** en  
UNA FOJA de Actuación Notarial número N 011163010 que sello y firmo en el mismo lugar  
y fecha de su otorgamiento, doy fe.-

ALEJANDRO M. LIPORACE  
MATRICULA 3837  
ESCRIBANO PUBLICO





L 009009572

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ALEJANDRO MARIA LIPORACE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 090821371811/4 La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Viernes 21 de Agosto de 2009

Esc. ANGELICA G. E. VITALE  
COLEGIO DE ESCRIBANOS  
CC.





# REPÚBLICA ARGENTINA

## MINISTERIO *de* RELACIONES EXTERIORES COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

### APOSTILLE (Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

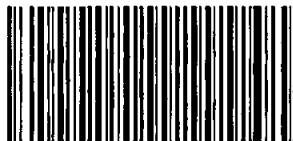
1. País ARGENTINA  
El presente documento público
2. Ha sido firmado por ANGELICA G. E. VITALE
3. Quien actúa en calidad de FUNCIONARIO HABILITANTE
4. Lleva el sello/timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
5. En BUENOS AIRES 6. El día 25/08/2009
7. Por UNIDAD DE COORDINACION LEGALIZACIONES  
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO  
INTERNACIONAL Y CULTO
8. Bajo el Número: 168688/2009
9. Sello/Timbre: 39

Dn. ROBERTO DANIEL PEREZ  
Unidad de Coordinación Legalizaciones  
Ministerio de Relaciones Exteriores  
Comercio Internacional y Culto

10. Firma

Tipo de Documento: ACTUACION NOTARIAL  
Titular del Documento: DANIEL GOYTIA

LA PRESENTE LEGALIZACIÓN TIENE  
COMO UNICO EFECTO AUTENTICAR  
LA FIRMA Y CARÁCTER DEL OTORGANTE  
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO



2009168688



74FE68DAB8B53F468E008D785447FF7



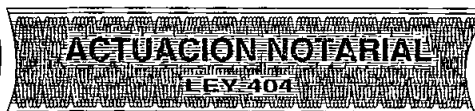
CECBA - LEY 404 GCBA  
LEGALIZACION  
090728 329985



\$35.00

28/07/2009

12:47:55



16000  
00600000

N 011082583

FOLIO 1.318.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NUMERO SEISCIENTOS

CUARENTA Y NUEVE.- En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Ar-

gentina, a veintidos de julio de dos mil nueve, ante mi, Escribano Autorizante,

COMPARECE don **Daniel GOYTIA**, argentino, mayor de edad, casado, Libreta de

Enrolamiento número 4.526.965, domiciliado en Bartolomé Mitre 226, 4º piso, de

esta Ciudad.- El compareciente es persona de mi conocimiento, doy fe, así como

que DICE: I.- Que por escritura de fecha 9 de abril de 2008, pasada ante mí al folio

932 del Protocolo de este Registro, al que me remito, doy fe, se protocolizó un Po-

der otorgado por **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY**

**CORPORATION**, con domicilio en 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202, US,

a su favor, el que transcripto en sus partes pertinentes literalmente DICE: "... Poder

- El abajo firmante - (1) - **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY**

**CORPORATION** - Domiciliado en - (2) - 351 West 10th Street, Indianapolis, IN

46202, US, por el presente otorga a **DANIEL GOYTIA** domiciliado en Buenos Aires,

Argentina, poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades nacionales que

corresponda, sean estas administrativas y/o judiciales, la obtención de "**Patentes,**

**Marcas, Modelos, Diseños y sus renovaciones**" y realizar todos los trámites con-

ducentes para proteger los derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para

efectuar ante dichas autoridades nacionales, adquirir y conservar todos los

trámites necesarios a los objetos indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposi-

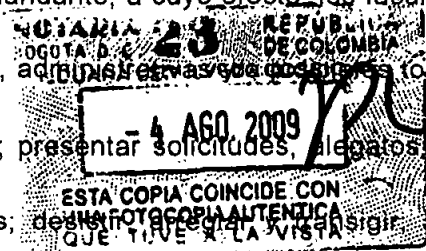
ciones, protestas, apelaciones y demandas; de suscribir, aceptar

cesiones y transferencias; solicitar testimonios; recibir documentos y otros valores;

justificar explotaciones; cobrar y percibir; firmar instrumentos públicos, privados y

escrituras públicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto

fuere necesario ante las autoridades nacionales, judiciales y/o administrativas, sea







N 011082583

como demandante o como demandado, para proteger los intereses del mandante, con facultad de substituir este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue. Este documento es efectivo a partir del 31 de enero de 2008 ...".- LO TRANSCRIPTO ES COPIA FIEL, doy fe, de las partes pertinentes del mandato relacionado.- II.- Continúa diciendo el compareciente que viene por la presente a **SUSTITUIR** el citado mandato, reservándose para si las facultades, a favor de "**CARLOS TAMAYO & ASOCIADOS**" y/o Carlos Orlando Maya Rodriguez y/o Gustavo Calderon Rosero y/o Carmen Graciela Florez y/o Clara Cortes Charry y/o Mayerling Rocio Castelblanco S., con domicilio en Carrera 13A N° 28-38, Buffette 245, Manzana 02, Parque Central Bavaria, Bogotá, **COLOMBIA**, para actuar en dicho país con todas y cada una de las facultades enumeradas precedentemente.- LEIDA y ratificada, así lo expresó, otorgó, aceptó y firmó, por ante mi, doy fe.- "**SIGUE UNA FIRMA**".- Esta mi sello.- Ante mi: **ALEJANDRO M. LIPO-RACE**.- **CONCUERDA** con su matriz que pasó ante mi, al folio 1.318 del Protocolo del Registro 1331 a mi cargo.- **PARA LOS APODERADOS** expido esta **PRIMERA COPIA** en UNA FOJA de Actuación Notarial número N 011082583 que sello y firmo en el mismo lugar y fecha de su otorgamiento, doy fe.-

*[Firma manuscrita]*

ALEJANDRO M. LIPO-RACE  
Matricula 3837  
ESCRIBANO PUBLICO



COPIA FIEL  
de la Ciudad de Buenos Aires



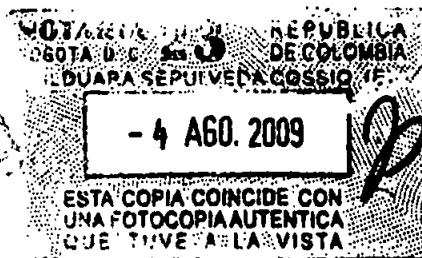
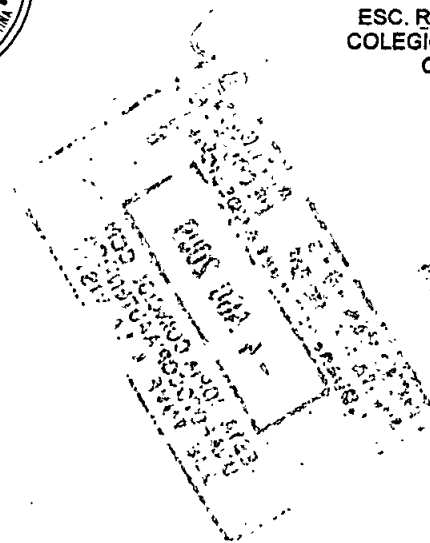
L 008968001

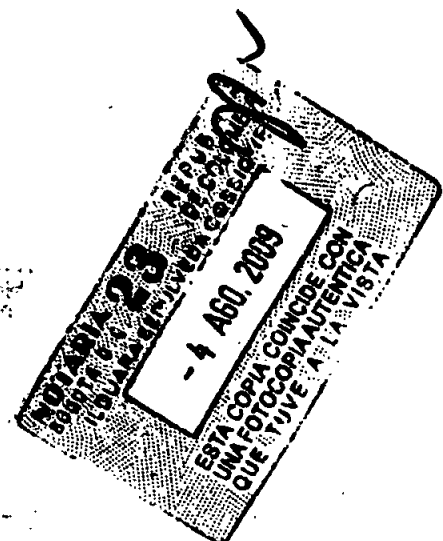
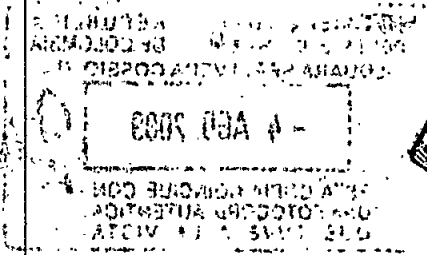
EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ALEJANDRO MARIA LIPORACE obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 0907-28329985/4 La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

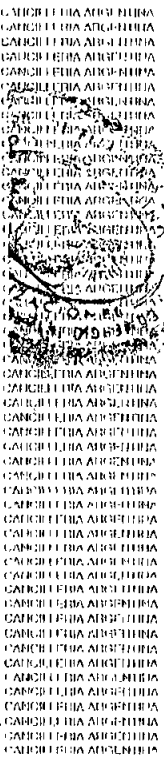


Buenos Aires, Martes 28 de Julio de 2009

  
ESC. RAQUEL COLOMER  
COLEGIO DE ESCRIBANOS  
CONSEJERA



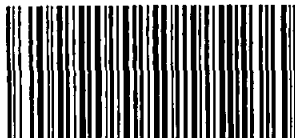




1. País ARGENTINA  
El presente documento público
2. Ha sido firmado por RAQUEL COLOMER
3. Quien actúa en calidad de FUNCIONARIO HABILITANTE
4. Lleva el sello/timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE CAPITAL FEDERAL
5. En BUENOS AIRES 6. El día 29/07/2009
7. Por UNIDAD DE COORDINACION LEGALIZACIONES  
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO  
INTERNACIONAL Y CULTO
8. Bajo el Número: 149647/2009
9. Sello/Timbre: 39

10 Firma  
Dn GUSTAVO EZEQUIEL SANTA ANA  
Unidad de Coordinación Legalizaciones  
Ministerio de Relaciones Exteriores  
Comercio Internacional y Culto

ESTADO DE GUAYARA SEPIQUEVA RUSIO (E)  
- 4 AGO. 2009  
ESTA COPIA COINCIDE CON  
UNA FOTOCOPIA AUTENTICA  
DE LA MISMA VISTA



1939917F6B9031883ED305C87367DFC8

# SECRETARY OF STATE

## STATE OF INDIANA



Todd Rokita  
Secretary of State

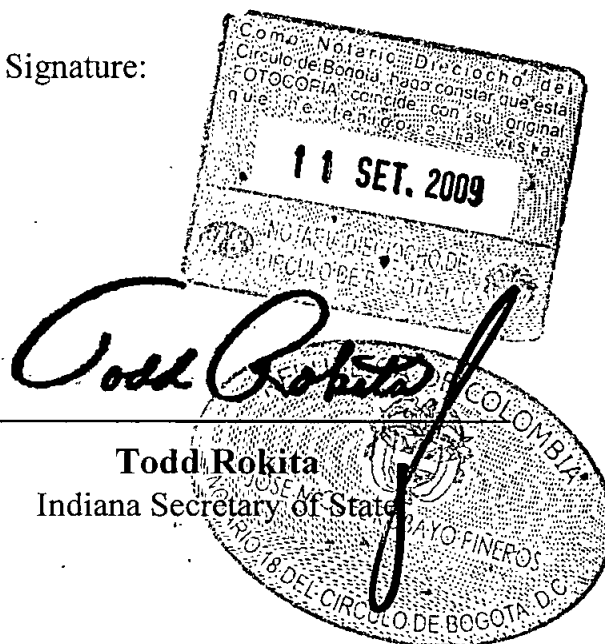
### APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Heather L. Behlmer*
3. acting in the capacity of notary public in & for *Hamilton* County
4. and bears the seal/stamp of notary public in & for the State of Indiana

### CERTIFIED

5. at Indianapolis, Indiana
6. this the *Twenty-first* day of *August, 2009*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. A2009 - 11079
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.*

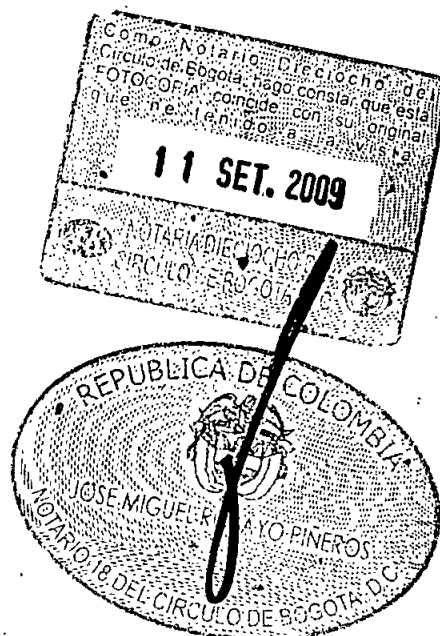
STATE OF INDIANA       )  
                                   ) SS:  
 COUNTY OF MARION     )

I, Heather L. Behlmer, a Notary Public in and for said State and County, hereby certify this to be a true and correct copy of the Certificate of Amendment concerning the name change from Advanced Research and Technology Institute, Inc. to Indiana University Research and Technology Corporation.

Aug. 19, 2009  
 Date

Heather L. Behlmer  
 Heather L. Behlmer, Notary Public,  
 Resident of Hamilton County

My Commission Expires:   November 16, 2009



State of Indiana  
Office of the Secretary of State

CERTIFICATE OF AMENDMENT

of

ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE, INC.

I, TODD ROKITA, Secretary of State of Indiana, hereby certify that Articles of Amendment of the above Non-Profit Domestic Corporation have been presented to me at my office, accompanied by the fees prescribed by law and that the documentation presented conforms to law as prescribed by the provisions of the Indiana Nonprofit Corporation Act of 1991.

The name following said transaction will be:

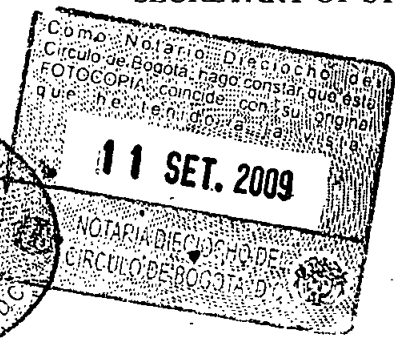
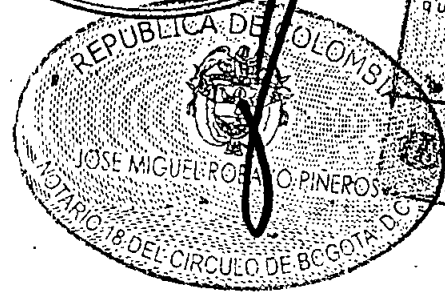
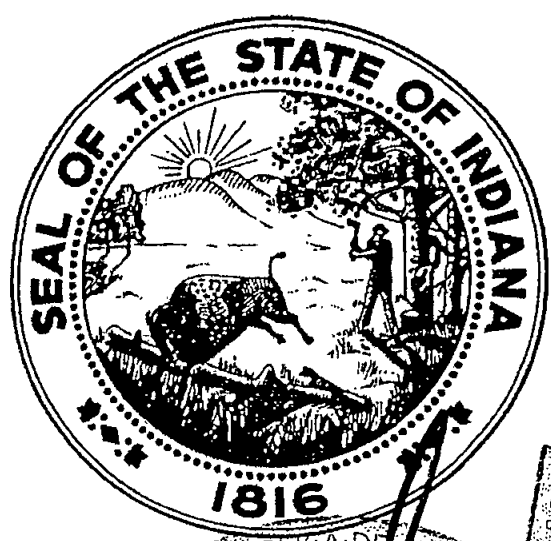
INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION

NOW, THEREFORE, with this document I certify that said transaction will become effective Wednesday, September 29, 2004.

In Witness Whereof, I have caused to be affixed my signature and the seal of the State of Indiana, at the City of Indianapolis, September 29, 2004.



TODD ROKITA,  
SECRETARY OF STATE



1996060638 / 2004093026509

[Sobre el margen superior de la página adjunta aparece un cosello que reza:] SELLO DEL ESTADO DE INDIANA. 1816

[Sobre el margen superior izquierdo de la página aparece un sello con una leyenda que reza:] SELLO DEL ESTADO DE INDIANA. 1816.

Todd Rokita. Secretario de Estado

SECRETARIO DE ESTADO

ESTADO DE INDIANA

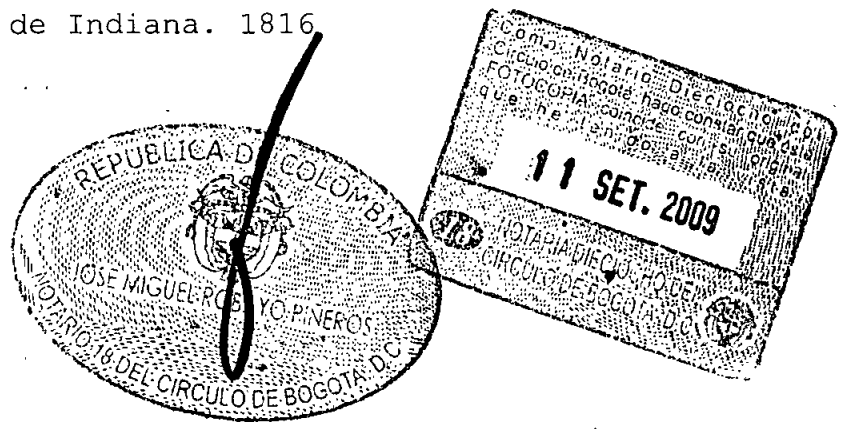
APOSTILLA

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

- 1. País: Estados Unidos de América
- 2. El presente documento público ha sido firmado por Heather L. Behmer
- 3. actuando en su carácter de escribano público del Condado de Hamilton
- 4. y lleva el sello/timbre de escribano público del Estado de Indiana

CERTIFICADO

- 5. en Indianapolis, Indiana
- 6. a los veintiún días del mes de agosto del año dos mil nueve
- 7. por el Subsecretario del Estado de Indiana
- 8. N° A2009-11079
- 9. Sello/Timbre: [Aparece un sello con una leyenda que reza:] Sello del Estado de Indiana. 1816





10. Firma: [Aparecen una firma ilegible y una aclaración de firma que reza:] Todd Rokita. Secretario del Estado de Indiana

Con vigencia el 1 de mayo de 2003 la totalidad de las apostillas del Secretario de Estado de Indiana tendrá un sello impreso en forma electrónica.

ESTADO DE INDIANA  
CONDADO DE MARION. A SABER

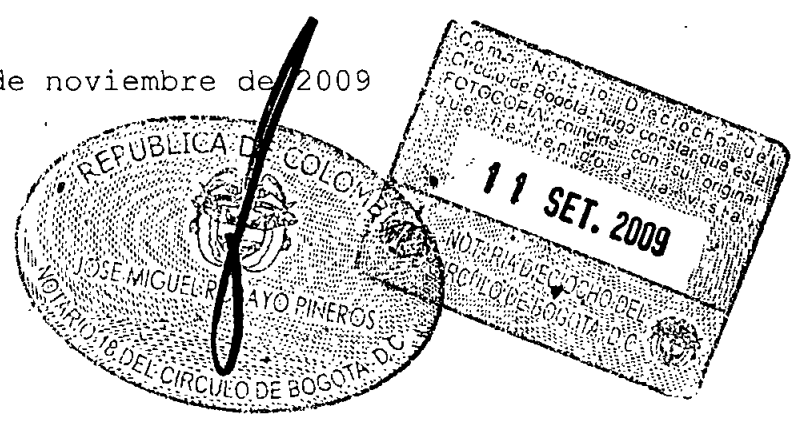
Yo, Heather L. Behlmer, Escribano Público del Estado y Condado mencionados, por la presente certifico que la presente es copia fiel del Certificado de Enmienda que se refiere al cambio de nombre de Advanced Research and Technology Institute, Inc. a Indiana University Research and Technology Corporation.

Fecha: 19 de agosto de 2009

[Aparecen una firma ilegible y una aclaración de firma que reza:] Heather L. Behlmer, Escribano Público. Domiciliado en el Condado de Hamilton

[Aparece un sello en relieve que reza:] Escribano Público.  
Sello. Indiana

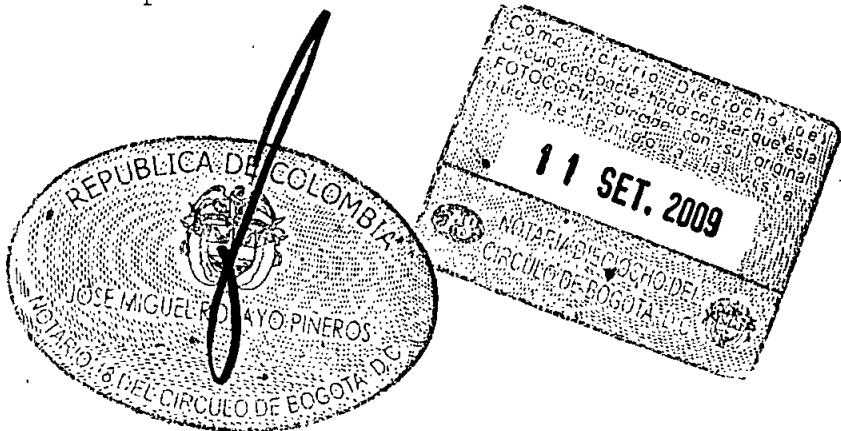
Mi Mandato vence el 16 de noviembre de 2009



## ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE, INC.

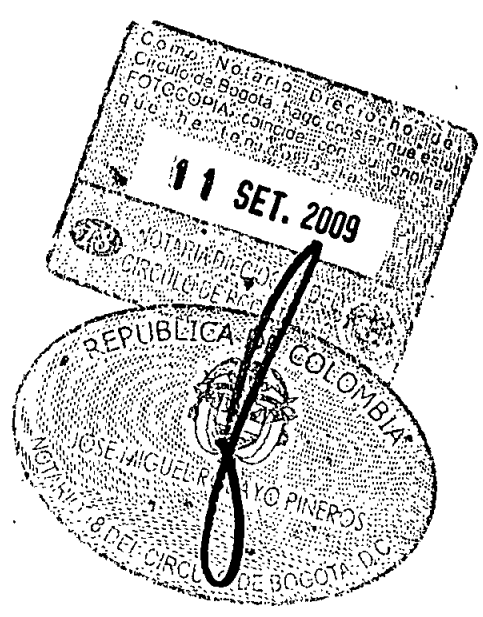
INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION

En fe de lo cual, he dispuesto que se estampe mi firma y el sello del Estado de Indiana, en la Ciudad de Indianapolis, a los 29 días del mes de septiembre del año 2004.



[Aparecen una firma ilegible y una aclaración de firma que reza:] TODD ROKITA, SECRETARIO DE ESTADO

[Aparece un sello con una leyenda que reza:] Sello del Estado de Indiana. 1816



(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
21 August 2008 (21.08.2008)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2008/101017 A2

(51) International Patent Classification:  
C07K 14/43 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2008/053857

(22) International Filing Date:  
13 February 2008 (13.02.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/890,087 15 February 2007 (15.02.2007) US  
60/938,565 17 May 2007 (17.05.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION [US/US]; 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAY, Jonathan [US/US]; 1331 South Adams Street, Apt. 11, Bloomington, IN 47402 (US). PATTERSON, James [US/US]; 890 East Columbus Street, Martinsville, IN 46151 (US). CHABENNE, Joseph [US/US]; 13505 East 114th Street, Fishers, IN 46037 (US). DIMARCHI, Maria [US/US]; 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033

(US). SMILEY, David [US/US]; 3823 South Laura Way, Bloomington, IN 47401 (US). DIMARCHI, Richard, D. [US/US]; 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033 (US).

(74) Agent: ADDISON, Bradford, G.; Barnes & Thornburg LLP, 11 South Meridian Street, Indianapolis, IN 46204 (US).

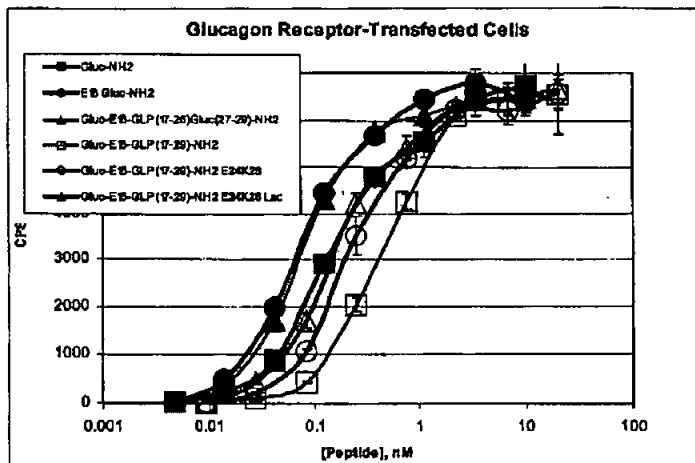
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,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

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

[Continued on next page]

(54) Title: GLUCAGON/GLP-1 RECEPTOR CO-AGONISTS

Fig 9A: cAMP Induction by GLP-1 17-26 Glucagon Analogs



(57) Abstract: Modified glucagon peptides are disclosed having enhanced potency at the glucagon receptor relative to native glucagon. Further modification of the glucagon peptides by forming lactam bridges or the substitution of the terminal carboxylic acid with an amide group produces peptides exhibiting glucagon/GLP-1 receptor co-agonist activity. The solubility and stability of these high potency glucagon analogs can be further improved by modification of the polypeptides by pegylation, substitution of carboxy terminal amino acids, or the addition of a carboxy terminal peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (K-RNRNNA) and SEQ ID NO: 28 (KRNR).

WO 2008/101017 A2



NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). — *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

**Published:**

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL  
TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

WIPO - OMPI

PCT

(19) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional: 21 de agosto de 2008  
(21-08-2008)

(10) Publicación Internacional Número: WO 2008/101017 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C07K 14/43  
(2006.01)

(21) Solicitud Internacional Número: PCT/US2008/053857

(22) Fecha de Presentación Internacional: 13 de febrero de  
2008 (13/02/2008)

(25) Idioma de Presentación: inglés

(26) Idioma de Publicación: inglés

(30) Datos de la Prioridad:

|            |                                    |    |
|------------|------------------------------------|----|
| 60/890.087 | 15 de febrero de 2007 (15-02-2007) | US |
| 60/938.565 | 17 de mayo de 2007 (17-05-2007)    | US |

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto  
Estados Unidos): INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY  
CORPORATION (US/US); 351 West 10th Street, Indianapolis, IN  
46202 (US).

(72) Inventores; y

(75) Inventores/Solicitantes (exclusivamente para Estados Unidos): DAY, Jonathan [US/US]; 1331 South Adams Street, Apt. 11, Bloomington, IN 47402 (US); PATTRESON, James [US/US], 890 East Columbus Street, Martinsville, IN 46151 (US); CHABENNE, Joseph [US/US], 13505 East 114th Street, Fishers, IN 46037 (US); DIMARCHI, Maria [US/US], 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033 (US); SMILEY, David [US/US], 3823 South Laura Way, Bloomington, IN 47401 (US); DIMARCHI, Richard D. [US/US], 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033 (US).

(74) Agente: ADDISON, Bradford G., Barnes & Thornburg, LLP, 11 South Meridian Street, Indianapolis, IN 46204 (US).

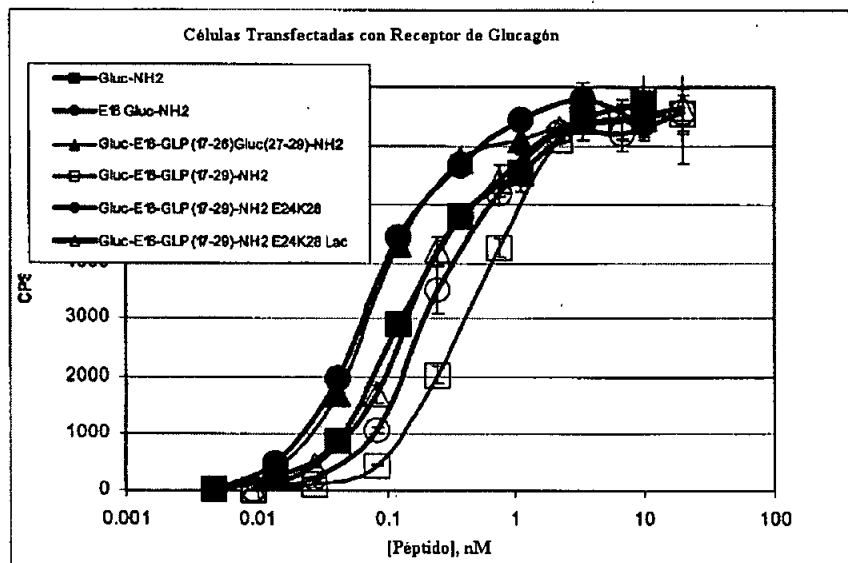
(81) Estados Designados (excepto que se indique de otro modo para todos los tipos de protecciones nacionales existentes):  
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (salvo que se indique de otro modo, para todos los tipos de protecciones regionales existentes): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente de Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(Continúa en la página siguiente)

(54) Título: COAGONISTAS DE RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1

Figura 9A: Inductor de cAMP por Análogos de GLP-1 17-26  
Glucagón





(57) **Resumen:** Se revelan péptidos de glucagón modificado que tienen potencia mejorada en el receptor de glucagón en relación con el glucagón nativo. Otra modificación de los péptidos de glucagón mediante la formación de puentes de lactona o la sustitución del ácido carboxílico de extremo con un grupo amida produce péptidos que presentan actividad de coagonista de receptor de glucagón/GLP-1. La solubilidad y la estabilidad de estos análogos de glucagón de alta potencia puede mejorarse adicionalmente mediante la modificación de los polipéptidos mediante la pegilación, sustitución de aminoácidos de extremo de carboxi, o el agregado de un péptido de extremo de carboxi seleccionado del grupo formado por SEQ ID N°: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID N° 26 (K-RNRNNIA) y SEQ ID N° 28 (KRNR).

(página 2)

WO 2008/101017 A2

Publicado:

-- sin informe de búsqueda internacional y se republicará cuando se reciba ese informe.

-- con parte de la memoria descriptiva de listado de secuencias publicado por separado en forma electrónica y disponible a pedido de la Oficina Internacional

## GLUCAGON/GLP-1 RECEPTOR CO-AGONISTS

## CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to United States Provisional Patent Application No. 60/890,087 filed on February 15, 2007 and United States Provisional Patent Application No. 60/938,565 filed May 17, 2007. The subject matter disclosed in these provisional applications is hereby expressly incorporated by reference into the present application.

## BACKGROUND

Pre-proglucagon is a 158 amino acid precursor polypeptide that is processed in different tissues to form a number of different proglucagon-derived peptides, including glucagon, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), glucagon-like peptide-2 (GLP-2) and oxyntomodulin (OXM), that are involved in a wide variety of physiological functions, including glucose homeostasis, insulin secretion, gastric emptying, and intestinal growth, as well as the regulation of food intake. Glucagon is a 29-amino acid peptide that corresponds to amino acids 33 through 61 of pre-proglucagon, while GLP-1 is produced as a 37-amino acid peptide that corresponds to amino acids 72 through 108 of pre-proglucagon. GLP-1(7-36) amide or GLP-1(7-37)acid are biologically potent forms of GLP-1, that demonstrate essentially equivalent activity at the GLP-1 receptor.

Hypoglycemia occurs when blood glucose levels drops too low to provide enough energy for the body's activities. In adults or children older than 10 years, hypoglycemia is uncommon except as a side effect of diabetes treatment, but it can result from other medications or diseases, hormone or enzyme deficiencies, or tumors. When blood glucose begins to fall, glucagon, a hormone produced by the pancreas, signals the liver to break down glycogen and release glucose, causing blood glucose levels to rise toward a normal level. Thus, glucagon's general role in glucose regulation is to counteract the action of insulin and maintain blood glucose levels. However for diabetics, this glucagon response to hypoglycemia may be impaired, making it harder for glucose levels to return to the normal range.

Hypoglycemia is a life threatening event that requires immediate medical attention. The administration of glucagon is an established medication for treating acute hypoglycemia and it can restore normal levels of glucose within minutes of

administration. When glucagon is used in the acute medical treatment of hypoglycemia, a crystalline form of glucagon is solubilized with a dilute acid buffer and the solution is injected intramuscularly. While this treatment is effective, the methodology is cumbersome and dangerous for someone that is semi-conscious.

5 Accordingly, there is a need for a glucagon analog that maintains or exceeds the biological performance of the parent molecule but is sufficiently soluble and stable, under relevant physiological conditions, that it can be pre-formulated as a solution, ready for injection.

Additionally, diabetics are encouraged to maintain near normal blood glucose

10 levels to delay or prevent microvascular complications. Achievement of this goal usually requires intensive insulin therapy. In striving to achieve this goal, physicians have encountered a substantial increase in the frequency and severity of hypoglycemia in their diabetic patients. Accordingly, improved pharmaceuticals and methodologies are needed for treating diabetes that are less likely to induce

15 hypoglycemia than current insulin therapies.

GLP-1 has different biological activities compared to glucagon. Its actions include stimulation of insulin synthesis and secretion, inhibition of glucagon secretion, and inhibition of food intake. GLP-1 has been shown to reduce hyperglycemia (elevated glucose levels) in diabetics. Exendin-4, a peptide from

20 lizard venom that shares about 50% amino acid identity with GLP-1, activates the GLP-1 receptor and likewise has been shown to reduce hyperglycemia in diabetics.

There is also evidence that GLP-1 and exendin-4 may reduce food intake and promote weight loss, an effect that would be beneficial not only for diabetics but also for patients suffering from obesity. Patients with obesity have a higher risk of

25 diabetes, hypertension, hyperlipidemia, cardiovascular disease, and musculoskeletal diseases.

Accordingly, there remains a need for alternative and preferably improved methods for treating diabetes and obesity.

30 SUMMARY

As described herein, high potency glucagon agonists analogs are provided that also exhibit increased activity at the glucagon receptor, and in further embodiments exhibit enhanced biophysical stability and/or aqueous solubility. In addition, in

accordance with another aspect of the invention, glucagon agonist analogs are provided that have lost native glucagon's selectivity for the glucagon receptor versus the GLP-1 receptor, and thus represent co-agonists of those two receptors. Selected amino acid modifications within the glucagon analogs can control the relative activity of the analog at the GLP-1 receptor versus the glucagon receptor. Thus, yet another aspect of the invention provides glucagon co-agonist analogs that have higher activity at the glucagon receptor versus the GLP-1 receptor, glucagon co-agonist analogs that have approximately equivalent activity at both receptors, and glucagon co-agonist analogs that have higher activity at the GLP-1 receptor versus the glucagon receptor. The latter category of co-agonist can be engineered to exhibit little or no activity at the glucagon receptor, and yet retain ability to activate the GLP-1 receptor with the same or better potency than native GLP-1. Any of these analogs may also include modifications that confer enhanced biophysical stability and/or aqueous solubility.

Glucagon analogs that demonstrate co-agonism at the glucagon and GLP-1 receptors are advantageous for several applications. First of all the use of glucagon to treat hypoglycemia may overcompensate for low blood glucose levels and result in excess blood glucose levels. If a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is administered, the additional GLP-1 stimulation may buffer the glucagon agonist effect to prevent excessive glucose blood levels resulting from treatment of hypoglycemia.

In addition as described herein, glucagon co-agonist analogs of the invention may be used to control hyperglycemia, or to induce weight loss or prevent weight gain, when administered alone or in combination with other anti-diabetic or anti-obesity treatments. Another compound that induces weight loss is oxyntomodulin, a naturally occurring digestive hormone found in the small intestine (see Diabetes 2005; 54:2390-2395). Oxyntomodulin is a 37 amino acid peptide that contains the 29 amino acid sequence of glucagon (i.e. SEQ ID NO: 1) followed by an 8 amino acid carboxy terminal extension of SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA). While the present invention contemplates that glucagon analogs described herein may optionally be joined to this 8 amino acid carboxy terminal extension (SEQ ID NO: 27), the invention in some embodiments also specifically contemplates analogs and uses of analogs lacking the 8 contiguous carboxy amino acids of SEQ ID NO: 27.

The compounds can be customized by amino acid modifications to regulate the GLP-1 activity of the peptide, and thus the glucagon analogs of the present can be

tailored to treat a particular condition or disease. More particularly, glucagon analogs are provided herein wherein each analog displays a characteristic relative level of activity at the respective glucagon and GLP-1 receptors. For example, modifications can be made to each peptide to produce a glucagon peptide having anywhere from at least about 10% (including at least about 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%) to about 200% or higher activity at the GLP-1 receptor relative to native GLP-1 and anywhere from at least about 10% (including about 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%) to about 500% or higher activity at the glucagon receptor relative to native glucagon. The amino acid sequence of native glucagon is SEQ ID NO: 1, the amino acid sequence of GLP-1(7-36)amide is SEQ ID NO: 52, and the amino acid sequence of GLP-1(7-37)acid is SEQ ID NO: 50. In exemplary embodiments, a glucagon peptide may exhibit at least 10% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least 50% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor, or at least 40% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least 40% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor, or at least 60% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least 60% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor.

Selectivity of a glucagon peptide for the glucagon receptor versus the GLP-1 receptor can be described as the relative ratio of glucagon/GLP-1 activity (the peptide's activity at the glucagon receptor relative to native glucagon, divided by the peptide's activity at the GLP-1 receptor relative to native GLP-1). For example, a glucagon peptide that exhibits 60% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and 60% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor has a 1:1 ratio of glucagon/GLP-1 activity. Exemplary ratios of glucagon/GLP-1 activity include about 1:1, 1.5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 or 10:1, or about 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, or 1:1.5. As an example, a glucagon/GLP-1 activity ratio of 10:1 indicates a 10-fold selectivity for the glucagon receptor versus the GLP-1 receptor. Similarly, a GLP-1/glucagon activity ratio of 10:1 indicates a 10-fold selectivity for the GLP-1 receptor versus the glucagon receptor.

In accordance with one embodiment, analogs of glucagon are provided that have enhanced potency and optionally improved solubility and stability. In one embodiment, enhanced glucagon potency is provided by an amino acid modification

at position 16 of native glucagon (SEQ ID NO: 1). By way of nonlimiting example, such enhanced potency can be provided by substituting the naturally occurring serine at position 16 with glutamic acid or with another negatively charged amino acid having a side chain with a length of 4 atoms, or alternatively with any one of  
5 glutamine, homoglutamic acid, or homocysteic acid, or a charged amino acid having a side chain containing at least one heteroatom, (e.g. N, O, S, P) and with a side chain length of about 4 (or 3-5) atoms. In one embodiment the enhanced potency glucagon agonist comprises a peptide of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 or a glucagon agonist analog of SEQ ID  
10 NO: 5. In accordance with one embodiment a glucagon analog protein having enhanced potency at the glucagon receptor relative to wild type glucagon is provided wherein the peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10, wherein the glucagon peptide retains its selectivity for the glucagon receptor relative to the GLP-1 receptors.

15 Glucagon receptor activity can be reduced by an amino acid modification at position 3, e.g. substitution of the naturally occurring glutamine at position 3 with any amino acid. Substitution at this position with an acidic, basic, or a hydrophobic amino acid (glutamic acid, ornithine, norleucine) has been shown to substantially reduce or destroy glucagon receptor activity. In some embodiments the analogs have  
20 about 10% or less of the activity of native glucagon at the glucagon receptor, e.g. about 1-10%, or about 0.1-10%, or greater than about 0.1% but less than about 10%, while exhibiting at least 20% of the activity of GLP-1 at the GLP-1 receptor. For example, exemplary analogs described herein have about 0.5%, about 1% or about 7% of the activity of native glucagon, while exhibiting at least 20% of the activity of  
25 GLP-1 at the GLP-1 receptor.

In another embodiment analogs of glucagon are provided that have enhanced or retained potency at the glucagon receptor relative to the native glucagon peptide, but also have greatly enhanced activity at the GLP-1 receptor. Glucagon normally has about 1% of the activity of native-GLP-1 at the GLP-1 receptor, while GLP-1  
30 normally has less than about 0.01% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor. Enhanced activity at the GLP-1 receptor is provided by replacing the carboxylic acid of the C-terminal amino acid with a charge-neutral group, such as an amide or ester. In one embodiment, these glucagon analogs comprise a sequence of

SEQ ID NO: 20 wherein the carboxy terminal amino acid has an amide group in place of the carboxylic acid group found on the native amino acid. These glucagon analogs have strong activity at both the glucagon and GLP-1 receptors and thus act as co-agonists at both receptors. In accordance with one embodiment a glucagon and GLP-1 receptor co-agonist is provided wherein the peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 20, wherein the amino acid at position 28 is Asn or Lys and the amino acid at position 29 is Thr-amide.

Enhanced activity at the GLP-1 receptor is also provided by stabilizing the alpha-helix structure in the C-terminal portion of glucagon (around amino acids 12-29), through formation of an intramolecular bridge between the side chains of two amino acids that are separated by three intervening amino acids. In exemplary embodiments, the bridge or linker is about 8 (or about 7-9) atoms in length and forms between side chains of amino acids at positions 12 and 16, or at positions 16 and 20, or at positions 20 and 24, or at positions 24 and 28. The side chains of these amino acids can be linked to one another through hydrogen-bonding or ionic interactions, such as the formation of salt bridges, or by covalent bonds. In accordance with one embodiment a glucagon agonist is provided comprising a glucagon peptide of SEQ ID NO: 20, wherein a lactam ring is formed between the side chains of a lysine residue, located at position 12, 20 or 28, and a glutamic acid residue, located at position 16 or 24, wherein the two amino acids of the glucagon peptide whose side chains participate in forming the lactam ring are spaced from one another by three intervening amino acids. In accordance with one embodiment the lactam bearing glucagon analog comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18. In one embodiment the carboxy terminal amino acid of the lactam bearing peptide comprises an amide group or an ester group in place of the terminal carboxylic acid. In one embodiment a glucagon peptide of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, and SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18 further comprises an additional amino acid covalently bound to the carboxy terminus of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 18. In a further embodiment a glucagon peptide is provided comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:

66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 and SEQ ID NO: 69 further comprises an additional amino acid covalently bound to the carboxy terminus of SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 and SEQ ID NO: 69. In one embodiment the amino acid at position 28 is asparagine or lysine and the amino acid at position 29 is  
5 threonine.

Enhanced activity at the GLP-1 receptor is also provided by an amino acid modification at position 20. In one embodiment, the glutamine at position 20 is replaced with another hydrophilic amino acid having a side chain that is either charged or has an ability to hydrogen-bond, and is at least about 5 (or about 4-6)  
10 atoms in length, for example, lysine, citrulline, arginine, or ornithine.

Any of the modifications described above which increase or decrease glucagon receptor activity and which increase GLP-1 receptor activity can be applied individually or in combination. Combinations of the modifications that increase GLP-1 receptor activity generally provide higher GLP-1 activity than any of such  
15 modifications taken alone. For example, the invention provides glucagon analogs that comprise modifications at position 16, at position 20, and at the C-terminal carboxylic acid group, optionally with a covalent bond between the amino acids at positions 16 and 20; glucagon analogs that comprise modifications at position 16 and at the C-terminal carboxylic acid group; glucagon analogs that comprise modifications at  
20 positions 16 and 20, optionally with a covalent bond between the amino acids at positions 16 and 20; and glucagon analogs that comprise modifications at position 20 and at the C-terminal carboxylic acid group; optionally with the proviso that the amino acid at position 12 is not Arg; or optionally with the proviso that the amino acid at position 9 is not Glu.

Other modifications at position 1 or 2, as described herein, can increase the peptide's resistance to dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) cleavage. For example, the amino acid at position 2 may be substituted with D-serine, alanine, D-alanine, valine, glycine, N-methyl serine, N-methyl alanine, or amino isobutyric acid. Alternatively, or in addition, the amino acid at position 1 may be substituted with D-histidine,  
25 desaminohistidine, hydroxyl-histidine, acetyl-histidine, homo-histidine, N-methyl histidine, alpha-methyl histidine, imidazole acetic acid, or alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid (DMIA). It was observed that modifications at position 2 (e.g. AIB at position 2) and in some cases modifications at position 1 may reduce glucagon  
30



activity, sometimes significantly; surprisingly, this reduction in glucagon activity can be restored by a covalent bond between amino acids at positions 12 and 16, 16 and 20, or 20 and 24, e.g. a lactam bridge between a glutamic acid at position 16 and a lysine at position 20.

5 In yet further exemplary embodiments, any of the foregoing compounds can be further modified to improve stability by modifying the amino acid at position 15 of SEQ ID NO: 1 to reduce degradation of the peptide over time, especially in acidic or alkaline buffers.

In another embodiment the solubility of the glucagon peptides disclosed herein  
10 are enhanced by the covalent linkage of a hydrophilic moiety to the peptide. In one embodiment the hydrophilic moiety is a polyethylene glycol (PEG) chain, optionally linked to the peptide at one or more of positions 16, 17, 21, 24, 29, or the C-terminus. In some embodiments, the native amino acid at that position is substituted with an amino acid having a side chain suitable for crosslinking with hydrophilic moieties, to  
15 facilitate linkage of the hydrophilic moiety to the peptide. In other embodiments, an amino acid modified to comprise a hydrophilic group is added to the peptide at the C-terminus. In one embodiment the peptide co-agonist comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 and  
20 SEQ ID NO: 19 wherein the side chain of an amino acid residue at one of position 16, 17, 21 or 24 of said glucagon peptide further comprises a polyethylene glycol chain, having a molecular weight selected from the range of about 500 to about 40,000 Daltons. In one embodiment the polyethylene glycol chain has a molecular weight selected from the range of about 500 to about 5,000 Daltons. In another embodiment  
25 the polyethylene glycol chain has a molecular weight of about 10,000 to about 20,000 Daltons. In yet other exemplary embodiments the polyethylene glycol chain has a molecular weight of about 20,000 to about 40,000 Daltons.

In another embodiment the solubility of any of the preceding glucagon analogs can be improved by amino acid substitutions and/or additions that introduce a charged  
30 amino acid into the C-terminal portion of the peptide, preferably at a position C-terminal to position 27 of SEQ ID NO: 1. Optionally, one, two or three charged amino acids may be introduced within the C-terminal portion, preferably C-terminal to position 27. In accordance with one embodiment the native amino acid(s) at

positions 28 and/or 29 are substituted with a charged amino acids, and/or in a further embodiment one to three charged amino acids are also added to the C-terminus of the peptide. In exemplary embodiments, one, two or all of the charged amino acids are negatively charged. Additional modifications, e.g. conservative substitutions, may be made to the glucagon peptide that still allow it to retain glucagon activity. In one embodiment an analog of the peptide of SEQ ID NO: 20 is provided wherein the analog differs from SEQ ID NO: 20 by 1 to 2 amino acid substitutions at positions 17-26, and in one embodiment the analog differs from the peptide of SEQ ID NO: 20 by an amino acid substitution at position 20.

10 In accordance with one embodiment the glucagon peptides disclosed herein are modified by the addition of a second peptide to the carboxy terminus of the glucagon peptide, for example, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 or SEQ ID NO: 28. In one embodiment a glucagon peptide having a peptide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, and SEQ ID NO: 69 is covalently bound through a peptide bond to a second peptide, wherein the second peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28. In a further embodiment, in glucagon peptides which comprise the C-terminal extension, the threonine at position 29 of the native glucagon peptide is replaced with a glycine. A glucagon analog having a glycine substitution for threonine at position 29 and comprising the carboxy terminal extension of SEQ ID NO: 26 is four times as potent at the GLP-1 receptor as native glucagon modified to comprise the carboxy terminal extension of SEQ ID NO: 26. Potency at the GLP-1 receptor can be further enhanced by an alanine substitution for the native arginine at position 18.

Thus, as disclosed herein high potency glucagon analogs or glucagon co-agonist analogs are provided that also exhibit improved solubility and/or stability. An exemplary high potency glucagon analog exhibits at least about 200% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor, and optionally is soluble at a concentration of at least 1 mg/mL at a pH between 6 and 8 (e.g. pH 7), and optionally retains at least 95% of the original peptide (e.g. 5% or less of the original peptide is degraded or cleaved) after 24 hours at 25°C. As another example, an exemplary

glucagon co-agonist analog exhibits greater than about 40% or greater than about 60% activity at both the glucagon and the GLP-1 receptors (at a ratio between about 1:3 and 3:1, or between about 1:2 and 2:1), is optionally soluble at a concentration of at least 1 mg/mL at a pH between 6 and 8 (e.g. pH 7), and optionally retains at least 95% of the original peptide after 24 hours at 25°C. Another exemplary glucagon co-agonist analog exhibits about 175% or more of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and about 20% or less of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor, is optionally soluble at a concentration of at least 1 mg/mL at a pH between 6 and 8 (e.g. pH 7), and optionally retains at least 95% of the original peptide after 24 hours at 25°C. Yet another exemplary glucagon co-agonist analog exhibits about 10% or less of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least about 20% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor, is optionally soluble at a concentration of at least 1 mg/mL at a pH between 6 and 8 (e.g. pH 7), and optionally retains at least 95% of the original peptide after 24 hours at 25°C. Yet another exemplary glucagon co-agonist analog exhibits about 10% or less but above 0.1% , 0.5% or 1% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least about 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or 100% or more of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor, is optionally soluble at a concentration of at least 1 mg/mL at a pH between 6 and 8 (e.g. pH 7), and optionally retains at least 95% of the original peptide after 24 hours at 25°C. In some embodiments, such glucagon analogs retain at least 22, 23, 24, 25, 26, 27 or 28 of the naturally occurring amino acids at the corresponding positions in native glucagon (e.g. have 1-7, 1-5 or 1-3 modifications relative to naturally occurring glucagon).

Any one of the following peptides is excluded from the compounds of the invention, although further modifications thereto exhibiting the desired co-agonist activity, pharmaceutical compositions, kits, and treatment methods using such compounds may be included in the invention: The peptide of SEQ ID NO: 1 with an [Arg12] substitution and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Arg12,Lys20] substitutions and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Arg12,Lys24] substitutions and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Arg12,Lys29] substitutions and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with a [Glu9] substitution; The peptide of SEQ ID NO: 1 missing His1, with [Glu9, Glu16, Lys29] substitutions and C-terminal amide; The

peptide of SEQ ID NO: 1 with [Glu9, Glu16, Lys29] substitutions and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Lys13, Glu17] substitutions linked via lactam bridge and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Lys17, Glu21] substitutions linked via lactam bridge and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 missing His1, with [Glu20, Lys24] substitutions linked via lactam bridge.

In accordance with one embodiment a pharmaceutical composition is provided comprising any of the novel glucagon peptides disclosed herein, preferably sterile and preferably at a purity level of at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99%, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or excipient. Such compositions may contain a glucagon peptide at a concentration of at least 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml or higher. In one embodiment the pharmaceutical compositions comprise aqueous solutions that are sterilized and optionally stored within various containers. The compounds of the present invention can be used in accordance with one embodiment to prepare pre-formulated solutions ready for injection. In other embodiments the pharmaceutical compositions comprise a lyophilized powder. The pharmaceutical compositions can be further packaged as part of a kit that includes a disposable device for administering the composition to a patient. The containers or kits may be labeled for storage at ambient room temperature or at refrigerated temperature.

In accordance with one embodiment a method of rapidly increasing glucose level or treating hypoglycemia using a pre-formulated aqueous composition of glucagon peptides of the invention is provided. The method comprises the step of administering an effective amount of an aqueous solution comprising a novel modified glucagon peptide of the present disclosure. In one embodiment the glucagon peptide is pegylated at position 21 or 24 of the glucagon peptide and the PEG chain has a molecular weight of about 500 to about 5,000 Daltons. In one embodiment the modified glucagon solution is prepackaged in a device that is used to administer the composition to the patient suffering from hypoglycemia.

In accordance with one embodiment an improved method of regulating blood glucose levels in insulin dependent patients is provided. The method comprises the steps of administering insulin in an amount therapeutically effective for the control of diabetes and administering a novel modified glucagon peptide of the present

5 disclosure in an amount therapeutically effective for the prevention of hypoglycemia, wherein said administering steps are conducted within twelve hours of each other. In one embodiment the glucagon peptide and the insulin are co-administered as a single composition, wherein the glucagon peptide is pegylated with a PEG chain having a molecular weight selected from the range of about 5,000 to about 40,000 Daltons

10 In another embodiment a method is provided for inducing the temporary paralysis of the intestinal tract. The method comprises the step of administering one or more of the glucagon peptides disclosed herein to a patient.

In yet another embodiment a method of treating hyperglycemia, or a method of reducing weight gain or inducing weight loss is provided, which involves  
15 administering an effective amount of an aqueous solution comprising a glucagon peptide of the invention. In one embodiment either method comprises administering an effective amount of a composition comprising a glucagon agonist selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 and SEQ ID  
20 NO: 19. In another embodiment, the method comprises administering an effective amount of a composition comprising a glucagon agonist, wherein the glucagon agonist comprising a glucagon peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 66, SEQ ID  
25 NO: 67, SEQ ID NO: 68, and SEQ ID NO: 69, wherein amino acid 29 of the glucagon peptide is bound to a second peptide through a peptide bond, and said second peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 or SEQ ID NO: 28. In further embodiments, methods of treating diabetes involving co-administering a conventional dose or a reduced dose of insulin and a glucagon peptide of the  
30 invention are provided. Methods of treating diabetes with a glucagon peptide of the invention, without co-administering insulin are also provided.

In yet another aspect, the invention provides novel methods for treating hyperglycemia and novel methods for decreasing appetite or promoting body weight

loss that involve administration of a glucagon/GLP-1 co-agonist molecule (including pharmaceutically acceptable salts thereof) that activates both the glucagon receptor and the GLP-1 receptor. Agonism, i.e., activation, of both the glucagon and GLP-1 receptors provides an unexpected improvement compared to GLP-1 agonism alone in  
5 treating hyperglycemia. Thus, the addition of glucagon agonism provides an unexpected additive or synergistic effect, or other unexpected clinical benefit(s). Administration with a conventional dose of insulin, a reduced dose of insulin, or without insulin is contemplated according to such methods. Agonism of the glucagon receptor also has an unexpected beneficial effect compared to GLP-1 agonism alone  
10 in promoting weight loss or preventing weight gain.

Exemplary glucagon/GLP-1 co-agonist molecules include glucagon peptides of the invention, GLP-1 analogs that activate both GLP-1 and glucagon receptors, fusions of glucagon and GLP-1, or fusions of glucagon analogs and GLP-1 analogs, or chemically modified derivatives thereof. Alternatively, a compound that activates  
15 the glucagon receptor can be co-administered with a compound that activates the GLP-1 receptor (such as a GLP-1 analog, an exendin-4 analog, or derivatives thereof). The invention also contemplates co-administration of a glucagon agonist analog with a GLP-1 agonist analog.

Such methods for treating hyperglycemia and/or for decreasing appetite or  
20 promoting body weight loss include administration of a glucagon analog with a modification at position 12 (e.g. Arg12), optionally in combination with modifications at position 16 and/or 20. The methods of the invention also include administration of glucagon analogs comprising an intramolecular bridge between the side chains of two amino acids within the region of amino acids 12 and 29 that are separated by three  
25 intervening amino acids, e.g. positions 12 and 16, positions 13 and 17 (e.g., Lys13 Glu17 or Glu13 Lys17), positions 16 and 20, positions 17 and 21 (e.g. Lys17 Glu 21 or Glu17 Lys 21), positions 20 and 24, or positions 24 and 28, with the optional proviso that the amino acid at position 9 is not Glu, and optionally including a C-terminal amide or ester.

30 In accordance with one embodiment excluded from such glucagon/GLP-1 co-agonist molecules are any glucagon analogs or GLP-1 analogs in the prior art known to be useful in such a method. In another embodiment peptides described in U.S. Patent No. 6,864,069 as acting as both a GLP-1 agonist and a glucagon antagonist for

treating diabetes are also excluded as glucagon/GLP-1 co-agonist molecules. In another embodiment, excluded is the use of glucagon antagonists to treat diabetes, such as the antagonists described in Unson et al., *J. Biol. Chem.*, 264:789-794 (1989), Ahn et al., *J. Med. Chem.*, 44:3109-3116 (2001), and Sapse et al., *Mol. Med.*, 8(5):251-262 (2002). In a further embodiment oxyntomodulin or a glucagon analog that contains the 8 C-terminal amino acids of oxyntomodulin (SEQ ID NO: 27) are also excluded as glucagon/GLP-1 co-agonist molecules.

Such methods for treating hyperglycemia are expected to be useful for a variety of types of hyperglycemia, including diabetes, diabetes mellitus type I, diabetes mellitus type II, or gestational diabetes, either insulin-dependent or non-insulin-dependent, and reducing complications of diabetes including nephropathy, retinopathy and vascular disease. Such methods for reducing appetite or promoting loss of body weight are expected to be useful in reducing body weight, preventing weight gain, or treating obesity of various causes, including drug-induced obesity, and reducing complications associated with obesity including vascular disease (coronary artery disease, stroke, peripheral vascular disease, ischemia reperfusion, etc.), hypertension, onset of diabetes type II, hyperlipidemia and musculoskeletal diseases.

All therapeutic methods, pharmaceutical compositions, kits and other similar embodiments described herein contemplate that the use of the term glucagon analogs includes all pharmaceutically acceptable salts or esters thereof.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a bar graph representing the stability of Glucagon Cys<sup>21</sup>maleimidoPEG<sub>5K</sub> at 37°C incubated for 24, 48, 72, 96, 144 and 166 hours, respectively.

Fig. 2 represents data generated from HPLC analysis of Glucagon Cys<sup>21</sup>maleimidoPEG<sub>5K</sub> at pH 5 incubated at 37°C for 24, 72 or 144 hours, respectively.

Fig. 3 represents data showing receptor mediated cAMP induction by glucagon analogs. More particularly, Fig. 3A compares induction of the glucagon receptor by glucagon analogs E16, K20 ●, E15, E16 ▲, E16, K20 ▼, E15, E16 ◀, E16 ▶ and Gluc-NH<sub>2</sub> ■

Fig. 4A and 4B represents data showing receptor mediated cAMP induction by glucagon analogs. More particularly, Fig. 4A compares induction of the glucagon receptor by glucagon analogs Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E16Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, E3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▼, Orn3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ◀ and Nle3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▶ relative to native glucagon ■, whereas Fig. 4B compares induction of the GLP-1 receptor by glucagon analogs Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, E3, E16Gluc-NH<sub>2</sub> ▼, Orn3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ◀ and Nle3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▶ relative to native GLP-1 ■.

Fig. 5A and 5B represents data showing receptor mediated cAMP induction by glucagon analogs. More particularly, Fig. 5A compares induction of the glucagon receptor by glucagon analogs (E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> ●(5nM, stock solution), E15, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲(5nM, stock solution), E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> ▼(10nM, stock solution), E15, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ◀ (10nM, stock solution) and E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▶) relative to glucagon-NH<sub>2</sub> (■), whereas Fig. 5B compares induction of the GLP-1 receptor by glucagon analogs (E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E15, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, and E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▶) relative to GLP-1 (■) and glucagon-NH<sub>2</sub> (□).

Fig. 6A and 6B represents data showing receptor mediated cAMP induction by glucagon analogs. More particularly, Fig. 6A compares induction of the glucagon receptor by glucagon analogs (Gluc-NH<sub>2</sub> ●, K12E16-NH<sub>2</sub> lactam ▲, E16K20-NH<sub>2</sub> lactam ▼, K20E24-NH<sub>2</sub> lactam ◀ and E24K28-NH<sub>2</sub> lactam ▶) relative to glucagon (■), whereas Fig. 6B compares induction of the GLP-1 receptor by glucagon analogs (Gluc-NH<sub>2</sub> ●, K12E16-NH<sub>2</sub> lactam ▲, E16K20-NH<sub>2</sub> lactam ▼, K20E24-NH<sub>2</sub> lactam ◀ and E24K28-NH<sub>2</sub> lactam ▶) relative to GLP-1 (■).

Fig. 7A and 7B represents data showing receptor mediated cAMP induction by glucagon analogs. More particularly, Fig. 7A compares induction of the glucagon receptor by glucagon analogs (Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, K12, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> lactam ▼, E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> ◀ and E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> lactam ▶) relative to glucagon (■), whereas Fig. 7B compares induction of the GLP-1 receptor by glucagon analogs (Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, K12, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> lactam ▼, E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> ◀ and E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> lactam ▶) relative to GLP-1 (■).

Figs. 8A-8F represent data showing receptor mediated cAMP induction by glucagon analogs at the glucagon receptor (Figs. 8A, 8C and 8E) or the GLP-1 receptor (Figs. 8B, 8C and 8F) wherein hE = homoglutamic acid and hC = homocysteic acid.



Fig. 9A and 9B: represent data showing receptor mediated cAMP induction by GLP (17-26) glucagon analogs, wherein amino acid positions 17-26 of native glucagon (SEQ ID NO: 1) have been substituted with the amino acids of positions 17-26 of native GLP-1 (SEQ ID NO: 50). More particularly, Fig. 9A compares induction of the glucagon receptor by the designated GLP (17-26) glucagon analogs, and Fig. 9B compares induction of the GLP-1 receptor by the designated GLP (17-26) glucagon analogs.

Figs. 10A-E: are graphs providing *in vivo* data demonstrating the ability of the glucagon peptides of the present invention to induce weight loss in mice injected subcutaneously with the indicated amounts of the respective compounds. Sequence Identifiers for the glucagon peptide listed in Figs 10A -10E are as follows, for Fig. 10A: Chimera 2 Aib2 C24 40K PEG (SEQ ID NO: 486), Aib2 C24 Chimera 2 40K lactam (SEQ ID NO: 504) and Aib2 E16 K20 Gluc-NH2 Lac 40K (SEQ ID NO: 528); Fig. 10B: Aib2 C24 Chi 2 lactam 40K (SEQ ID NO: 504), DMIA1 C24 Chi 2 Lactam 40K (SEQ ID NO: 505), Chimera 2 DMIA1 C24 40K (SEQ ID NO: 519), and Chimera 2 Aib2 C24 40K (SEQ ID NO: 486), wherein the number at the end of the sequence designates the dosage used, either 70 or 350 nmol/kg; Fig. 10C: AIB2 w/ lactam C24 40K (SEQ ID NO: 504), AIB2 E16 K20 w/ lactam C24 40K (SEQ ID NO: 528), DMIA1 E16 K20 w/ lactam C24 40K (SEQ ID NO: 510), DMIA1 E16 K20 w/ lactam CEX 40K (SEQ ID NO: 513) and DMIA1 E16 K20 w/o lactam CEX 40K (SEQ ID NO: 529); Fig. 10D: AIB2 w lactam C24 40K (SEQ ID NO: 504), AIB2 E16 K20 w lactam C24 40K (SEQ ID NO: 528), DMIA1 E16 K20 w lactam C24 40K (SEQ ID NO: 510) and DMIA1 E16 K20 w lactam/Cex C24 40K (SEQ ID NO: 513), wherein the number at the end of the sequence designates the dosage used, either 14 or 70 nmol/kg/wk; Fig. 10E: AIB2 w/o lactam C24 40K (SEQ ID NO: 486), Chi 2 AIB2 C24 CEX 40K (SEQ ID NO: 533), AIB2 E16 A18 K20 C24 40K (SEQ ID NO: 492), AIB2 w/o lactam CEX G29 C40 40K (SEQ ID NO: 488), AIB2 w/o lactam CEX C40 C41-2 (SEQ ID NO: 532), AIB2 w/o lactam CEX C24 C40- 2 (SEQ ID NO: 531) and AIB2 w/o lactam C24 60K (SEQ ID NO: 498), wherein the designation 40K or 60K represents the molecular weight of the polyethylene chain attached to the glucagon peptide.

## DETAILED DESCRIPTION

### DEFINITIONS

In describing and claiming the invention, the following terminology will be  
5 used in accordance with the definitions set forth below.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" includes any of  
the standard pharmaceutical carriers, such as a phosphate buffered saline solution,  
water, emulsions such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of  
wetting agents. The term also encompasses any of the agents approved by a  
10 regulatory agency of the US Federal government or listed in the US Pharmacopeia for  
use in animals, including humans.

As used herein the term "pharmaceutically acceptable salt" refers to salts of  
compounds that retain the biological activity of the parent compound, and which are  
not biologically or otherwise undesirable. Many of the compounds disclosed herein  
15 are capable of forming acid and/or base salts by virtue of the presence of amino  
and/or carboxyl groups or groups similar thereto.

Pharmaceutically acceptable base addition salts can be prepared from  
inorganic and organic bases. Salts derived from inorganic bases, include by way of  
example only, sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium and magnesium salts.  
20 Salts derived from organic bases include, but are not limited to, salts of primary,  
secondary and tertiary amines.

Pharmaceutically acceptable acid addition salts may be prepared from  
inorganic and organic acids. Salts derived from inorganic acids include hydrochloric  
acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid, and the like. Salts  
25 derived from organic acids include acetic acid, propionic acid, glycolic acid, pyruvic  
acid, oxalic acid, malic acid, malonic acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid,  
tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, mandelic acid, methanesulfonic  
acid, ethanesulfonic acid, p-toluene-sulfonic acid, salicylic acid, and the like.

As used herein, the term "treating" includes prophylaxis of the specific  
30 disorder or condition, or alleviation of the symptoms associated with a specific  
disorder or condition and/or preventing or eliminating said symptoms. For example,  
as used herein the term "treating diabetes" will refer in general to altering glucose

blood levels in the direction of normal levels and may include increasing or decreasing blood glucose levels depending on a given situation.

As used herein an "effective" amount or a "therapeutically effective amount" of a glucagon peptide refers to a nontoxic but sufficient amount of the peptide to provide the desired effect. For example one desired effect would be the prevention or treatment of hypoglycemia, as measured, for example, by an increase in blood glucose level. An alternative desired effect for the co-agonist analogs of the present disclosure would include treating hyperglycemia, e.g., as measured by a change in blood glucose level closer to normal, or inducing weight loss/preventing weight gain, e.g., as measured by reduction in body weight, or preventing or reducing an increase in body weight, or normalizing body fat distribution. The amount that is "effective" will vary from subject to subject, depending on the age and general condition of the individual, mode of administration, and the like. Thus, it is not always possible to specify an exact "effective amount." However, an appropriate "effective" amount in any individual case may be determined by one of ordinary skill in the art using routine experimentation.

The term, "parenteral" means not through the alimentary canal but by some other route such as subcutaneous, intramuscular, intraspinal, or intravenous.

As used herein, the term "purified" and like terms relate to the isolation of a molecule or compound in a form that is substantially free of contaminants normally associated with the molecule or compound in a native or natural environment.

As used herein, the term "purified" does not require absolute purity; rather, it is intended as a relative definition. The term "purified polypeptide" is used herein to describe a polypeptide which has been separated from other compounds including, but not limited to nucleic acid molecules, lipids and carbohydrates.

The term "isolated" requires that the referenced material be removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring). For example, a naturally-occurring polynucleotide present in a living animal is not isolated, but the same polynucleotide, separated from some or all of the coexisting materials in the natural system, is isolated.

As used herein, the term "peptide" encompasses a sequence of 3 or more amino acids and typically less than 50 amino acids, wherein the amino acids are naturally occurring or non-naturally occurring amino acids. Non-naturally occurring

amino acids refer to amino acids that do not naturally occur in vivo but which, nevertheless, can be incorporated into the peptide structures described herein.

As used herein, the terms "polypeptide" and "protein" are terms that are used interchangeably to refer to a polymer of amino acids, without regard to the length of the polymer. Typically, polypeptides and proteins have a polymer length that is  
5 greater than that of "peptides."

A "glucagon peptide" as used herein includes any peptide comprising, either the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or any analog of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, including amino acid substitutions, additions, deletions or post  
10 translational modifications (e.g., methylation, acylation, ubiquitination, intramolecular covalent bonding such as lactam bridge formation, PEGylation, and the like) of the peptide, wherein the analog stimulates glucagon or GLP-1 receptor activity, e.g., as measured by cAMP production using the assay described in Example 14.

The term "glucagon agonist" refers to a complex comprising a glucagon  
15 peptide that stimulates glucagon receptor activity, e.g., as measured by cAMP production using the assay described in Example 14.

As used herein a "glucagon agonist analog" is a glucagon peptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 and SEQ ID NO: 15, or an analog  
20 of such a sequence that has been modified to include one or more conservative amino acid substitutions at one or more of positions 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 or 29.

As used herein an amino acid "modification" refers to a substitution, addition or deletion of an amino acid, and includes substitution with or addition of any of the  
25 20 amino acids commonly found in human proteins, as well as atypical or non-naturally occurring amino acids. Throughout the application, all references to a particular amino acid position by number (e.g. position 28) refer to the amino acid at that position in native glucagon (SEQ ID NO:1) or the corresponding amino acid position in any analogs thereof. For example, a reference herein to "position 28"  
30 would mean the corresponding position 27 for a glucagon analog in which the first amino acid of SEQ ID NO: 1 has been deleted. Similarly, a reference herein to "position 28" would mean the corresponding position 29 for a glucagon analog in which one amino acid has been added before the N-terminus of SEQ ID NO: 1.

Commercial sources of atypical amino acids include Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), ChemPep Inc. (Miami, FL), and Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA).

Atypical amino acids may be purchased from commercial suppliers, synthesized de novo, or chemically modified or derivatized from other amino acids.

5       As used herein a "glucagon co-agonist" is a glucagon peptide that exhibits activity at the glucagon receptor of at least about 10% to about 500% or more relative to native glucagon and also exhibits activity at the GLP-1 receptor of about at least 10% to about 200% or more relative to native GLP-1.

10       As used herein a "glucagon/GLP-1 co-agonist molecule" is a molecule that exhibits activity at the glucagon receptor of at least about 10% relative to native glucagon and also exhibits activity at the GLP-1 receptor of at least about 10% relative to native GLP-1.

15       As used herein the term "native glucagon" refers to a peptide consisting of the sequence of SEQ ID NO: 1, and the term "native GLP-1" is a generic term that designates GLP-1(7-36)amide (consisting of the sequence of SEQ ID NO: 52), GLP-1(7-37)acid (consisting of the sequence of SEQ ID NO: 50) or a mixture of those two compounds. As used herein, a general reference to "glucagon" or "GLP-1" in the absence of any further designation is intended to mean native glucagon or native GLP-1, respectively.

20       As used herein an amino acid "substitution" refers to the replacement of one amino acid residue by a different amino acid residue.

As used herein, the term "conservative amino acid substitution" is defined herein as exchanges within one of the following five groups:

- 25       I. Small aliphatic, nonpolar or slightly polar residues:  
Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;
- II. Polar, negatively charged residues and their amides and esters:  
Asp, Asn, Glu, Gln, cysteic acid and homocysteic acid;
- III. Polar, positively charged residues:  
His, Arg, Lys; Ornithine (Orn)
- 30       IV. Large, aliphatic, nonpolar residues:  
Met, Leu, Ile, Val, Cys, Norleucine (Nle), homocysteine
- V. Large, aromatic residues:

Phe, Tyr, Trp, acetyl phenylalanine

As used herein the general term "polyethylene glycol chain" or "PEG chain", refers to mixtures of condensation polymers of ethylene oxide and water, in a  
5 branched or straight chain, represented by the general formula  $H(OCH_2CH_2)_nOH$ , wherein n is at least 9. Absent any further characterization, the term is intended to include polymers of ethylene glycol with an average total molecular weight selected from the range of 500 to 40,000 Daltons. "polyethylene glycol chain" or "PEG chain"  
10 is used in combination with a numeric suffix to indicate the approximate average molecular weight thereof. For example, PEG-5,000 refers to polyethylene glycol chain having a total molecular weight average of about 5,000.

As used herein the term "pegylated" and like terms refers to a compound that has been modified from its native state by linking a polyethylene glycol chain to the compound. A "pegylated glucagon peptide" is a glucagon peptide that has a PEG  
15 chain covalently bound to the glucagon peptide.

As used herein a general reference to a peptide is intended to encompass peptides that have modified amino and carboxy termini. For example, an amino acid chain comprising an amide group in place of the terminal carboxylic acid is intended to be encompassed by an amino acid sequence designating the standard amino acids.  
20

As used herein a "linker" is a bond, molecule or group of molecules that binds two separate entities to one another. Linkers may provide for optimal spacing of the two entities or may further supply a labile linkage that allows the two entities to be separated from each other. Labile linkages include photocleavable groups, acid-labile moieties, base-labile moieties and enzyme-cleavable groups.

As used herein a "dimer" is a complex comprising two subunits covalently bound to one another via a linker. The term dimer, when used absent any qualifying language, encompasses both homodimers and heterodimers. A homodimer comprises two identical subunits, whereas a heterodimer comprises two subunits that differ, although the two subunits are substantially similar to one another.  
25

As used herein the term "charged amino acid" refers to an amino acid that comprises a side chain that is negatively charged (i.e., de-protonated) or positively charged (i.e., protonated) in aqueous solution at physiological pH. For example negatively charged amino acids include aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid,  
30

homocysteic acid, and homoglutamic acid, whereas positively charged amino acids include arginine, lysine and histidine. Charged amino acids include the charged amino acids among the 20 amino acids commonly found in human proteins, as well as atypical or non-naturally occurring amino acids.

- 5 As used herein the term "acidic amino acid" refers to an amino acid that comprises a second acidic moiety, including for example, a carboxylic acid or sulfonic acid group.

#### EMBODIMENTS

- 10 The invention provides glucagon peptides with increased or decreased activity at the glucagon receptor, or GLP-1 receptor, or both. The invention also provides glucagon peptides with altered selectivity for the glucagon receptor versus the GLP-1 receptor.

- Increased activity at the glucagon receptor is provided by an amino acid  
15 modification at position 16 of native glucagon (SEQ ID NO: 1) as described herein.

Reduced activity at the glucagon receptor is provided, e.g., by an amino acid modification at position 3 as described herein.

- Increased activity at the GLP-1 receptor is provided by replacing the  
carboxylic acid of the C-terminal amino acid with a charge-neutral group, such as an  
20 amide or ester.

Increased activity at the GLP-1 receptor is provided by modifications that permit formation of an intramolecular bridge between the side chains of two amino acids that are separated by three intervening amino acids, for example, positions 12 and 16, or 16 and 20, or 20 and 24, as described herein.

- 25 Increased activity at the GLP-1 receptor is provided by an amino acid modification at position 20 as described herein.

- Increased activity at the GLP-1 receptor is provided in glucagon analogs comprising the C-terminal extension of SEQ ID NO: 26. GLP-1 activity in such analogs comprising SEQ ID NO: 26 can be further increased by modifying the amino  
30 acid at position 18, 28 or 29, or at position 18 and 29, as described herein.

Restoration of glucagon activity which has been reduced by amino acid modifications at positions 1 and 2 is provided by a covalent bond between the side

chains of two amino acids that are separated by three intervening amino acids, for example, positions 12 and 16, or 16 and 20, or 20 and 24, as described herein.

A further modest increase in GLP-1 potency is provided by modifying the amino acid at position 10 to be Trp.

5 Any of the modifications described above which increase or decrease glucagon receptor activity and which increase GLP-1 receptor activity can be applied individually or in combination. Any of the modifications described above can also be combined with other modifications that confer other desirable properties, such as increased solubility and/or stability and/or duration of action. Alternatively, any of  
10 the modifications described above can be combined with other modifications that do not substantially affect solubility or stability or activity. Exemplary modifications include but are not limited to:

(A) Improving solubility, for example, by introducing one, two, three or more charged amino acid(s) to the C-terminal portion of native glucagon, preferably at a  
15 position C-terminal to position 27. Such a charged amino acid can be introduced by substituting a native amino acid with a charged amino acid, e.g. at positions 28 or 29, or alternatively by adding a charged amino acid, e.g. after position 27, 28 or 29. In exemplary embodiments, one, two, three or all of the charged amino acids are negatively charged. In other embodiments, one, two, three or all of the charged amino  
20 acids are positively charged. Such modifications increase solubility, e.g. provide at least 2-fold, 5-fold, 10-fold, 15-fold, 25-fold, 30-fold or greater solubility relative to native glucagon at a given pH between about 5.5 and 8, e.g., pH 7, when measured after 24 hours at 25°C.

(B) Increasing solubility and duration of action or half-life in circulation by  
25 addition of a hydrophilic moiety such as a polyethylene glycol chain, as described herein, e.g. at position 16, 17, 20, 21, 24 or 29, or at the C-terminus of the peptide.

(C) Increasing stability by modification of the aspartic acid at position 15, for example, by deletion or substitution with glutamic acid, homoglutamic acid, cysteic acid or homocysteic acid. Such modifications can reduce degradation or cleavage at a  
30 pH within the range of 5.5 to 8, for example, retaining at least 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the original peptide after 24 hours at 25°C.



(D) Increasing stability by modification of the amino acid at position 27, for example, by substitution with methionine, leucine or norleucine. Such modifications can reduce oxidative degradation.

(E) Increasing resistance to dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) cleavage by  
5 modification of the amino acid at position 1 or 2 as described herein.

(F) Conservative substitutions, additions or deletions that do not affect activity, for example, conservative substitutions at one or more of positions 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 or 29; or deletion of amino acid 29 optionally combined with a C-terminal amide or ester in place of the C-terminal  
10 carboxylic acid group;

(G) Adding C-terminal extensions as described herein;

(H) Homodimerization or heterodimerization as described herein.

In exemplary embodiments, the glucagon peptide may comprise a total of 1, up to 2, up to 3, up to 4, up to 5, up to 6, up to 7, up to 8, up to 9, or up to 10 amino  
15 acid modifications relative to the native glucagon sequence. .

One embodiment disclosed herein is directed to a glucagon agonist that has been modified relative to the wild type peptide of His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser- Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser- Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1) to enhance the peptide's potency at the glucagon  
20 receptor. Surprisingly, applicants have discovered that the normally occurring serine at position 16 of native glucagon (SEQ ID NO: 1) can be substituted with select acidic amino acids to enhance the potency of glucagon, in terms of its ability to stimulate cAMP synthesis in a validated *in vitro* model assay (see Example 14). More particularly, this substitution enhances the potency of the analog at least 2-fold, 4-  
25 fold, 5-fold, and up to 10-fold greater at the glucagon receptor. This substitution also enhances the analog's activity at the GLP-1 receptor at least 5-fold, 10-fold, or 15-fold relative to native glucagon, but selectivity is maintained for the glucagon receptor over the GLP-1 receptor.

In accordance with one embodiment the serine residue at position 16 of native  
30 glucagon is substituted with an amino acid selected from the group consisting of glutamic acid, glutamine, homoglutamic acid, homocysteic acid, threonine or glycine. In accordance with one embodiment the serine residue at position 16 of native glucagon is substituted with an amino acid selected from the group consisting of

glutamic acid, glutamine, homoglutamic acid and homocysteic acid, and in one embodiment the serine residue is substituted with glutamic acid. In one embodiment the glucagon peptide having enhanced specificity for the glucagon receptor comprises the peptide of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 or a glucagon agonist analog thereof, wherein the carboxy terminal amino acid retains its native carboxylic acid group. In accordance with one embodiment a glucagon agonist comprising the sequence of NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH (SEQ ID NO: 10) is provided, wherein the peptide exhibits approximately fivefold enhanced potency at the glucagon receptor, relative to native glucagon as measured by the *in vitro* cAMP assay of Example 14.

The glucagon peptides of the present invention can be further modified to improve the peptide's solubility and stability in aqueous solutions at physiological pH, while retaining the high biological activity relative to native glucagon. In accordance with one embodiment, introduction of hydrophilic groups at positions 17, 21, and 24 of the peptide of SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10 are anticipated to improve the solubility and stability of the high potency glucagon analog in solutions having a physiological pH. Introduction of such groups also increases duration of action, e.g. as measured by a prolonged half-life in circulation. Suitable hydrophilic moieties include any water soluble polymers known in the art, including PEG, homo- or co-polymers of PEG, a monomethyl-substituted polymer of PEG (mPEG), or polyoxyethylene glycerol (POG). In accordance with one embodiment the hydrophilic group comprises a polyethylene (PEG) chain. More particularly, in one embodiment the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 7 wherein a PEG chain is covalently linked to the side chains of amino acids present at positions 21 and 24 of the glucagon peptide and the carboxy terminal amino acid of the peptide has the carboxylic acid group.

The present disclosure also encompasses other conjugates in which glucagon peptides of the invention are linked, optionally via covalent bonding and optionally via a linker, to a conjugate. Linkage can be accomplished by covalent chemical bonds, physical forces such electrostatic, hydrogen, ionic, van der Waals, or hydrophobic or hydrophilic interactions. A variety of non-covalent coupling systems may be used, including biotin-avidin, ligand/receptor, enzyme/substrate, nucleic

acid/nucleic acid binding protein, lipid/lipid binding protein, cellular adhesion molecule partners; or any binding partners or fragments thereof which have affinity for each other.

Exemplary conjugates include but are not limited to a heterologous peptide or polypeptide (including for example, a plasma protein), a targeting agent, an immunoglobulin or portion thereof (e.g. variable region, CDR, or Fc region), a diagnostic label such as a radioisotope, fluorophore or enzymatic label, a polymer including water soluble polymers, or other therapeutic or diagnostic agents. In one embodiment a conjugate is provided comprising a glucagon peptide of the present invention and a plasma protein, wherein the plasma protein is selected from the group consisting of albumin, transferrin, fibrinogen and globulins. In one embodiment the plasma protein moiety of the conjugate is albumin or transferrin. In some embodiments, the linker comprises a chain of atoms from 1 to about 60, or 1 to 30 atoms or longer, 2 to 5 atoms, 2 to 10 atoms, 5 to 10 atoms, or 10 to 20 atoms long. In some embodiments, the chain atoms are all carbon atoms. In some embodiments, the chain atoms in the backbone of the linker are selected from the group consisting of C, O, N, and S. Chain atoms and linkers may be selected according to their expected solubility (hydrophilicity) so as to provide a more soluble conjugate. In some embodiments, the linker provides a functional group that is subject to cleavage by an enzyme or other catalyst or hydrolytic conditions found in the target tissue or organ or cell. In some embodiments, the length of the linker is long enough to reduce the potential for steric hindrance. If the linker is a covalent bond or a peptidyl bond and the conjugate is a polypeptide, the entire conjugate can be a fusion protein. Such peptidyl linkers may be any length. Exemplary linkers are from about 1 to 50 amino acids in length, 5 to 50, 3 to 5, 5 to 10, 5 to 15, or 10 to 30 amino acids in length. Such fusion proteins may alternatively be produced by recombinant genetic engineering methods known to one of ordinary skill in the art.

The present disclosure also encompasses glucagon fusion peptides or proteins wherein a second peptide or polypeptide has been fused to a terminus, e.g., the carboxy terminus of the glucagon peptide. More particularly, the fusion glucagon peptide may comprise a glucagon agonist of SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10 further comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) or SEQ ID NO: 28 (KRNR) linked

to amino acid 29 of the glucagon peptide. In one embodiment the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) or SEQ ID NO: 28 (KRNR) is bound to amino acid 29 of the glucagon peptide through a peptide bond. Applicants have discovered that in glucagon fusion peptides comprising the C-terminal extension peptide of Exendin-4 (e.g., SEQ ID NO: 26 or SEQ ID NO: 29), substitution of the native threonine residue at position 29 with glycine dramatically increases GLP-1 receptor activity. This amino acid substitution can be used in conjunction with other modifications disclosed herein to enhance the affinity of the glucagon analogs for the GLP-1 receptor. For example, the T29G substitution can be combined with the S16E and N20K amino acid substitutions, optionally with a lactam bridge between amino acids 16 and 20, and optionally with addition of a PEG chain as described herein. In one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided, comprising the sequence of SEQ ID NO: 64. In one embodiment the glucagon peptide portion of the glucagon fusion peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, and SEQ ID NO: 5 wherein a PEG chain, when present at positions 17, 21, 24, or the C-terminal amino acid, or at both 21 and 24, is selected from the range of 500 to 40,000 Daltons. More particularly, in one embodiment the glucagon peptide segment is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, and SEQ ID NO: 63, wherein the PEG chain is selected from the range of 500 to 5,000. In one embodiment the glucagon peptide is a fusion peptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 55 and SEQ ID NO: 65 wherein the peptide of SEQ ID NO: 65 is linked to the carboxy terminus of SEQ ID NO: 55.

In accordance with one embodiment, an additional chemical modification of the glucagon peptide of SEQ ID NO: 10 bestows increased GLP-1 receptor potency to a point where the relative activity at the glucagon and GLP-1 receptors is virtually equivalent. Accordingly, in one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided wherein the terminal amino acid of the glucagon peptides of the present invention have an amide group in place of the carboxylic acid group that is present on the native amino acid. The relative activity of the glucagon analog at the respective glucagon and GLP-1 receptors can be adjusted by further modifications to the glucagon peptide to produce analogs demonstrating about 40% to about 500% or more of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and about 20% to

about 200% or more of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor, e.g. 50-fold, 100-fold or more increase relative to the normal activity of glucagon at the GLP-1 receptor

In a further embodiment glucagon analogs are provided that exhibit  
 5 glucagon/GLP-1 receptor co-agonist activity wherein an intramolecular bridge is formed between two amino acid side chains to stabilize the three dimensional structure of the carboxy terminus of the peptide. More particularly, the side chains of the amino acid pairs 12 and 16, 16 and 20, 20 and 24 or 24 and 28 are linked to one another and thus stabilize the glucagon alpha helix. The two side chains can be linked  
 10 to one another through hydrogen-bonding, ionic interactions, such as the formation of salt bridges, or by covalent bonds. In some embodiments, the size of the ring or linker is about 8 atoms, or about 7-9 atoms.

Examples of amino acid pairings that are capable of covalently bonding to form a seven-atom linking bridge include Orn-Glu (lactam ring); Lys-Asp (lactam); or  
 15 Homoser-Homoglu (lactone). Examples of amino acid pairings that may form an eight-atom linker include Lys-Glu (lactam); Homolys-Asp (lactam); Orn-Homoglu (lactam); 4-aminoPhe-Asp (lactam); or Tyr-Asp (lactone). Examples of amino acid pairings that may form a nine-atom linker include Homolys-Glu (lactam); Lys-Homoglu (lactam); 4-aminoPhe-Glu (lactam); or Tyr-Glu (lactone). Any of the side  
 20 chains on these amino acids may additionally be substituted with additional chemical groups, so long as the three-dimensional structure of the alpha-helix is not disrupted. One of ordinary skill in the art can envision alternative pairings or alternative amino acid analogs, including chemically modified derivatives, that would create a stabilizing structure of similar size and desired effect. For example, a homocysteine-homocysteine disulfide bridge is 6 atoms in length and may be further modified to  
 25 provide the desired effect. Even without covalent linkage, the amino acid pairings described above or similar pairings that one of ordinary skill in the art can envision may also provide added stability to the alpha-helix through non-covalent bonds, for example, through formation of salt bridges or hydrogen-bonding interactions.

30 Further exemplary embodiments include the following pairings, optionally with a lactam bridge: Glu at position 12 with Lys at position 16; native Lys at position 12 with Glu at position 16; Glu at position 16 with Lys at position 20; Lys at position 16 with Glu at position 20; Glu at position 20 with Lys at position 24; Lys at position

20 with Glu at position 24; Glu at position 24 with Lys at position 28; Lys at position 24 with Glu at position 28.

In accordance with one embodiment a glucagon analog is provided that exhibits glucagon/GLP-1 receptor co-agonist activity wherein the analog comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, 47, 48 and 49. In one embodiment the side chains are covalently bound to one another, and in one embodiment the two amino acids are bound to one another to form a lactam ring. The size of the lactam ring can vary depending on the length of the amino acid side chains, and in one embodiment the lactam is formed by linking the side chains of a lysine amino acid to a glutamic acid side chain.

The order of the amide bond in the lactam ring can be reversed (e.g., a lactam ring can be formed between the side chains of a Lys12 and a Glu16 or alternatively between a Glu 12 and a Lys16). In accordance with one embodiment a glucagon analog of SEQ ID NO: 45 is provided wherein at least one lactam ring is formed between the side chains of an amino acid pair selected from the group consisting of amino acid pairs 12 and 16, 16 and 20, 20 and 24 or 24 and 28. In one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided wherein the co-agonist comprises a glucagon peptide analog of SEQ ID NO: 20 wherein the peptide comprises an intramolecular lactam bridge formed between amino acid positions 12 and 16 or between amino acid positions 16 and 20. In one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided comprising the sequence of SEQ ID NO: 20, wherein an intramolecular lactam bridge is formed between amino acid positions 12 and 16, between amino acid positions 16 and 20, or between amino acid positions 20 and 24 and the amino acid at position 29 is glycine, wherein the sequence of SEQ ID NO: 29 is linked to the C-terminal amino acid of SEQ ID NO: 20. In a further embodiment the amino acid at position 28 is aspartic acid.

The solubility of the glucagon peptide of SEQ ID NO: 20 can be further improved, for example, by introducing one, two, three or more charged amino acid(s) to the C-terminal portion of glucagon peptide of SEQ ID NO: 20, preferably at a position C-terminal to position 27. Such a charged amino acid can be introduced by substituting a native amino acid with a charged amino acid, e.g. at positions 28 or 29, or alternatively by adding a charged amino acid, e.g. after position 27, 28 or 29. In exemplary embodiments, one, two, three or all of the charged amino acids are

negatively charged. Alternatively, solubility can also be enhanced by covalently linking hydrophilic moieties, such as polyethylene glycol, to the peptide.

In accordance with one embodiment, a glucagon analog is provided comprising the sequence of SEQ ID NO: 55, wherein said analog differs from SEQ ID NO: 55 by 1 to 3 amino acids, selected from positions 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28, and 29, wherein said glucagon peptide exhibits at least 20% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor.

In accordance with one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided comprising the sequence:

10 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 33) wherein the Xaa at position 15 is selected from the group of amino acids consisting of Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid and homocysteic acid, Xaa at position 16 is selected from the group of amino acids consisting of Ser, Glu, Gln, homoglutamic acid and homocysteic acid, the Xaa at position 20 is Gln or Lys, the Xaa at position 24 is Gln or Glu, the Xaa at position 28 is Asn, Lys or an acidic amino acid, the Xaa at position 29 is Thr, Gly or an acidic amino acid, and R is COOH or CONH<sub>2</sub>, with the proviso that when position 16 is serine, position 20 is Lys, or alternatively when position 16 is serine the position 24 is Glu and either position 20 or position 28 is Lys.

20 In one embodiment the glucagon/GLP-1 receptor co-agonist comprises the sequence of SEQ ID NO: 33 wherein the amino acid at position 28 is aspartic acid and the amino acid at position 29 is glutamic acid. In another embodiment the amino acid at position 28 is the native asparagine, the amino acid at position 29 is glycine and the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 or SEQ ID NO: 65 is covalently linked to the

25 carboxy terminus of SEQ ID NO: 33.

In one embodiment a co-agonist is provided comprising the sequence of SEQ ID NO: 33 wherein an additional acidic amino acid added to the carboxy terminus of the peptide. In a further embodiment the carboxy terminal amino acid of the glucagon analog has an amide in place of the carboxylic acid group of the natural amino acid.

30 In one embodiment the glucagon analog comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 and SEQ ID NO: 44.

In accordance with one embodiment a glucagon peptide analog of SEQ ID NO: 33 is provided, wherein said analog differs from SEQ ID NO: 33 by 1 to 3 amino acids, selected from positions 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21 and 27, with the proviso that when the amino acid at position 16 is serine, either position 20 is lysine, or a lactam bridge is formed between the amino acid at position 24 and either the amino acid at position 20 or position 28. In accordance with one embodiment the analog differs from SEQ ID NO: 33 by 1 to 3 amino acids selected from positions 1, 2, 3, 21 and 27. In one embodiment the glucagon peptide analog of SEQ ID NO: 33 differs from that sequence by 1 to 2 amino acids, or in one embodiment by a single amino acid, selected from positions 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21 and 27, with the proviso that when the amino acid at position 16 is serine, either position 20 is lysine, or a lactam bridge is formed between the amino acid at position 24 and either the amino acid at position 20 or position 28.

In accordance with another embodiment a relatively selective GLP-1 receptor agonist is provided comprising the sequence NH<sub>2</sub>-His-Ser-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 53) wherein the Xaa at position 3 is selected from the group of amino acids consisting of Glu, Orn or Nle, the Xaa at position 15 is selected from the group of amino acids consisting of Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid and homocysteic acid, Xaa at position 16 is selected from the group of amino acids consisting of Ser, Glu, Gln, homoglutamic acid and homocysteic acid, the Xaa at position 20 is Gln or Lys, the Xaa at position 24 is Gln or Glu, the Xaa at position 28 is Asn, Lys or an acidic amino acid, the Xaa at position 29 is Thr, Gly or an acidic amino acid, and R is COOH, CONH<sub>2</sub>, SEQ ID NO: 26 or SEQ ID NO: 29, with the proviso that when position 16 is serine, position 20 is Lys, or alternatively when position 16 is serine the position 24 is Glu and either position 20 or position 28 is Lys. In one embodiment the amino acid at position 3 is glutamic acid. In one embodiment the acidic amino acid substituted at position 28 and/or 29 is aspartic acid or glutamic acid. In one embodiment the glucagon peptide, including a co-agonist peptide, comprises the sequence of SEQ ID NO: 33 further comprising an additional acidic amino acid added to the carboxy terminus of the peptide. In a further embodiment the carboxy terminal amino acid of the glucagon analog has an amide in place of the carboxylic acid group of the natural amino acid.



In accordance with one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided comprising a modified glucagon peptide selected from the group consisting of:

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-  
5 Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 34); wherein  
the Xaa at position 15 is selected from the group of amino acids consisting of Asp,  
Glu, cysteic acid, homoglutamic acid and homocysteic acid, Xaa at position 16 is  
selected from the group of amino acids consisting of Ser, Glu, Gln, homoglutamic  
acid and homocysteic acid, the Xaa at position 20 is Gln or Lys, the Xaa at position  
10 24 is Gln or Glu and the Xaa at position 28 is Asn, Asp or Lys, R is COOH or  
CONH<sub>2</sub>, the Xaa at position 29 is Thr or Gly, and R is COOH, CONH<sub>2</sub>, SEQ ID NO:  
26 or SEQ ID NO: 29, with the proviso that when position 16 is serine, position 20 is  
Lys, or alternatively when position 16 is serine the position 24 is Glu and either  
position 20 or position 28 is Lys. In one embodiment R is CONH<sub>2</sub>, the Xaa at  
15 position 15 is Asp, the Xaa at position 16 is selected from the group of amino acids  
consisting of Glu, Gln, homoglutamic acid and homocysteic acid, the Xaas at  
positions 20 and 24 are each Gln the Xaa at position 28 is Asn or Asp and the Xaa at  
position 29 is Thr. In one embodiment the Xaas at positions 15 and 16 are each Glu,  
the Xaas at positions 20 and 24 are each Gln, the Xaa at position 28 is Asn or Asp, the  
20 Xaa at position 29 is Thr and R is CONH<sub>2</sub>.

It has been reported that certain positions of the native glucagon peptide can  
be modified while retaining at least some of the activity of the parent peptide.  
Accordingly, applicants anticipate that one or more of the amino acids located at  
positions at positions 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 or 29 of  
25 the peptide of SEQ ID NO: 11 can be substituted with an amino acid different from  
that present in the native glucagon peptide, and still retain activity at the glucagon  
receptor. In one embodiment the methionine residue present at position 27 of the  
native peptide is changed to leucine or norleucine to prevent oxidative degradation of  
the peptide. In another embodiment the amino acid at position 20 is substituted with  
30 Lys, Arg, Orn or Citrulline and/or position 21 is substituted with Glu, homoglutamic  
acid or homocysteic acid.

In one embodiment a glucagon analog of SEQ ID NO: 20 is provided wherein  
1 to 6 amino acids, selected from positions 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 27,

28 or 29 of the analog differ from the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 1, with the proviso that when the amino acid at position 16 is serine, position 20 is Lys, or alternatively when position 16 is serine the position 24 is Glu and either position 20 or position 28 is Lys. In accordance with another embodiment a glucagon analog of SEQ ID NO: 20 is provided wherein 1 to 3 amino acids selected from positions 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 27, 28 or 29 of the analog differ from the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 1. In another embodiment, a glucagon analog of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 11 is provided wherein 1 to 2 amino acids selected from positions 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20 or 21 of the analog differ from the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 1, and in a further embodiment the one to two differing amino acids represent conservative amino acid substitutions relative to the amino acid present in the native glucagon sequence (SEQ ID NO: 1). In one embodiment a glucagon peptide of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO: 15 is provided wherein the glucagon peptide further comprises one, two or three amino acid substitutions at positions selected from positions 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 27 or 29. In one embodiment the substitutions at positions 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 27 or 29 are conservative amino acid substitutions.

In accordance with one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided comprising a variant of the sequence of SEQ ID NO 33, wherein 1 to 10 amino acids selected from positions 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 27, 28 and 29, respectively, of the variant differ from the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 1. In accordance with one embodiment a variant of the sequence of SEQ ID NO 33 is provided wherein the variant differs from SEQ ID NO: 33 by one or more amino acid substitutions selected from the group consisting of Gln17, Ala18, Glu21, Ile23, Ala24, Val27 and Gly29. In accordance with one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided comprising variants of the sequence of SEQ ID NO 33, wherein 1 to 2 amino acids selected from positions 17-26 of the variant differ from the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 1. In accordance with one embodiment a variant of the sequence of SEQ ID NO 33 is provided wherein the variant differs from SEQ ID NO: 33 by an amino acid substitution selected from the group consisting of Gln17, Ala18, Glu21, Ile23 and Ala24. In accordance with one embodiment a variant of the sequence of SEQ ID NO 33 is provided wherein the

variant differs from SEQ ID NO: 33 by an amino acid substitution at position 18 wherein the substituted amino acid is selected from the group consisting of Ala, Ser, Thr, Pro and Gly. In accordance with one embodiment a variant of the sequence of SEQ ID NO 33 is provided wherein the variant differs from SEQ ID NO: 33 by an amino acid substitution of Ala at position 18. Such variations are encompassed by SEQ ID NO: 55. In another embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided comprising variants of the sequence of SEQ ID NO 33, wherein 1 to 2 amino acids selected from positions 17-22 of the variant differ from the corresponding amino acid of SEQ ID NO: 1, and in a further embodiment a variant of SEQ ID NO 33 is provided wherein the variant differs from SEQ ID NO: 33 by 1 or 2 amino acid substitutions at positions 20 and 21. In accordance with one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided comprising the sequence: NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 51), wherein the Xaa at position 15 is Asp, Glu, cysteic acid, homoglutamic acid or homocysteic acid, the Xaa at position 16 is Ser, Glu, Gln, homoglutamic acid or homocysteic acid, the Xaa at position 20 is Gln, Lys, Arg, Orn or citrulline, the Xaa at position 21 is Asp, Glu, homoglutamic acid or homocysteic acid, the Xaa at position 24 is Gln or Glu, the Xaa at position 28 is Asn, Lys or an acidic amino acid, the Xaa at position 29 is Thr or an acid amino acid and R is COOH or CONH<sub>2</sub>. In one embodiment R is CONH<sub>2</sub>. In accordance with one embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided comprising a variant of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 or SEQ ID NO: 49, wherein the variant differs from said sequence by an amino acid substitution at position 20. In one embodiment the amino acid substitution is selected from the group consisting of Lys, Arg, Orn or citrulline for position 20.

In one embodiment a glucagon agonist is provided comprising an analog peptide of SEQ ID NO: 34 wherein the analog differs from SEQ ID NO: 34 by having an amino acid other than serine at position 2. In one embodiment the serine residue is substituted with aminoisobutyric acid or alanine, and in one embodiment the serine residue is substituted with aminoisobutyric acid. Such modifications suppresses cleavage by dipeptidyl peptidase IV while retaining the inherent potency of the parent

39

compound (e.g. at least 75, 80, 85, 90, 95% or more of the potency of the parent compound). In one embodiment the solubility of the analog is increased, for example, by introducing one, two, three or more charged amino acid(s) to the C-terminal portion of native glucagon, preferably at a position C-terminal to position 27. In  
5 exemplary embodiments, one, two, three or all of the charged amino acids are negatively charged. In another embodiment the analog further comprises an acidic amino acid substituted for the native amino acid at position 28 or 29 or an acidic amino acid added to the carboxy terminus of the peptide of SEQ ID NO: 34.

In one embodiment the glucagon analogs disclosed herein are further modified  
10 at position 1 or 2 to reduce susceptibility to cleavage by dipeptidyl peptidase IV. In one embodiment a glucagon analog of SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO: 15 is provided wherein the analog differs from the parent molecule by a substitution at position 2 and exhibits reduced susceptibility (i.e. resistance) to cleavage by dipeptidyl peptidase IV. More  
15 particularly, in one embodiment position 2 of the analog peptide is substituted with an amino acid selected from the group consisting of d-serine, alanine, valine, amino n-butyric acid, glycine, N-methyl serine and aminoisobutyric acid. In one embodiment position 2 of the analog peptide is substituted with an amino acid selected from the group consisting of d-serine, alanine, glycine, N-methyl serine and aminoisobutyric  
20 acid. In another embodiment position 2 of the analog peptide is substituted with an amino acid selected from the group consisting of d-serine, glycine, N-methyl serine and aminoisobutyric acid. In one embodiment the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 21 or SEQ ID NO: 22.

In one embodiment a glucagon analog of SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11,  
25 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO: 15 is provided wherein the analog differs from the parent molecule by a substitution at position 1 and exhibits reduced susceptibility (i.e. resistance) to cleavage by dipeptidyl peptidase IV. More particularly, position 1 of the analog peptide is substituted with an amino acid selected from the group consisting of d-histidine, alpha, alpha-dimethyl imidazole  
30 acetic acid (DMIA), N-methyl histidine, alpha-methyl histidine, imidazole acetic acid, desaminohistidine, hydroxyl-histidine, acetyl-histidine and homo-histidine. In another embodiment a glucagon agonist is provided comprising an analog peptide of SEQ ID NO: 34 wherein the analog differs from SEQ ID NO: 34 by having an amino

acid other than histidine at position 1. In one embodiment the solubility of the analog is increased, for example, by introducing one, two, three or more charged amino acid(s) to the C-terminal portion of native glucagon, preferably at a position C-terminal to position 27. In exemplary embodiments, one, two, three or all of the charged amino acids are negatively charged. In another embodiment the analog further comprises an acidic amino acid substituted for the native amino acid at position 28 or 29 or an acidic amino acid added to the carboxy terminus of the peptide of SEQ ID NO: 34. In one embodiment the acidic amino acid is aspartic acid or glutamic acid.

10 In one embodiment the glucagon/GLP-1 receptor co-agonist comprises a sequence of SEQ ID NO: 20 further comprising an additional carboxy terminal extension of one amino acid or a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28. In the embodiment wherein a single amino acid is added to the carboxy terminus of SEQ ID NO: 20, the amino acid is typically selected from one of the 20 common amino acids, and in one embodiment the additional carboxy terminus amino acid has an amide group in place of the carboxylic acid of the native amino acid. In one embodiment the additional amino acid is selected from the group consisting of glutamic acid, aspartic acid and glycine.

In an alternative embodiment a glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is provided wherein the peptide comprises at least one lactam ring formed between the side chain of a glutamic acid residue and a lysine residue, wherein the glutamic acid residue and a lysine residue are separated by three amino acids. In one embodiment the carboxy terminal amino acid of the lactam bearing glucagon peptide has an amide group in place of the carboxylic acid of the native amino acid. More particularly, in one embodiment a glucagon and GLP-1 co-agonist is provided comprising a modified glucagon peptide selected from the group consisting of:

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 66)

30 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 67)

35 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 68)

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Lys-Xaa-R (SEQ ID NO: 69)

5 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 16)

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 17)

10 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 18)

wherein Xaa at position 28 = Asp, or Asn, the Xaa at position 29 is Thr or Gly, R is selected from the group consisting of COOH, CONH<sub>2</sub>, glutamic acid, aspartic acid, 15 glycine, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28, and a lactam bridge is formed between Lys at position 12 and Glu at position 16 for SEQ ID NO: 66, between Glu at position 16 and Lys at position 20 for SEQ ID NO: 67, between Lys at position 20 and Glu at position 24 for SEQ ID NO: 68, between Glu at position 24 and Lys at position 28 for SEQ ID NO: 69, between Lys at position 12 and Glu at 20 position 16 and between Lys at position 20 and Glu at position 24 for SEQ ID NO: 16, between Lys at position 12 and Glu at position 16 and between Glu at position 24 and Lys at position 28 for SEQ ID NO: 17 and between Glu at position 16 and Lys at position 20 and between Glu at position 24 and Lys at position 28 for SEQ ID NO: 18. In one embodiment R is selected from the group consisting of COOH, CONH<sub>2</sub>, 25 glutamic acid, aspartic acid, glycine, the amino acid at position 28 is Asn, and the amino acid at position 29 is threonine. In one embodiment R is CONH<sub>2</sub>, the amino acid at position 28 is Asn and the amino acid at position 29 is threonine. In another embodiment R is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 and SEQ ID NO: 65 and the amino acid at position 29 is glycine.

30 In a further embodiment the glucagon/GLP-1 receptor co-agonist is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18, wherein the peptide further comprises an additional carboxy terminal extension of one amino acid or a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, SEQ 35 ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28. In one embodiment the terminal extension comprises the sequence of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 or SEQ ID NO: 65 and the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 55. In one embodiment the

glucagon/GLP-1 receptor co-agonist comprises the sequence of SEQ ID NO: 33 wherein the amino acid at position 16 is glutamic acid, the amino acid at position 20 is lysine, the amino acid at position 28 is asparagine and the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 or SEQ ID NO: 29 is linked to the carboxy terminus of SEQ ID NO:

5 33.

In the embodiment wherein a single amino acid is added to the carboxy terminus of SEQ ID NO: 20, the amino acid is typically selected from one of the 20 common amino acids, and in one embodiment the amino acid has an amide group in place of the carboxylic acid of the native amino acid. In one embodiment the additional amino acid is selected from the group consisting of glutamic acid and aspartic acid and glycine. In the embodiments wherein the glucagon agonist analog further comprises a carboxy terminal extension, the carboxy terminal amino acid of the extension, in one embodiment, ends in an amide group or an ester group rather than a carboxylic acid.

15 In another embodiment the glucagon/GLP-1 receptor co-agonist comprises the sequence: NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Xaa-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 19), wherein the Xaa at position 30 represents any amino acid. In one embodiment Xaa is selected from one of the 20 common amino acids, and in one embodiment the amino acid is glutamic acid, aspartic acid or glycine. The solubility of this peptide can be further improved by covalently linking a PEG chain to the side chain of amino acid at position 17, 21, 24 or 30 of SEQ ID NO: 19. In a further embodiment the peptide comprises an additional carboxy terminal extension of a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28. In accordance with one embodiment the glucagon/GLP-1 receptor co-agonist comprises the sequence of SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 and SEQ ID NO: 32.

30 Additional site specific modifications internal to the glucagon sequence of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 and SEQ ID NO: 64 can be made to yield a set of glucagon agonists that possess variable degrees of GLP-1 agonism. Accordingly, peptides that possess virtually identical *in vitro* potency at each receptor have been prepared and characterized. Similarly, peptides

with tenfold selectively enhanced potency at each of the two receptors have been identified and characterized. As noted above substitution of the serine residue at position 16 with glutamic acid enhances the potency of native glucagon at both the Glucagon and GLP-1 receptors, but maintains approximately a tenfold selectivity for the glucagon receptor. In addition by substituting the native glutamine at position 3 with glutamic acid (SEQ ID NO: 22) generates a glucagon analog that exhibits approximately a tenfold selectivity for the GLP-1 receptor.

The solubility of the glucagon/GLP-1 co-agonist peptides can be further enhanced in aqueous solutions at physiological pH, while retaining the high biological activity relative to native glucagon by the introduction of hydrophilic groups at positions 16, 17, 21, and 24 of the peptide, or by the addition of a single modified amino acid (i.e. an amino acid modified to comprise a hydrophilic group) at the carboxy terminus of the glucagon/GLP-1 co-agonist peptide. In accordance with one embodiment the hydrophilic group comprises a polyethylene (PEG) chain. More particularly, in one embodiment the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 18 wherein a PEG chain is covalently linked to the side chain of an amino acids at position 16, 17, 21, 24, 29 or the C-terminal amino acid of the glucagon peptide, with the proviso that when the peptide comprises SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 13 the polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 17, 21 or 24, when the peptide comprises SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO: 15 the polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 16, 17 or 21, and when the peptide comprises SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 18 the polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 17 or 21.

In one embodiment the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 13, wherein a PEG chain is covalently linked to the side chain of an amino acids at position 17, 21, 24, or the C-terminal amino acid of the glucagon peptide, and the carboxy terminal amino acid of the peptide has an amide group in place of the carboxylic acid group of the native amino acid. In one embodiment the glucagon/GLP-1 receptor co-agonist peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13,



SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 19, wherein a PEG chain is covalently linked to the side chain of an amino acid at position 17, 21 or 24 of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 and SEQ ID NO: 19, or at position 16, 17 or 21 of SEQ ID NO: 14 and SEQ ID NO: 15 or at position 17 or 21 of SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18 of the glucagon peptide. In another embodiment the glucagon/GLP-1 receptor co-agonist peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 19, wherein a PEG chain is covalently linked to the side chain of an amino acids at position 17, 21 or 24 or the C-terminal amino acid of the glucagon peptide.

10 In accordance with one embodiment, and subject to the proviso limitations described in the preceding paragraphs, the glucagon co-agonist peptide is modified to contain one or more amino acid substitution at positions 16, 17, 21, 24, or 29 or the C-terminal amino acid, wherein the native amino acid is substituted with an amino acid having a side chain suitable for crosslinking with hydrophilic moieties, including for example, PEG. The native peptide can be substituted with a naturally occurring amino acid or a synthetic (non-naturally occurring) amino acid. Synthetic or non-naturally occurring amino acids refer to amino acids that do not naturally occur *in vivo* but which, nevertheless, can be incorporated into the peptide structures described herein. Alternatively, the amino acid having a side chain suitable for crosslinking with hydrophilic moieties, including for example, PEG, can be added to the carboxy terminus of any of the glucagon analogs disclosed herein. In accordance with one embodiment an amino acid substitution is made in the glucagon/GLP-1 receptor co-agonist peptide at a position selected from the group consisting of 16, 17, 21, 24, or 29 replacing the native amino acid with an amino acid selected from the group consisting of lysine, cysteine, ornithine, homocysteine and acetyl phenylalanine, wherein the substituting amino acid further comprises a PEG chain covalently bound to the side chain of the amino acid. In one embodiment a glucagon peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, and SEQ ID NO: 19 is further modified to comprise a PEG chain is covalently linked to the side chain of an amino acid at position 17 or 21 of the glucagon peptide. In one embodiment the pegylated glucagon/GLP-1 receptor co-agonist further comprises the sequence of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 or SEQ ID NO: 29.

In another embodiment the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 55 or SEQ ID NO: 56, further comprising a C-terminal extension of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 or SEQ ID NO: 65 linked to the C-terminal amino acid of SEQ ID NO: 55 or SEQ ID NO: 56, and optionally further comprising a PEG chain covalently linked to the side chain of an amino acids at position 17, 18, 21, 24 or 29 or the C-terminal amino acid of the peptide. In another embodiment the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 55 or SEQ ID NO: 56, wherein a PEG chain is covalently linked to the side chain of an amino acids at position 21 or 24 of the glucagon peptide and the peptide further comprises a C-terminal extension of SEQ ID NO: 26, or SEQ ID NO: 29.

In another embodiment the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 55, or SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 34, wherein an additional amino acid is added to the carboxy terminus of SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 34, and a PEG chain is covalently linked to the side chain of the added amino acid. In a further embodiment, the pegylated glucagon analog further comprises a C-terminal extension of SEQ ID NO: 26 or SEQ ID NO: 29 linked to the C-terminal amino acid of SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 34. In another embodiment the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 19, wherein a PEG chain is covalently linked to the side chain of the amino acid at position 30 of the glucagon peptide and the peptide further comprises a C-terminal extension of SEQ ID NO: 26 or SEQ ID NO: 29 linked to the C-terminal amino acid of SEQ ID NO: 19.

The polyethylene glycol chain may be in the form of a straight chain or it may be branched. In accordance with one embodiment the polyethylene glycol chain has an average molecular weight selected from the range of about 500 to about 10,000 Daltons. In one embodiment the polyethylene glycol chain has an average molecular weight selected from the range of about 1,000 to about 5,000 Daltons. In an alternative embodiment the polyethylene glycol chain has an average molecular weight selected from the range of about 10,000 to about 20,000 Daltons. In accordance with one embodiment the pegylated glucagon peptide comprises two or more polyethylene chains covalently bound to the glucagon peptide wherein the total molecular weight of the glucagon chains is about 1,000 to about 5,000 Daltons. In one embodiment the pegylated glucagon agonist comprises a peptide consisting of SEQ ID NO: 5 or a glucagon agonist analog of SEQ ID NO: 5, wherein a PEG chain

is covalently linked to the amino acid residue at position 21 and at position 24, and wherein the combined molecular weight of the two PEG chains is about 1,000 to about 5,000 Daltons.

As described in detail in the Examples, the glucagon agonists of the present invention have enhanced biophysical stability and aqueous solubility while demonstrating enhanced bioactivity relative to the native peptide. Accordingly, the glucagon agonists of the present invention are believed to be suitable for any use that has previously been described for the native glucagon peptide. Accordingly, the modified glucagon peptides described herein can be used to treat hypoglycemia or to increase blood glucose level, to induce temporary paralysis of the gut for radiological uses, or treat other metabolic diseases that result from low blood levels of glucagon. The glucagon peptides described herein also are expected to be used to reduce or maintain body weight, or to treat hyperglycemia, or to reduce blood glucose level, or to normalize blood glucose level.

The glucagon peptides of the invention may be administered alone or in combination with other anti-diabetic or anti-obesity agents. Anti-diabetic agents known in the art or under investigation include insulin, sulfonylureas, such as tolbutamide (Orinase), acetohexamide (Dymelor), tolazamide (Tolinase), chlorpropamide (Diabinese), glipizide (Glucotrol), glyburide (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepiride (Amaryl), or gliclazide (Diamicron); meglitinides, such as repaglinide (Prandin) or nateglinide (Starlix); biguanides such as metformin (Glucophage) or phenformin; thiazolidinediones such as rosiglitazone (Avandia), pioglitazone (Actos), or troglitazone (Rezulin), or other PPAR $\gamma$  inhibitors; alpha glucosidase inhibitors that inhibit carbohydrate digestion, such as miglitol (Glyset), acarbose (Precose/Glucobay); exenatide (Byetta) or pramlintide; Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors such as vildagliptin or sitagliptin; SGLT (sodium-dependent glucose transporter 1) inhibitors; or FBPase (fructose 1,6-bisphosphatase) inhibitors.

Anti-obesity agents known in the art or under investigation include appetite suppressants, including phenethylamine type stimulants, phentermine (optionally with fenfluramine or dexfenfluramine), diethylpropion (Tenuate®), phendimetrazine (Prelu-2®, Bontril®), benzphetamine (Didrex®), sibutramine (Meridia®, Reductil®); rimonabant (Acomplia®), other cannabinoid receptor antagonists; oxyntomodulin;

fluoxetine hydrochloride (Prozac); Qnexa (topiramate and phentermine), Excalia (bupropion and zonisamide) or Contrave (bupropion and naltrexone); or lipase inhibitors, similar to xenical (Orlistat) or Cetilistat (also known as ATL-962), or GT 389-255.

5           One aspect of the present disclosure is directed to a pre-formulated aqueous solution of the presently disclosed glucagon agonist for use in treating hypoglycemia. The improved stability and solubility of the agonist compositions described herein allow for the preparation of pre-formulated aqueous solutions of glucagon for rapid administration and treatment of hypoglycemia. In one embodiment a solution  
10           comprising a pegylated glucagon agonist is provided for administration to a patient suffering from hypoglycemia, wherein the total molecular weight of the PEG chains linked to the pegylated glucagon agonist is between about 500 to about 5,000 Daltons. In one embodiment the pegylated glucagon agonist comprises a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, and SEQ ID NO: 25, and  
15           glucagon agonist analogs of SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, and SEQ ID NO: 25, or a pegylated lactam derivative of glucagon comprising the sequence of SEQ ID NO: 20, wherein the side chain of an amino acid residue of said glucagon peptide is covalently bound to the polyethylene glycol chain.

          The method of treating hypoglycemia in accordance with the present invention  
20           comprises the steps of administering the presently disclosed glucagon agonists to a patient using any standard route of administration, including parenterally, such as intravenously, intraperitoneally, subcutaneously or intramuscularly, intrathecally, transdermally, rectally, orally, nasally or by inhalation. In one embodiment the composition is administered subcutaneously or intramuscularly. In one embodiment,  
25           the composition is administered parenterally and the glucagon composition is prepackaged in a syringe.

          Surprisingly, applicants have discovered that pegylated glucagon peptides can be prepared that retain the parent peptide's bioactivity and specificity. However, increasing the length of the PEG chain, or attaching multiple PEG chains to the  
30           peptide, such that the total molecular weight of the linked PEG is greater than 5,000 Daltons, begins to delay the time action of the modified glucagon. In accordance with one embodiment, a glucagon peptide of SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, and SEQ ID NO: 25, or a glucagon agonist analog thereof, or a pegylated lactam derivative of

glucagon comprising the sequence of SEQ ID NO: 20 is provided wherein the peptide comprises one or more polyethylene glycol chains, wherein the total molecular weight of the linked PEG is greater than 5,000 Daltons, and in one embodiment is greater than 10,000 Daltons, but less than 40,000 Daltons. Such modified glucagon peptides have a delayed or prolonged time of activity but without loss of the bioactivity. Accordingly, such compounds can be administered to extend the effect of the administered glucagon peptide.

Glucagon peptides that have been modified to be covalently bound to a PEG chain having a molecular weight of greater than 10,000 Daltons can be administered in conjunction with insulin to buffer the actions of insulin and help to maintain stable blood glucose levels in diabetics. The modified glucagon peptides of the present disclosure can be co-administered with insulin as a single composition, simultaneously administered as separate solutions, or alternatively, the insulin and the modified glucagon peptide can be administered at different time relative to one another. In one embodiment the composition comprising insulin and the composition comprising the modified glucagon peptide are administered within 12 hours of one another. The exact ratio of the modified glucagon peptide relative to the administered insulin will be dependent in part on determining the glucagon levels of the patient, and can be determined through routine experimentation.

In accordance with one embodiment a composition is provided comprising insulin and a modified glucagon peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 and glucagon agonist analogs thereof, wherein the modified glucagon peptide further comprises a polyethylene glycol chain covalently bound to an amino acid side chain at position 17, 21, 24 or 21 and 24. In one embodiment the composition is an aqueous solution comprising insulin and the glucagon analog. In embodiments where the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 24 or SEQ ID NO: 25 the PEG chain is covalently bound at position 21 or 24 of the glucagon peptide. In one embodiment the polyethylene glycol chain has a molecular weight of about 10,000 to about 40,000.

In accordance with one embodiment the modified glucagon peptides disclosed herein are used to induce temporary paralysis of the intestinal tract. This method has utility for radiological purposes and comprises the step of administering an effective

amount of a pharmaceutical composition comprising a pegylated glucagon peptide, a glucagon peptide comprising a c-terminal extension or a dimer of such peptides. In one embodiment the glucagon peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 and SEQ ID NO: 15. In one embodiment the glucagon peptide further comprises a PEG chain, of about 1,000 to 40,000 Daltons is covalently bound to an amino acid residue at position 21 or 24. In one embodiment the glucagon peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 and SEQ ID NO: 15. In one embodiment the PEG chain has a molecular weight of about 500 to about 5,000 Daltons.

In a further embodiment the composition used to induce temporary paralysis of the intestinal tract comprises a first modified glucagon peptide and a second modified glucagon peptide. The first modified peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 and SEQ ID NO: 25, optionally linked to a PEG chain of about 500 to about 5,000 Daltons, and the second peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 and SEQ ID NO: 25, covalently linked to a PEG chain of about 10,000 to about 40,000 Daltons. In this embodiment the PEG chain of each peptide is covalently bound to an amino acid residue at either position 17, 21 or 24 of the respective peptide, and independent of one another.

Oxyntomodulin, a naturally occurring digestive hormone found in the small intestine, has been reported to cause weight loss when administered to rats or humans (see Diabetes 2005;54:2390-2395). Oxyntomodulin is a 37 amino acid peptide that contains the 29 amino acid sequence of glucagon (i.e. SEQ ID NO: 1) followed by an 8 amino acid carboxy terminal extension of SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA). Accordingly, applicants believe that the bioactivity of oxyntomodulin can be retained (i.e. appetite suppression and induced weight loss/weight maintenance), while improving the solubility and stability of the compound and improving the pharmacokinetics, by substituting the glucagon peptide portion of oxyntomodulin with the modified glucagon peptides disclosed herein. In addition applicants also believe that a truncated Oxyntomodulin molecule comprising a glucagon peptide of

the invention, having the terminal four amino acids of oxyntomodulin removed will also be effective in suppressing appetite and inducing weight loss/weight maintenance.

Accordingly, the present invention also encompasses the modified glucagon peptides of the present invention that have a carboxy terminal extension of SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) or SEQ ID NO: 28. These compounds can be administered to individuals to induce weight loss or prevent weight gain. In accordance with one embodiment a glucagon agonist analog of SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 20, further comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) or SEQ ID NO: 28 linked to amino acid 29 of the glucagon peptide, is administered to individuals to induce weight loss or prevent weight gain. More particularly, the glucagon peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 and SEQ ID NO: 15, further comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) or SEQ ID NO: 28 linked to amino acid 29 of the glucagon peptide.

Exendin-4, is a peptide made up of 39 amino acids. It is a powerful stimulator of a receptor known as GLP-1. This peptide has also been reported to suppress appetite and induce weight loss. Applicants have found that the terminal sequence of Exendin-4 when added at the carboxy terminus of glucagon improves the solubility and stability of glucagon without compromising the bioactivity of glucagon. In one embodiment the terminal ten amino acids of Exendin-4 (i.e. the sequence of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS)) are linked to the carboxy terminus of a glucagon peptide of the present disclosure. These fusion proteins are anticipated to have pharmacological activity for suppressing appetite and inducing weight loss/weight maintenance. In accordance with one embodiment a glucagon agonist analog of SEQ ID NO: 33 or SEQ ID NO: 20, further comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS) or SEQ ID NO: 29 linked to amino acid 29 of the glucagon peptide, is administered to individuals to induce weight loss or prevent weight gain. More particularly, the glucagon peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 55 and SEQ ID NO: 56 further comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS) or

SEQ ID NO: 29 linked to amino acid 29 of the glucagon peptide. In one embodiment the administered glucagon peptide analog comprises the sequence of SEQ ID NO: 64.

The present disclosure also encompasses multimers of the modified glucagon peptides disclosed herein. Two or more of the modified glucagon peptides can be  
5 linked together using standard linking agents and procedures known to those skilled in the art. For example, dimers can be formed between two modified glucagon peptides through the use of bifunctional thiol crosslinkers and bi-functional amine crosslinkers, particularly for the glucagon peptides that have been substituted with cysteine, lysine, ornithine, homocysteine or acetyl phenylalanine residues (e.g. SEQ ID NO: 3 and  
10 SEQ ID NO: 4). The dimer can be a homodimer or alternatively can be a heterodimer. In one embodiment the dimer comprises a homodimer of a glucagon fusion peptide wherein the glucagon peptide portion comprises SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 20 and an amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) or SEQ ID NO: 28 (KRNR) linked to amino acid 29  
15 of the glucagon peptide. In another embodiment the dimer comprises a homodimer of a glucagon agonist analog of SEQ ID NO: 11, wherein the glucagon peptide further comprises a polyethylene glycol chain covalently bound to position 21 or 24 of the glucagon peptide.

In accordance with one embodiment a dimer is provided comprising a first  
20 glucagon peptide bound to a second glucagon peptide via a linker, wherein the first glucagon peptide comprises a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 and SEQ ID NO: 11 and the second glucagon peptide comprises SEQ ID NO: 20. In accordance with another embodiment a dimer is provided comprising a first glucagon peptide bound to a second glucagon peptide  
25 via a linker, wherein said first glucagon peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 and the second glucagon peptide comprise SEQ ID NO: 11, and pharmaceutically acceptable salts of said glucagon polypeptides. In accordance with another embodiment a dimer is  
30 provided comprising a first glucagon peptide bound to a second glucagon peptide via a linker, wherein said first glucagon peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18 and the second glucagon



peptide is independently selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18, and pharmaceutically acceptable salts of said glucagon polypeptides. In one embodiment the first glucagon peptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 20 and the second glucagon peptide is independently selected from the group consisting of SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 11. In one embodiment the dimer is formed between two peptides wherein each peptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11.

The modified glucagon peptides of the present invention can be provided in accordance with one embodiment as part of a kit. In one embodiment a kit for administering a glucagon agonist to a patient in need thereof is provided wherein the kit comprises a modified glucagon peptide selected from the group consisting of 1) a glucagon peptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 or SEQ ID NO:11; 2) a glucagon fusion peptide comprising a glucagon agonist analog of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 20 or SEQ ID NO: 55, and an amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) or SEQ ID NO: 28 (KRNR) linked to amino acid 29 of the glucagon peptide; and 3) a pegylated glucagon peptide of SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 51, further comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) or SEQ ID NO: 28 (KRNR) linked to amino acid 29 of the glucagon peptide, wherein the PEG chain covalently bound to position 17, 21 or 24 has a molecular weight of about 500 to about 40,000 Daltons. In one embodiment the kit comprise a glucagon/GLP-1 co-agonist wherein the peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 18.

In one embodiment the kit is provided with a device for administering the glucagon composition to a patient, e.g. syringe needle, pen device, jet injector or other needle-free injector. The kit may alternatively or in addition include one or more containers, e.g., vials, tubes, bottles, single or multi-chambered pre-filled syringes, cartridges, infusion pumps (external or implantable), jet injectors, pre-filled pen devices and the like, optionally containing the glucagon peptide in a lyophilized form or in an aqueous solution. Preferably, the kits will also include instructions for use.

In accordance with one embodiment the device of the kit is an aerosol dispensing device, wherein the composition is prepackaged within the aerosol device. In another embodiment the kit comprises a syringe and a needle, and in one embodiment the sterile glucagon composition is prepackaged within the syringe.

5       The compounds of this invention may be prepared by standard synthetic methods, recombinant DNA techniques, or any other methods of preparing peptides and fusion proteins. Although certain non-natural amino acids cannot be expressed by standard recombinant DNA techniques, techniques for their preparation are known in the art. Compounds of this invention that encompass non-peptide portions may be  
10       synthesized by standard organic chemistry reactions, in addition to standard peptide chemistry reactions when applicable.

### EXAMPLES

#### General Synthesis Protocol:

15       Glucagon analogs were synthesized using HBTU-activated "Fast Boc" single coupling starting from 0.2mmole of Boc Thr(OBzl)Pam resin on a modified Applied Biosystem 430 A peptide synthesizer. Boc amino acids and HBTU were obtained from Midwest Biotech (Fishers, IN). Side chain protecting groups used were: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(pMeBzl), His(Bom), Lys(2Cl-Z), Ser(OBzl),  
20       Thr(OBzl), Tyr(2Br-Z), and Trp(CHO). The side-chain protecting group on the N-terminal His was Boc.

Each completed peptidyl resin was treated with a solution of 20% piperidine in dimethylformamide to remove the formyl group from the tryptophan. Liquid hydrogen fluoride cleavages were performed in the presence of p-cresol and dimethyl  
25       sulfide. The cleavage was run for 1 hour in an ice bath using an HF apparatus (Penninsula Labs). After evaporation of the HF, the residue was suspended in diethyl ether and the solid materials were filtered. Each peptide was extracted into 30-70ml aqueous acetic acid and a diluted aliquot was analyzed by HPLC [Beckman System Gold, 0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/min, 45C, 214nm, A buffer =0.1%TFA,  
30       B=0.1%TFA/90%acetonitrile, gradient of 10% to 80%B over 10min].

Purification was done on a FPLC over a 2.2 x 25 cm Kromasil C18 column while monitoring the UV at 214nm and collecting 5 minute fractions. The homogeneous fractions were combined and lyophilized to give a product purity of

74

>95%. The correct molecular mass and purity were confirmed using MALDI-mass spectral analysis.

#### General Pegylation Protocol: (Cys-maleimido)

5 Typically, the glucagon Cys analog is dissolved in phosphate buffered saline (5-10mg/ml) and 0.01M ethylenediamine tetraacetic acid is added (10-15% of total volume). Excess (2-fold) maleimido methoxyPEG reagent (Nektar) is added and the reaction stirred at room temp while monitoring reaction progress by HPLC. After 8-24hrs, the reaction mixture, is acidified and loaded onto a preparative reverse phase  
10 column for purification using 0.1%TFA/acetonitrile gradient. The appropriate fractions were combined and lyophilized to give the desired pegylated analogs.

#### EXAMPLE 1

##### Synthesis of Glucagon Cys<sup>17</sup>(1-29) and Similar MonoCys Analogs

15 0.2mmole Boc Thr(OBzl) Pam resin (SynChem Inc) in a 60ml reaction vessel and the following sequence was entered and run on a modified Applied Biosystems 430A Peptide Synthesizer using FastBoc HBTU-activated single couplings.

HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 35)

The following side chain protecting groups were used: Arg(Tos), Asp(OcHex),  
20 Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex), His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO), and Tyr(Br-Z). The completed peptidyl resin was treated with 20% piperidine/dimethylformamide to remove the Trp formyl protection then transferred to an HF reaction vessel and dried in vacuo. 1.0ml p-cresol and 0.5 ml dimehyl sulfide were added along with a magnetic stir bar. The vessel was attached to the HF  
25 apparatus (Pennisula Labs), cooled in a dry ice/methanol bath, evacuated, and aprox. 10ml liquid hydrogen fluoride was condensed in. The reaction was stirred in an ice bath for 1hr then the HF was removed in vacuo. The residue was suspended in ethyl ether; the solids were filtered, washed with ether, and the peptide extracted into 50 ml aqueous acetic acid. An analytical HPLC was run [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm, A buffer of 0.1%TFA, B buffer of 0.1%TFA/90%ACN, gradient=10%B  
30 to 80%B over 10min.] with a small sample of the cleavage extract. The remaining extract was loaded onto a 2.2 x 25cm Kromasil C18 preparative reverse phase column and an acetonitrile gradient was run using a Pharmacia FPLC system. 5min fractions

75

were collected while monitoring the UV at 214nm (2.0A). A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%acetonitrile. Gradient = 30%B to 100%B over 450min.

The fractions containing the purest product (48-52) were combined frozen, and lyophilized to give 30.1mg. An HPLC analysis of the product demonstrated a  
5 purity of >90% and MALDI mass spectral analysis demonstrated the desired mass of 3429.7. Glucagon Cys<sup>21</sup>, Glucagon Cys<sup>24</sup>, and Glucagon Cys<sup>29</sup> were similarly prepared.

## EXAMPLE 2

### 10 Synthesis of Glucagon-Cex and Other C-Terminal Extended Analogs.

285mg (0.2mmole) methoxybenzhydramine resin (Midwest Biotech) was placed in a 60ml reaction vessel and the following sequence was entered and run on a modified Applied Biosystems 430A peptide synthesizer using FastBoc HBTU-activated single couplings.

15 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36)

The following side chain protecting groups were used: Arg(Tos), Asp(OcHex), Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex), His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO), and Tyr(Br-Z). The completed peptidyl resin was treated with 20%  
20 piperidine/dimethylformamide to remove the Trp formyl protection then transferred to HF reaction vessel and dried in vacuo. 1.0ml p-cresol and 0.5 ml dimethyl sulfide were added along with a magnetic stir bar. The vessel was attached to the HF apparatus (Penninsula Labs), cooled in a dry ice/methanol bath, evacuated, and approx. 10ml liquid hydrogen fluoride was condensed in. The reaction was stirred in an ice  
25 bath for 1hr then the HF was removed in vacuo. The residue was suspended in ethyl ether; the solids were filtered, washed with ether, and the peptide extracted into 50 ml aqueous acetic acid. An analytical HPLC was run [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm, A buffer of 0.1%TFA, B buffer of 0.1%TFA/90%ACN, gradient=10%B to 80%B over 10min.] on an aliquot of the cleavage extract. The extract was loaded  
30 onto a 2.2 x 25cm Kromasil C18 preparative reverse phase column and an acetonitrile gradient was run for elution using a Pharmacia FPLC system. 5min fractions were collected while monitoring the UV at 214nm (2.0A). A=0.1%TFA,

B=0.1%TFA/50%acetonitrile. Gradient = 30%B to 100%B over 450min. Fractions 58-65 were combined, frozen and lyophilized to give 198.1mg.

HPLC analysis of the product showed a purity of greater than 95%. MALDI mass spectral analysis showed the presence of the desired theoretical mass of 4316.7 with the product as a C-terminal amide. Oxyntomodulin and oxyntomodulin-KRNR were similarly prepared as the C-terminal carboxylic acids starting with the appropriately loaded PAM-resin.

### 10 EXAMPLE 3

#### Glucagon Cys<sup>17</sup> Mal-PEG-5K

15.1mg of Glucagon Cys<sup>17</sup>(1-29) and 27.3mg methoxy poly(ethyleneglycol) maleimide avg. M.W.5000 (mPEG-Mal-5000,Nektar Therapeutics) were dissolved in 3.5ml phosphate buffered saline (PBS) and 0.5ml 0.01M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was added. The reaction was stirred at room temperature and the progress of the reaction was monitored by HPLC analysis [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1ml/min,45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, gradient=10%B to 80%B over 10min.].

After 5 hours, the reaction mixture was loaded onto 2.2 x 25 cm Kromasil C18 preparative reverse phase column. An acetonitrile gradient was run on a Pharmacia FPLC while monitoring the UV wavelength at 214nm and collecting 5 min fractions. A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50% acetonitrile, gradient= 30%B to 100%B over 450 min. The fractions corresponding to the product were combined, frozen and lyophilized to give 25.9 mg.

25 This product was analyzed on HPLC [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, gradient=10%B to 80%B over 10min.] which showed a purity of aprox. 90%. MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) mass spectral analysis showed a broad mass range (typical of PEG derivatives) of 8700 to 9500. This shows an addition to the mass of the starting glucagon peptide (3429) of approximately 5,000 a.m.u.

## EXAMPLE 4

Glucagon Cys<sup>21</sup> Mal-PEG-5K

21.6mg of Glucagon Cys<sup>21</sup>(1-29) and 24mg mPEG-MAL-5000 (Nektar Therapeutics) were dissolved in 3.5ml phosphate buffered saline (PBS) and 0.5ml  
5 0.01M ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) was added. The reaction was stirred at room temp. After 2hrs, another 12.7 mg of mPEG-MAL-5000 was added. After 8hrs, the reaction mixture was loaded onto a 2.2 x 25cm Vydac C18 preparative reverse phase column and an acetonitrile gradient was run on a Pharmacia FPLC at 4 ml/min while collecting 5min fractions. A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%ACN.  
10 Gradient= 20% to 80%B over 450min.

The fractions corresponding to the appearance of product were combined frozen and lyophilized to give 34 mg. Analysis of the product by analytical HPLC [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, gradient=10%B to 80%B over 10min.] showed a  
15 homogeneous product that was different than starting glucagon peptide. MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) mass spectral analysis showed a broad mass range (typical of PEG analogs) of 8700 to 9700. This shows an addition to the mass of the starting glucagon peptide (3470) of approximately 5,000 a.m.u.

## 20 EXAMPLE 5

Glucagon Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-5K

20.1mg Glucagon C<sup>24</sup>(1-29) and 39.5mg mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) were dissolved in 3.5ml PBS with stirring and 0.5 ml 0.01M EDTA was added. The reaction was stirred at room temp for 7 hrs, then another 40 mg of mPEG-  
25 Mal-5000 was added. After approximately 15 hr, the reaction mixture was loaded onto a 2.2 x 25 cm Vydac C18 preparative reverse phase column and an acetonitrile gradient was run using a Pharmacia FPLC. 5 min. fractions were collected while monitoring the UV at 214nm (2.0A). A buffer = 0.1%TFA, B buffer = 0.1%TFA/50%ACN, gradient = 30%B to 100%B over 450min. The fractions  
30 corresponding to product were combined, frozen and lyophilized to give 45.8mg. MALDI mass spectral analysis showed a typical PEG broad signal with a maximum at 9175.2 which is approximately 5,000 a.m.u. more than Glucagon C<sup>24</sup> (3457.8).

B=0.1%TFA/50%acetonitrile. Gradient = 30%B to 100%B over 450min. Fractions 58-65 were combined, frozen and lyophilized to give 198.1mg.

HPLC analysis of the product showed a purity of greater than 95%. MALDI mass spectral analysis showed the presence of the desired theoretical mass of 4316.7 with the product as a C-terminal amide. Oxyntomodulin and oxyntomodulin-KRNR were similarly prepared as the C-terminal carboxylic acids starting with the appropriately loaded PAM-resin.

### 10 EXAMPLE 3

Glucagon Cys<sup>17</sup> Mal-PEG-5K

15.1mg of Glucagon Cys<sup>17</sup>(1-29) and 27.3mg methoxy poly(ethyleneglycol) maleimide avg. M.W.5000 (mPEG-Mal-5000,Nektar Therapeutics) were dissolved in 3.5ml phosphate buffered saline (PBS) and 0.5ml 0.01M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was added. The reaction was stirred at room temperature and the progress of the reaction was monitored by HPLC analysis [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1ml/min,45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, gradient=10%B to 80%B over 10min.].

After 5 hours, the reaction mixture was loaded onto 2.2 x 25 cm Kromasil C18 preparative reverse phase column. An acetonitrile gradient was run on a Pharmacia FPLC while monitoring the UV wavelength at 214nm and collecting 5 min fractions. A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50% acetonitrile, gradient= 30%B to 100%B over 450 min. The fractions corresponding to the product were combined, frozen and lyophilized to give 25.9 mg.

25 This product was analyzed on HPLC [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, gradient=10%B to 80%B over 10min.] which showed a purity of aprox. 90%. MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) mass spectral analysis showed a broad mass range (typical of PEG derivatives) of 8700 to 9500. This shows an addition to the mass of the starting glucagon peptide (3429) of approximately 5,000 a.m.u.

## EXAMPLE 4

Glucagon Cys<sup>21</sup> Mal-PEG-5K

21.6mg of Glucagon Cys<sup>21</sup>(1-29) and 24mg mPEG-MAL-5000 (Nektar Therapeutics) were dissolved in 3.5ml phosphate buffered saline (PBS) and 0.5ml  
5 0.01M ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) was added. The reaction was stirred at room temp. After 2hrs, another 12.7 mg of mPEG-MAL-5000 was added. After 8hrs, the reaction mixture was loaded onto a 2.2 x 25cm Vydac C18 preparative reverse phase column and an acetonitrile gradient was run on a Pharmacia FPLC at 4 ml/min while collecting 5min fractions. A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%ACN.  
10 Gradient= 20% to 80%B over 450min.

The fractions corresponding to the appearance of product were combined frozen and lyophilized to give 34 mg. Analysis of the product by analytical HPLC [0.46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN, gradient=10%B to 80%B over 10min.] showed a  
15 homogeneous product that was different than starting glucagon peptide. MALDI (matrix assisted laser desorption ionization) mass spectral analysis showed a broad mass range (typical of PEG analogs) of 8700 to 9700. This shows an addition to the mass of the starting glucagon peptide (3470) of approximately 5,000 a.m.u.

## 20 EXAMPLE 5

Glucagon Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-5K

20.1mg Glucagon C<sup>24</sup>(1-29) and 39.5mg mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) were dissolved in 3.5ml PBS with stirring and 0.5 ml 0.01M EDTA was added. The reaction was stirred at room temp for 7 hrs, then another 40 mg of mPEG-  
25 Mal-5000 was added. After approximately 15 hr, the reaction mixture was loaded onto a 2.2 x 25 cm Vydac C18 preparative reverse phase column and an acetonitrile gradient was run using a Pharmacia FPLC. 5 min. fractions were collected while monitoring the UV at 214nm (2.0A). A buffer = 0.1%TFA, B buffer = 0.1%TFA/50%ACN, gradient = 30%B to 100%B over 450min. The fractions  
30 corresponding to product were combined, frozen and lyophilized to give 45.8mg. MALDI mass spectral analysis showed a typical PEG broad signal with a maximum at 9175.2 which is approximately 5,000 a.m.u. more than Glucagon C<sup>24</sup> (3457.8).



**EXAMPLE 6****Glucagon Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-20K**

25.7mg of Glucagon Cys<sup>24</sup>(1-29) and 40.7mg mPEG-Mal-20K (Nektar Therapeutics) were dissolved in 3.5ml PBS with stirring at room temp. and 0.5 ml  
5 0.01M EDTA was added. After 6hrs, the ratio of starting material to product was  
aprox. 60:40 as determined by HPLC. Another 25.1mg of mPEG-Mal-20K was  
added and the reaction allowed to stir another 16hrs. The product ratio had not  
significantly improved, so the reaction mixture was loaded onto a 2.2 x 25 cm  
Kromasil C18 preparative reverse phase column and purified on a Pharmacia FPLC  
10 using a gradient of 30%B to 100%B over 450min. A buffer =0.1%TFA, B buffer =  
0.1%TFA/50%ACN, flow = 4ml/min, and 5 min fractions were collected while  
monitoring the UV at 214nm (2.0A). The fractions containing homogeneous product  
were combined, frozen and lyophilized to give 25.7 mg. Purity as determined by  
analytical HPLC was ~90%. A MALDI mass spectral analysis showed a broad peak  
15 from 23,000 to 27,000 which is approximately 20,000 a.m.u. more than starting  
Glucagon C<sup>24</sup> (3457.8).

**EXAMPLE 7****Glucagon Cys<sup>29</sup> Mal-PEG-5K**

20 20.0mg of Glucagon Cys<sup>29</sup>(1-29) and 24.7 mg mPEG-Mal-5000 (Nektar  
Therapeutics) were dissolved in 3.5 ml PBS with stirring at room temperature and 0.5  
ml 0.01M EDTA was added. After 4 hr, another 15.6 mg of mPEG-Mal-5000 was  
added to drive the reaction to completion. After 8 hrs, the reaction mixture was  
loaded onto a 2.2 x 25 cm Vydac C18 preparative reverse phase column and an  
25 acetonitrile gradient was run on a Pharmacia FPLC system. 5 min fractions were  
collected while monitoring the UV at 214nm (2.0A). A=0.1%TFA,  
B=0.1%TFA/50%ACN. Fractions 75-97 were combined frozen and lyophilized to  
give 40.0 mg of product that is different than recovered starting material on HPLC  
(fractions 58-63). Analysis of the product by analytical HPLC [0.46 x 5 cm Zorbax  
30 C8, 1 ml/min, 45C, 214nm (0.5A), A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/90%ACN,  
gradient=10%B to 80%B over 10min.] showed a purity greater than 95%. MALDI  
mass spectral analysis showed the presence of a PEG component with a mass range of

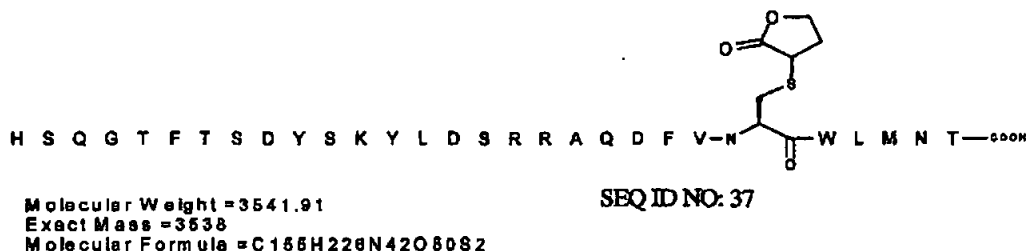
8,000 to 10,000 (maximum at 9025.3) which is 5,540 a.m.u. greater than starting material (3484.8).

#### EXAMPLE 8

##### 5 Glucagon Cys<sup>24</sup> (2-butyrolactone)

To 24.7mg of Glucagon Cys<sup>24</sup>(1-29) was added 4ml 0.05M ammonium bicarbonate/50%acetonitrile and 5.5 ul of a solution of 2-bromo-4-hydroxybutyric acid- $\gamma$ -lactone (100ul in 900ul acetonitrile). After 3hrs of stirring at room  
 10 temperature, another 105 ul of lactone solution was added to the reaction mixture which was stirred another 15hrs. The reaction mixture was diluted to 10ml with 10% aqueous acetic acid and was loaded onto a 2.2 x 25 cm Kromasil C18 preparative reverse phase column. An acetonitrile gradient (20%B to 80%B over 450min) was run on a Pharmacia FPLC while collecting 5min fractions and monitoring the UV at  
 15 214nm (2.0A). Flow =4ml/min, A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%ACN. Fractions 74-77 were combined frozen and lyophilized to give 7.5mg. HPLC analysis showed a purity of 95% and MALDI mass spect analysis showed a mass of 3540.7 or 84 mass units more than starting material. This result consistent with the addition of a single butyrolactone moiety.

20



#### EXAMPLE 9

##### 25 Glucagon Cys<sup>24</sup>(S-carboxymethyl)

18.1mg of Glucagon Cys<sup>24</sup>(1-29) was dissolved in 9.4ml 0.1M sodium phosphate buffer (pH=9.2) and 0.6ml bromoacetic acid solution (1.3mg/ml in acetonitrile) was added. The reaction was stirred at room temperature and the reaction progress was followed by analytical HPLC. After 1hr another 0.1ml  
 30 bromoacetic acid solution was added. The reaction was stirred another 60min. then acidified with aqueous acetic acid and was loaded onto a 2.2 x 25cm Kromasil C18 preparative reverse phase column for purification. An acetonitrile gradient was run

on a Pharmacia FPLC (flow = 4ml/min) while collecting 5min fractions and monitoring the UV at 214nm (2.0A). A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%ACN.

Fractions 26-29 were combined frozen and lyophilized to give

several mg of product. Analytical HPLC showed a purity of 90% and MALDI mass

5 spectral analysis confirmed a mass of 3515 for the desired product.



Molecular Weight = 3515.87

SBQ ID NO: 38

Exact Mass = 3512

Molecular Formula = C153H224N42O50S2

### EXAMPLE 10

Glucagon Cys<sup>24</sup> maleimido,PEG-3.4K-dimer

10

16mg Glucagon Cys<sup>24</sup> and 1.02mg Mal-PEG-Mal-3400,

poly(ethyleneglycol)-bis-maleimide avg. M.W. 3400, (Nektar Therapeutics) were

dissolved in 3.5 phosphate buffered saline and 0.5ml 0.01M EDTA and the reaction

was stirred at room temperature. After 16hrs, another 16mg of Glucagon Cys<sup>24</sup> was

15 added and the stirring continued. After approximately 40hrs, the reaction mixture was

loaded onto a Pharmacia PepRPC 16/10 column and an acetonitrile gradient was run

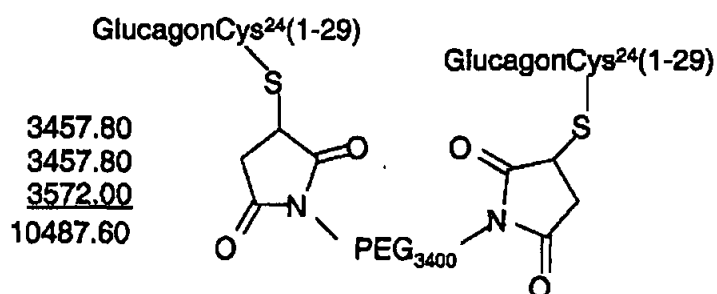
on a Pharmacia FPLC while collecting 2min fractions and monitoring the UV at

214nm (2.0A). Flow=2ml/min, A=0.1%TFA, B=0.1%TFA/50%ACN. Fractions 69-

74 were combined frozen and lyophilized to give 10.4mg. Analytical HPLC showed

20 a purity of 90% and MALDI mass spectral analysis shows a component in the 9500-

11,000 range which is consistent with the desired dimer.



25

### EXAMPLE 11

### Synthesis of Glucagon Lactams

285 mg (0.2 mmole) methoxybenzhydrylamine resin (Midwest Biotech) was added to a 60 mL reaction vessels and the following sequence was assembled on a modified Applied Biosystems 430A peptide synthesizer using Boc DEPBT-activated single couplings.

HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT-NH<sub>2</sub> (12-16 Lactam; SEQ ID NO: 12)

10       The following side chain protecting groups were used: Arg(Tos), Asp(OcHx), Asn(Xan), Glu(OFm), His(BOM), Lys(Fmoc), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO), Tyr(Br-Z). Lys(Cl-Z) was used at position 12 if lactams were constructed from 16-20, 20-24, or 24-28. The completed peptidyl resin was treated with 20% piperidine/dimethylformamide for one hour with rotation to remove the Trp formyl  
15       group as well as the Fmoc and OFm protection from Lys12 and Glu16. Upon confirmation of removal by a positive ninhydrin test, the resin was washed with dimethylformamide, followed by dichloromethane and than again with dimethylformamide. The resin was treated with 520 mg (1 mmole) Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) in  
20       dimethylformamide and diisopropylethylamine (DIEA). The reaction proceeded for 8-10 hours and the cyclization was confirmed by a negative ninhydrin reaction. The resin was washed with dimethylformamide, followed by dichloromethane and subsequently treated with trifluoroacetic acid for 10 minutes. The removal of the Boc group was confirmed by a positive ninhydrin reaction. The resin was washed with  
25       dimethylformamide and dichloromethane and dried before being transferred to a hydrofluoric acid (HF) reaction vessel. 500 µL p-cresol was added along with a magnetic stir bar. The vessel was attached to the HF apparatus (Peninsula Labs), cooled in a dry ice/methanol bath, evacuated, and approximately 10 mL of liquid hydrofluoric acid was condensed into the vessel. The reaction was stirred for 1 hour  
30       in an ice bath and the HF was subsequently removed in vacuo. The residue was suspended in ethyl ether; the solids were filtered, washed with ether, and the peptide was solubilized with 150 mL 20% acetonitrile/1% acetic acid.

An analytical HPLC analysis of the crude solubilized peptide was conducted under the following conditions [4.6 X 30 mm Xterra C8, 1.50 mL/min, 220 nm, A buffer 0.1% TFA/10% ACN, B buffer 0.1% TFA/100% ACN, gradient 5-95%B over 15 minutes]. The extract was diluted twofold with water and loaded onto a 2.2 X 25  
5 cm Vydac C4 preparative reverse phase column and eluted using an acetonitrile gradient on a Waters HPLC system (A buffer of 0.1% TFA/10% ACN, B buffer of 0.1% TFA/10% CAN and a gradient of 0-100% B over 120 minutes at a flow of 15.00 ml/min. HPLC analysis of the purified peptide demonstrated greater than 95% purity and electrospray ionization mass spectral analysis confirmed a mass of 3506 Da for  
10 the 12-16 lactam. Lactams from 16-20, 20-24, and 24-28 were prepared similarly.

#### EXAMPLE 12

##### Glucagon Solubility Assays:

A solution (1mg/ml or 3mg/ml) of glucagon (or an analog) is prepared in  
15 0.01N HCl. 100ul of stock solution is diluted to 1ml with 0.01N HCl and the UV absorbance (276nm) is determined. The pH of the remaining stock solution is adjusted to pH7 using  
200-250ul 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH9.2). The solution is allowed to stand overnight at 4°C then centrifuged. 100ul of supernatant is then diluted to 1ml with 0.01N HCl, and the  
20 UV absorbance is determined (in duplicate).

The initial absorbance reading is compensated for the increase in volume and the following calculation is used to establish percent solubility:

$$\frac{\text{Final Absorbance}}{\text{Initial Absorbance}} \times 100 = \text{percent soluble}$$

Results are shown in Table 1 wherein Glucagon-Cex represents wild type glucagon  
25 (SEQ ID NO: 1) plus a carboxy terminal addition of SEQ ID NO: 26 and Glucagon-Cex R<sup>12</sup> represents SEQ ID NO: 39.

Table 1 Solubility data for glucagon analogs

| <u>Analog</u>        | <u>Percent Soluble</u> |
|----------------------|------------------------|
| Glucagon             | 16                     |
| Glucagon-Cex, R12    | 104                    |
| Glucagon-Cex         | 87                     |
| Oxyntomodulin        | 104                    |
| Glucagon, Cys17PEG5K | 94                     |
| Glucagon, Cys21PEG5K | 105                    |
| Glucagon, Cys24PEG5K | 133                    |

5   **EXAMPLE 13**

**Glucagon Receptor Binding Assay**

      The affinity of peptides to the glucagon receptor was measured in a competition binding assay utilizing scintillation proximity assay technology. Serial 3-fold dilutions of the peptides made in scintillation proximity assay buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% w/v bovine serum albumin) were mixed in 96 well white/clear bottom plate (Corning Inc., Acton, MA) with 0.05 nM (3-[<sup>125</sup>I]-iodotyrosyl) Tyr10 glucagon (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 1-6 micrograms per well, plasma membrane fragments prepared from cells over-expressing human glucagon receptor, and 1 mg/well polyethyleneimine-treated wheat germ agglutinin type A scintillation proximity assay beads (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Upon 5 min shaking at 800 rpm on a rotary shaker, the plate was incubated 12h at room temperature and then read on MicroBeta1450 liquid scintillation counter (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Non-specifically bound (NSB) radioactivity was measured in the wells with 4 times greater concentration of "cold" native ligand than the highest concentration in test samples and total bound radioactivity was detected in the wells with no competitor. Percent specific binding was calculated as following: % Specific Binding = ((Bound-NSB)/(Total bound-NSB)) X 100. IC<sub>50</sub> values were determined by using Origin software (OriginLab, Northampton, MA).

25

EXAMPLE 14

Functional Assay- cAMP Synthesis

The ability of glucagon analogs to induce cAMP was measured in a firefly luciferase-based reporter assay. HEK293 cells co-transfected with either glucagon- or GLP-1 receptor and luciferase gene linked to cAMP responsive element were serum deprived by culturing 16h in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 0.25% Bovine Growth Serum (HyClone, Logan, UT) and then incubated with serial dilutions of either glucagon, GLP-1 or novel glucagon analogs for 5 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in 96 well poly-D-Lysine-coated "Biocoat" plates (BD Biosciences, San Jose, CA). At the end of the incubation 100 microliters of LucLite luminescence substrate reagent (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) were added to each well. The plate was shaken briefly, incubated 10 min in the dark and light output was measured on MicroBeta-1450 liquid scintillation counter (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Effective 50% concentrations were calculated by using Origin software (OriginLab, Northampton, MA). Results are shown in Figs. 3-9 and in Tables 2 through 10.

**Table 2**  
**cAMP Induction by Glucagon Analogs with C-Terminus Extension**

| Peptide                   | cAMP Induction        |    |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|-----------------------|----|
|                           | Glucagon Receptor     |    | GLP-1 Receptor        |    |
|                           | EC <sub>50</sub> , nM | N* | EC <sub>50</sub> , nM | N  |
| Glucagon                  | 0.22 ± 0.09           | 14 | 3.85 ± 1.64           | 10 |
| GLP-1                     | 2214.00 ± 182.43      | 2  | 0.04 ± 0.01           | 14 |
| Glucagon Cex              | 0.25 ± 0.15           | 6  | 2.75 ± 2.03           | 7  |
| Oxyntomodulin             | 3.25 ± 1.65           | 5  | 2.53 ± 1.74           | 5  |
| Oxyntomodulin KRNR        | 2.77 ± 1.74           | 4  | 3.21 ± 0.49           | 2  |
| Glucagon R12              | 0.41 ± 0.17           | 6  | 0.48 ± 0.11           | 5  |
| Glucagon R12 Cex          | 0.35 ± 0.23           | 10 | 1.25 ± 0.63           | 10 |
| Glucagon R12 K20          | 0.84 ± 0.40           | 5  | 0.82 ± 0.49           | 5  |
| Glucagon R12 K24          | 1.00 ± 0.39           | 4  | 1.25 ± 0.97           | 5  |
| Glucagon R12 K29          | 0.81 ± 0.49           | 5  | 0.41 ± 0.24           | 6  |
| Glucagon Amide            | 0.26 ± 0.15           | 3  | 1.90 ± 0.35           | 2  |
| Oxyntomodulin C24         | 2.54 ± 0.63           | 2  | 5.27 ± 0.26           | 2  |
| Oxyntomodulin C24 PEG 20K | 0.97 ± 0.04           | 1  | 1.29 ± 0.11           | 1  |

\* - number of experiments



Table 3  
cAMP Induction by Pegylated Glucagon Analogs

| Peptide              | cAMP Induction        |    |                       |   |
|----------------------|-----------------------|----|-----------------------|---|
|                      | Glucagon Receptor     |    | GLP-1 Receptor        |   |
|                      | EC <sub>50</sub> , nM | N* | EC <sub>50</sub> , nM | N |
| Glucagon             | 0.33 ± 0.23           | 18 | 12.71 ± 3.74          | 2 |
| Glucagon C17 PEG 5K  | 0.82 ± 0.15           | 4  | 55.86 ± 1.13          | 2 |
| Glucagon C21 PEG 5K  | 0.37 ± 0.16           | 6  | 11.52 ± 3.68          | 2 |
| Glucagon C24 PEG 5K  | 0.22 ± 0.10           | 12 | 13.65 ± 2.95          | 4 |
| Glucagon C29 PEG 5K  | 0.96 ± 0.07           | 2  | 12.71 ± 3.74          | 2 |
| Glucagon C24 PEG 20K | 0.08 ± 0.05           | 3  | Not determined        |   |
| Glucagon C24 Dimer   | 0.10 ± 0.05           | 3  | Not determined        |   |
| GLP-1                | > 1000                |    | 0.05 ± 0.02           | 4 |

\* - number of experiments

5

Table 4  
cAMP Induction by E16 Glucagon Analogs

| Percent Potency Relative to Native Ligand |       |          |
|-------------------------------------------|-------|----------|
| Peptide                                   | GRec  | GLP-1Rec |
| E16 Gluc-NH2                              | 187.2 | 17.8     |
| Glucagon                                  | 100.0 | 0.8      |
| Gluc-NH2                                  | 43.2  | 4.0      |
| NLeu3, E16 Gluc-NH2                       | 7.6   | 20.6     |
| E3, E16 Gluc-NH2                          | 1.6   | 28.8     |
| Om3, E16 Gluc-NH2                         | 0.5   | 0.1      |
| GLP-1                                     | <0.1  | 100      |

10

Table 5  
cAMP Induction by E16 Glucagon Analogs

| Percent Potency Relative to Native Ligand |       |          |
|-------------------------------------------|-------|----------|
| Peptide                                   | GRec  | GLP-1Rec |
| E16 Gluc-NH2                              | 187.2 | 17.8     |
| E15, E16 Gluc-NH2                         | 147.0 | 9.2      |
| E16, K20 Gluc-NH2                         | 130.1 | 41.5     |
| Gluc-NH2                                  | 43.2  | 4.0      |

5

Table 6  
EC50 values for cAMP Induction by E16 Glucagon Analogs

|                   | Glucagon Receptor |       |    | GLP-1 Receptor |       |    |
|-------------------|-------------------|-------|----|----------------|-------|----|
| Peptide           | EC50 (nM)         | StDev | n  | EC50 (nM)      | StDev | n  |
| Glucagon          | 0.28              | 0.14  | 10 | 4.51           | N/A   | 1  |
| Glucagon-NH2      | 0.53              | 0.33  | 8  | 1.82           | 0.96  | 5  |
| E16 Gluc-NH2      | 0.07              | 0.07  | 10 | 0.16           | 0.14  | 10 |
| E16, G30 Gluc-NH2 | 0.41              | 0.36  | 5  | 0.24           | 0.10  | 5  |
| E16, G30 Gluc-Cex | 0.51              | 0.46  | 5  | 1.19           | 0.86  | 5  |
| GLP-1             | 2214              | N/A   | 1  | 0.03           | 0.02  | 9  |

10

Table 7  
EC50 values for cAMP Induction by E16 Glucagon Analogs

|                                   | Glucagon<br>Receptor |       |    | GLP-1<br>Receptor |       |    |
|-----------------------------------|----------------------|-------|----|-------------------|-------|----|
| Peptide                           | EC50 (nM)            | StDev | n  | EC50 (nM)         | StDev | n  |
| E16 Glucagon NH2                  | 0.07                 | 0.07  | 10 | 0.16              | 0.14  | 10 |
| hCSO <sub>3</sub> 16 Glucagon-NH2 | 0.25                 | 0.12  | 2  | 0.19              | 0.02  | 2  |
| hE16 Glucagon-NH2                 | 0.17                 | 0.08  | 2  | 0.25              | 0.03  | 2  |
| H16 Glucagon-NH2                  | 0.45                 | 0.3   | 2  | 0.38              | 0.11  | 2  |
| Q16 Glucagon-NH2                  | 0.22                 | 0.1   | 2  | 0.39              | 0.08  | 2  |
| D16 Glucagon-NH2                  | 0.56                 | 0.15  | 2  | 0.93              | 0.28  | 2  |
| (S16) Glucagon-NH2                | 0.53                 | 0.33  | 8  | 1.82              | 0.96  | 5  |

5

Table 8  
EC50 values for cAMP Induction by E16 Glucagon Analogs

|                  | Glucagon<br>Receptor |      |    | GLP-1<br>Receptor |       |    |
|------------------|----------------------|------|----|-------------------|-------|----|
| Peptide          | EC50 (nM)            | StD  | n  | EC50 (nM)         | StDev | n  |
| E16 Glucagon NH2 | 0.07                 | 0.07 | 10 | 0.16              | 0.14  | 10 |
| T16 Glucagon NH2 | 0.10                 | 0.02 | 3  | 1.99              | 0.48  | 3  |
| G16 Glucagon NH2 | 0.10                 | 0.01 | 3  | 2.46              | 0.60  | 3  |
| Glucagon NH2     | 0.53                 | 0.33 | 4  | 1.82              | 0.96  | 5  |
| GLP-1            | 2214                 | N/A  | 1  | 0.03              | 0.02  | 9  |

10

E16 Gluc NH<sub>2</sub> was 4-fold more potent at the glucagon receptor relative to G16-COOH and T16 Gluc NH<sub>2</sub>, when the compounds were tested side by side.

Table 9  
cAMP Induction by E16/Lactam Glucagon Analogs

| Percent Potency Relative to Native Ligand |       |          |
|-------------------------------------------|-------|----------|
| Peptide                                   | GRec  | GLP-1Rec |
| E24K28 Gluc-NH2 Lac                       | 196.4 | 12.5     |
| E16K20 Gluc-NH2 Lac                       | 180.8 | 63.0     |
| K12E16 Gluc-NH2 Lac                       | 154.2 | 63.3     |
| K20E24 Gluc-NH2 Lac                       | 120.2 | 8.1      |
| E16 Gluc-NH2                              | 187.2 | 17.8     |
| E16, K20 Gluc-NH2                         | 130.1 | 41.5     |
| Glucagon                                  | 100.0 | 0.8      |
| Gluc-NH2                                  | 43.2  | 4.0      |

5

Table 10  
cAMP Induction by GLP-1 17-26 Glucagon Analogs

|                                    | Glucagon Receptor |       | GLP-1 Receptor |       |
|------------------------------------|-------------------|-------|----------------|-------|
| Peptide                            | EC50(nM)          | StD   | EC50(nM)       | StD   |
| GLP-1                              |                   |       | 0.023          | 0.002 |
| Gluc-NH2                           | 0.159             | 0.023 |                |       |
| E16 GLP-1                          |                   |       | 0.009          | 0.000 |
| E16 Glucagon-NH2                   | 0.072             | 0.007 |                |       |
| E16 GLP(17-26)Glu(27-29)-NH2       | 0.076             | 0.004 | 0.014          | 0.001 |
| E16 GLP(17-29)-NH2                 | 0.46              | 0.023 | 0.010          | 0.000 |
| E16 GLP(17-29)-NH2 E24, K28        | 0.23              | 0.020 | 0.007          |       |
| E16 GLP(17-29)-NH2 E24, K28 Lactam | 0.16              | 0.017 | 0.007          | 0.000 |

10

EXAMPLE 15

Stability Assay for glucagon Cys-maleimido PEG analogs

Each glucagon analog was dissolved in water or PBS and an initial HPLC analysis was conducted. After adjusting the pH ( 4, 5, 6, 7), the samples were incubated over a specified time period at 37°C and re-analyzed by HPLC to determine the integrity of the peptide. The concentration of the specific peptide of interest was determined and the percent remaining intact was calculated relative to the initial analysis. Results for Glucagon Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub> are shown in Figs. 1 and 2.

20

EXAMPLE 16

The following glucagon peptides are constructed generally as described above in Examples 1-11:

In all of the following sequences, "a" means a C-terminal amide.

- 5  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 70)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 71)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 72)
- 10  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 73)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 74)  
HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 75)
- 15  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 76)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 77)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 78)
- 20  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 79)  
HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 80)
- 25  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 81)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 82)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 83)
- 30  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 84)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 85)

HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 86)

X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 87)

5 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 88)

X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 89)

X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 90)

X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 91)

X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 92)

10 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 93)

X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 94)

X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 95)

X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 96)

X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 97)

15 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 98)

X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 99)

X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 100)

X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 101)

X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 102)

20 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 103)

Wherein in the preceding sequences, X1 = (Des-amino)His

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 104)

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 105)

25 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 106)

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 107)

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 108)

HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 109)

HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 110)

30 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 111)

HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 112)

HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 113)

HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 114)

HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 115)

35 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 116)

- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 117)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 118)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 119)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 120)
- 5   Wherein in the preceding sequences X2 = Aminoisobutyric acid
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFLVQW LMNTa (SEQ ID NO: 121)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFLVQW LMNTa (SEQ ID NO: 122)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFLVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 123)
- 10   HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFLVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 124)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFLVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 125)  
HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFLVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 126)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFLVQW LMNTa (SEQ ID NO: 127)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFLVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 128)
- 15   HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFLVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 129)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFLVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 130)  
HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFLVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 131)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 132)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 133)
- 20   HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 134)  
HX2QGT FTSDY SKYLD BQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 135)  
HX2QGT FTSDY SKYLD BQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 136)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 137)  
Wherein in the preceding sequences X2 = (D-Ala)
- 25
- HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFLVQW LMNTa (SEQ ID NO: 138)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFLVQW LMNTa (SEQ ID NO: 139)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFLVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 140)
- 30   HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFLVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 141)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFLVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 142)  
HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFLVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 143)
- 35

- HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFBVQW LMNTa (SEQ ID NO: 144)
- HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFBVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 145)
- HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFBVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 146)
- HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFBVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 147)
- HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFBVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 148)
- HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 149)
- HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 150)
- HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 151)
- HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 152)
- HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 153)
- HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 154)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFBVQW LMNTa (SEQ ID NO: 155)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFBVQW LMNTa (SEQ ID NO: 156)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFBVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 157)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFBVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 158)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFBVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 159)
- X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFBVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 160)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFBVQW LMNTa (SEQ ID NO: 161)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFBVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 162)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFBVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 163)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFBVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 164)
- X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFBVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 165)
- X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 166)
- X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 167)
- X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 168)
- X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 169)



X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 170)

X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 171)

Wherein in the preceding sequences X1 = (Des-amino)His

- 5 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 172)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 173)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 174)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 175)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 176)
  - 10 HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 177)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 178)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 179)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 180)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 181)
  - 15 HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 182)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LMNTa (SEQ ID NO: 183)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 184)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 185)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LVKGa (SEQ ID NO: 186)
  - 20 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 187)
  - HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 188)
- Wherein in the preceding sequences X2 = Aminoisobutyric acid

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 189)

- 25 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 190)
- HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 191)
- HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 192)
- HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 193)
- HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 194)
- 30 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 195)
- HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 196)
- HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 197)
- HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 198)
- HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 199)
- 35 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFAIW LMNTa (SEQ ID NO: 200)

- HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 201)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 202)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 203)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 204)  
 5 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 205)

Wherein in the preceding sequences X2 = (D-Ala)

- HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 206)  
 HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 207)  
 10 HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 208)  
 HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 209)  
 HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 210)  
 HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 211)  
 HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 212)  
 15 HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 213)  
 HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 214)  
 HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 215)  
 HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 216)  
 HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 217)  
 20 HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 218)  
 HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 219)  
 HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 220)  
 HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 221)  
 HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 222)  
 25  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 223)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 224)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 225)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 226)  
 30 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 227)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 228)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 229)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 230)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 231)  
 35 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 232)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 233)

- X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 234)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 235)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 236)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 237)  
 5 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 238)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 239)  
 Wherein in the preceding sequences X1 = (Des-amino)His; and wherein the C\* is a  
 Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys  
 attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the  
 10 C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 240)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 241)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 242)  
 15 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 243)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 244)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 245)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 246)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 247)  
 20 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 248)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 249)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 250)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 251)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 252)  
 25 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 253)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 254)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 255)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 256)  
 Wherein in the preceding sequences X2 = Aminoisobutyric acid; and wherein the C\*  
 30 is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys  
 attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the  
 C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 257)  
 35 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 258)

- 99
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 259)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 260)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 261)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 262)  
 5 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 263)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 264)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 265)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 266)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 267)  
 10 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 268)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 269)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 270)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 271)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 272)  
 15 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 273)  
 Wherein in the preceding sequences X2 = (D-Ala); and wherein the C\* is a Cys, or a  
 Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a  
 polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys  
 attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.  
 20  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 274)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 275)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO:  
 276)  
 25 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO:  
 277)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO:  
 278)  
 HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO:  
 30 279)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 280)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 281)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 282)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 283)

- HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 284)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 285)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 286)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 287)  
5 HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 288)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 289)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 290)
- X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 291)  
10 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 292)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 293)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 294)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 295)  
X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 296)  
15 X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 297)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 298)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 299)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 300)  
X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 301)  
20 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 302)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 303)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 304)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 305)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 306)  
25 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 307)
- Wherein in the preceding sequences X1 = (Des-amino)His; and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.
- 30
- HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 308)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 309)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 310)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 311)  
35 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 312)

- HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 313)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 314)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 315)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 316)  
 5 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 317)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 318)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 319)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 320)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 321)  
 10 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 322)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 323)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 324)  
 Wherein in the preceding sequences X2 = Aminoisobutyric acid; and wherein the C\*  
 is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys  
 15 attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the  
 C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.
- HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 325)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 326)  
 20 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 327)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 328)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 329)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 330)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 331)  
 25 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 332)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 333)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 334)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 335)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 336)  
 30 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 337)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 338)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 339)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 340)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 341)

Wherein in the preceding sequences X2 = (D-Ala); and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

5

HSQGT FTSDY SKYLD C\*RRAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 342)

HSQGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 343)

HSQGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 344)

HSQGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 345)

10 X1SQGT FTSDY SKYLD C\*RRAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 346)

X1SQGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 347)

X1SQGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 348)

X1SQGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 349)

Wherein X1 = (Des-amino)His; and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

20 HX2QGT FTSDY SKYLD C\*RRAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 350)

HX2QGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 351)

HX2QGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 352)

HX2QGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 353)

Wherein X2 = Aminoisobutyric acid; and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

30 HX2QGT FTSDY SKYLD C\*RRAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 354)

HX2QGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 355)

HX2QGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 356)

HX2QGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 357)

Wherein X2 = (D-Ala); and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol

of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

- HSEGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 358)  
 5 HSEGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 359)  
 HSEGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO: 360)  
 HSEGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO: 361)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 362)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 363)  
 10 X1SEGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO: 364)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO: 365)  
 Wherein X1 = (Des-amino)His; and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a  
 15 polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

- HX2EGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 366)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 367)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO: 368)  
 20 HX2EGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO: 369)  
 Wherein X2 = (D-Ala) ; and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

- 25  
 HX2EGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 370)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 371)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO: 372)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO: 373)  
 30 Wherein X2 = (D-Ala) ; and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.



- HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 374)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 375)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 376)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 377)  
5 HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 378)  
HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 379)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 380)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 381)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 382)  
10 HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 383)  
HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 384)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 385)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 386)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 387)  
15  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 388)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 389)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 390)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 391)  
20 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 392)  
X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 393)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 394)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 395)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 396)  
25 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 397)  
X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 398)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 399)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 400)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 401)  
30 Wherein in the preceding sequences X1 = (Des-amino)His  
  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 402)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 403)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 404)  
35 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 405)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 406)

- HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 407)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 408)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 409)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 410)
- 5 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 411)
- HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 412)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 413)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 414)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 415)
- 10 Wherein in the preceding sequences X2 = Aminoisobutyric acid

- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 416)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 417)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 418)
- 15 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 419)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 420)
- HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 421)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 422)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 423)
- 20 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 424)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 425)
- HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 426)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 427)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 428)
- 25 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 429)
- Wherein in the preceding sequences X2 = (D-Ala)

- HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 430)
- HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 431)
- 30 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 432)
- HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 433)
- HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 434)
- HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 435)
- HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 436)
- 35 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 437)
- HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 438)

- HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 439)  
HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 440)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 441)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 442)  
5 HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 443)

- X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 444)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 445)  
10 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 446)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 447)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 448)  
X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 449)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 450)  
15 X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 451)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 452)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 453)  
X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 454)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 455)  
20 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 456)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 457)

Wherein in the preceding sequences X1 = (Des-amino)His

- HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 458)  
25 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 459)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 460)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 461)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 462)  
HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 463)  
30 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 464)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 465)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 466)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 467)  
HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 468)  
35 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 469)  
HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 470)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 471)

Wherein in the preceding sequences X2 = Aminoisobutyric acid

- 5 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 472)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 473)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 474)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 475)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 476)  
 10 HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 477)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 478)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 479)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 480)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 481)  
 15 HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 482)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 483)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 484)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 485)  
 Wherein in the preceding sequences X2 = (D-Ala)

20

The following glucagon peptides with a GLP-1/glucagon activity ratio of about 5 or more are also constructed generally as described above in Examples 1-11. Generally, in these peptides, AIB at position 2 provides DPP IV resistance but also significantly reduces glucagon activity.

25

- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 486)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNC\*a (SEQ ID NO: 487)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (SEQ ID NO: 488)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (lactam @ 16-20;  
 30 SEQ ID NO: 489)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (SEQ ID NO: 490)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20;  
 SEQ ID NO: 491)

- Wherein in the preceding sequences X2=AIB, and wherein the C\* is a Cys, or a Cys  
 35 attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a

polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 492)
- 5 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNC\*a (SEQ ID NO: 493)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (SEQ ID NO: 494)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 495)
- 10 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (SEQ ID NO: 496)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 497)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 498)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNC\*a (SEQ ID NO: 499)
- 15 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (SEQ ID NO: 500)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 501)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (SEQ ID NO: 502)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 503)
- 20

Wherein in the preceding sequences X2=AIB, and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

25

The following glucagon peptides which are GLP-1/glucagon co-agonists are also constructed generally as described above in Examples 1-11. Formation of a lactam bridge between amino acids 16 and 20 restores the reduction in glucagon activity caused by the substitution at position 2.

30

HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 504)

Wherein in the preceding sequence X2=AIB, and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

35

- X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 505)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNC\*a (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 506)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (lactam @ 16-20;  
5 SEQ ID NO: 507)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (lactam @ 16-20;  
SEQ ID NO: 508)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20;  
SEQ ID NO: 509)  
10 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 510)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 511)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNC\*a (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 512)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20;  
SEQ ID NO: 513)  
15 Wherein in the preceding sequences X1=DMIA (alpha, alpha-dimethyl imidazole  
acetic acid), and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer,  
or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD  
average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of  
about 40 kD average weight.  
20  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (optionally with lactam @ 16-20; SEQ  
ID NO: 514)  
Wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively  
the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or  
25 alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average  
weight.  
  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 517)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 528)  
30 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSC\*a (SEQ ID NO: 531)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNGG PSSGA PPPSC\*C\*a (SEQ ID NO:  
532)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (SEQ ID NO: 533)  
Wherein in the preceding sequence X2=AIB, and wherein the C\* is a Cys, or a Cys  
35 attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a

polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.

- HSQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 518)
- 5 X1SQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 519)
- X1SQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFLAW LMNC\*a (SEQ ID NO: 520)
- X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (SEQ ID NO: 529)
- X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 530)
- 10 Wherein in the preceding sequences X1=DMIA (alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid), and wherein the C\* is a Cys, or a Cys attached to a hydrophilic polymer, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 20 kD average weight, or alternatively the C\* is a Cys attached to a polyethylene glycol of about 40 kD average weight.
- 15 HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMNTGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 521)
- HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMNGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 522)
- HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMKGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 523)
- HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LVKGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 524)
- HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMDGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 525)
- 20 HSQGT FTSDYSKYLD ERRAK DFVQW LMDGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 526)
- HABGT FTSDV SSYLE GQAAK EFLAW LVKGGa (SEQ ID NO: 527)
- X1X2QGT FTSDY SKYLD ERX5AK DFVX3W LMNX4 (SEQ ID NO: 61)
- wherein
- 25 X1=His, D-histidine, desaminohistidine, hydroxyl-histidine, acetyl-histidine, homo-histidine or alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid (DMIA) N-methyl histidine, alpha-methyl histidine, or imidazole acetic acid,
- X2=Ser, D-serine, Ala, Val, glycine, N-methyl serine or aminoisobutyric acid (AIB), N-methyl alanine and D-alanine.
- 30 X3=Ala, Gln or Cys-PEG
- X4=Thr-CONH2 or Cys-PEG or GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 515) or GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID NO: 516)
- Provided that when X3 is Cys-PEG, X4 is not Cys-PEG or GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID NO: 516), and when X2=Ser, X1 is not His.

X5=Ala or Arg

X1X2QGT FTSDY SKYLD EQ X5AK EFI X3W LMNX4 (SEQ ID NO: 62)

wherein

5 X1=His, D-histidine, desaminohistidine, hydroxyl-histidine, acetyl-histidine, homo-histidine or alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid (DMIA), N-methyl histidine, alpha-methyl histidine, or imidazole acetic acid

X2=Ser, D-serine, Ala, Val, glycine, N-methyl serine or aminoisobutyric acid (AIB), N-methyl alanine and D-alanine.

10 X3=Ala, Gln or Cys-PEG

X4=Thr-CONH2 or Cys-PEG or GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 515) or GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID NO: 516)

Provided that when X3 is Cys-PEG, X4 is not Cys-PEG or GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID NO: 516), and when X2=Ser, X1 is not His.

15 X5=Ala or Arg

Any of the preceding sequences can include additional modifications, e.g., 1, 2, 3, 4 or 5 modifications that do not destroy activity, including but not limited to W10 or R20 substitutions that can be used to enhance potency. Any of the preceding sequences can also be produced without the modifications that confer DPP IV resistance, i.e. in which the native His is at position 1 and the native Ser is at position 2. In addition, any of the preceding compounds may optionally be linked to a conjugate, such as a heterologous polypeptide, an immunoglobulin or a portion thereof (e.g. Fc region), a targeting agent, a diagnostic label, or a diagnostic or therapeutic agent.



EXAMPLE 17

The following glucagon peptides modified to comprise the c-terminal extension of SEQ ID NO: 26 linked to the carboxy terminus of the glucagon peptide were constructed generally as described above in Examples 1-11 and assayed for activity at the GLP-1 and glucagon receptors using the *in vitro* assay described in Example 14.

Table 11 represents the activity of various glucagon analogs at the glucagon and GLP-1 receptors. The data shows that for glucagon analogs comprising the c-terminal extension of SEQ ID NO: 26, amino acid substitutions at positions 16, 20, 28 and 29 can impact the analogs activity at the GLP-1 receptor.

Table 11  
Glucagon-Cex  
Structure Activity Relationship

15

| Glucagon Peptide                                                               | EC50 (nM) |     | Relative Potency (%) |     |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----|----------------------|-----|
|                                                                                | EC50 (nM) |     | Relative Potency (%) |     |
| -MNT <sup>29</sup> (SEQ ID NO: 1)                                              | 0.086     | 100 |                      |     |
| -MNTG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 521)                                 | 0.14      | 61  | 1.19                 | 2   |
| -MNGG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 522)                                 | 0.28      | 30  | 0.31                 | 8   |
| -MKGG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 523)                                 | 0.61      | 14  | 0.80                 | 3   |
| -VKGG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 524)                                 | 1.16      | 7   | 0.21                 | 12  |
| -MDGG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 525)                                 | 0.12      | 72  | 0.13                 | 19  |
| E <sup>16</sup> K <sup>20</sup> -MDGG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 526) | 0.22      | 39  | 0.020                | 125 |
| GLP-1-VKGG <sup>30</sup> (SEQ ID NO: 527)                                      |           |     | 0.025                | 100 |

EXAMPLE 18

Table 12 represents *in vitro* data accumulated for various glucagon peptides comparing their relative activities at the glucagon and GLP-1 receptors.

5            Table 12: COMPARISON OF AGONISTS AND CO-AGONISTS w/ and w/o PEG

| CONTROLS | % Potency Relative to Native |       |
|----------|------------------------------|-------|
|          | GR                           | GL-1R |
| Glucagon | 100                          | 0.78  |
| GLP-1    | <0.01                        | 100   |

|                                                            | Parent w/o PEG               |        | Parent w/PEG                 |        |
|------------------------------------------------------------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|
|                                                            | % Potency Relative to Native |        | % Potency Relative to Native |        |
| AGONISTS                                                   | GR                           | GLP-1R | GR                           | GLP-1R |
| Chimera AIB2, Cys24 (SEQ ID NO: 486)                       | 15.4                         | 160.6  | 2.6                          | 82.5   |
| Chimera AIB2, Cys29 (SEQ ID NO: 487)                       | 20.1                         | 124.6  | 5.6                          | 54.3   |
| Chimera AIB2, Gly29,30 Cys40 Cex (SEQ ID NO: 488)          | 2.2                          | 359.1  | 0.3                          | 68.8   |
| Chimera AIB2, Gly29,30 Cys40 Cex Lactam (SEQ ID NO: 489)   | 14.2                         | 169.6  | 3.2                          | 63.6   |
| Chimera AIB2, Gly29,30 Cys24 Cex (SEQ ID NO: 490)          | 2.5                          | 457.8  | 0.2                          | 95.4   |
| Chimera AIB2, Gly29,30 Cys24 Cex Lactam (SEQ ID NO: 491)   | 25.2                         | 381.5  | 1.4                          | 96.4   |
| E16, K20AIB2, A18 Cys24 (SEQ ID NO: 492)                   | --                           | --     | 1.1                          | 73.5   |
| E16, K20AIB2, A18 Gly29,30 Cys24 Cex (SEQ ID NO: 496)      | --                           | --     | 0.1                          | 88.5   |
| CO-AGONISTS                                                | GR                           | GLP-1R | GR                           | GLP-1R |
| Chimera DMIA1, Cys24 Lactam (SEQ ID NO: 505)               | 160.7                        | 82.5   | 19.1                         | 12.5   |
| Chimera AIB2, Cys24 Lactam (SEQ ID NO: 504)                | 114.2                        | 230.4  | 9.2                          | 38.0   |
| Chimera DMIA1, Cys29 Lactam (SEQ ID NO: 506)               | --                           | --     | --                           | --     |
| Chimera DMIA1, Gly29,30 Cys40 Cex Lactam (SEQ ID NO: 507)  | --                           | --     | --                           | --     |
| E16, K20 DMIA1, Gly29,30 Cys40 Cex Lactam (SEQ ID NO: 508) | --                           | --     | --                           | --     |
| Chimera DMIA1, Gly29,30 Cys24 Cex Lactam (SEQ ID NO: 509)  | --                           | --     | --                           | --     |
| E16, K20 DMIA1, Cys24 Lactam (SEQ ID NO: 510)              | --                           | --     | 64.1                         | 9.3    |
| E16, K20 AIB2, Cys24 Lactam (SEQ ID NO: 517)               | 108.3                        | 96.9   | 15.8                         | 31.0   |
| Chimera Cys24 (SEQ ID NO: 518)                             | --                           | --     | 19.8                         | 29.3   |
| E16, K20 DMIA1, Gly29,30 Cys24 Cex Lactam (SEQ ID NO: 513) | 116.0                        | 78.3   | 12.6                         | 11.3   |
| Chimera DMIA1, Cys29 (SEQ ID NO: 520)                      | --                           | --     | 5.3                          | 27.3   |
| Chimera DMIA1, Cys24 (SEQ ID NO: 519)                      | 28.9                         | 64.5   | 6.9                          | 19.3   |

## Claims:

1. A non-native glucagon peptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 55 or an analog of SEQ ID NO: 55, wherein said analog is not a naturally occurring peptide and said analog differs from SEQ ID NO: 55 by 1 to 3 amino acid modifications, selected from positions 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28, and 29, wherein said glucagon peptide exhibits at least 20% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor.
2. The glucagon peptide of claim 1 wherein said glucagon peptide comprises SEQ ID No: 55.
3. The glucagon peptide of claim 1 wherein said glucagon peptide comprises SEQ ID NO: 56.
4. The glucagon peptide of any of claims 1, 2 or 3 wherein said glucagon peptide further comprises a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 and SEQ ID NO: 65 linked to the carboxy terminus of said glucagon peptide.
5. The glucagon peptide of claim 2 or 3 wherein said glucagon peptide further comprises SEQ ID NO: 26 linked to the carboxy terminus of said glucagon peptide.
6. The glucagon peptide of any of claims 1, 2 or 3 which comprises a lactam bridge between two amino acids selected from the group consisting of amino acids at positions 16 and 20, amino acids at positions 12 and 16, amino acids at positions 20 and 24, and amino acids at positions 24 and 28.
7. The glucagon peptide of claim 6 wherein the lactam bridge is between amino acids at positions 16 and 20.

8. The glucagon peptide of claim 1 wherein said glucagon peptide comprises SEQ ID No: 33.

9. The glucagon peptide of claim 1 wherein wherein the amino acid at position 28 is Asp, Asn or Lys and the amino acid at position 29 is Gly or Thr.

10. The glucagon peptide of claim 1 wherein said glucagon peptide comprises an analog of SEQ ID No: 55 that differs from SEQ ID NO: 55 by 1 to 2 amino acids.

10

11. The glucagon peptide of claim 1 wherein said glucagon peptide comprises an analog of SEQ ID No: 55 that differs from SEQ ID NO: 55 by 1 amino acid.

12. The glucagon peptide of claim 11 wherein said glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 53.

13. The glucagon peptide of claim 12 wherein the amino acid at position 3 is glutamine.

20

14. The glucagon peptide of claim 1 wherein the amino acid at position 3 is glutamic acid.

15. The glucagon peptide of any of claims 1-13 that exhibits at least 10% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least 50% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor.

16. The glucagon peptide of any of claims 1-13 that exhibits at least 40% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least 40% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor.

30

17. The glucagon peptide of any of claims 1-13 that exhibits at least 60% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least 60% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor.

5 18. The glucagon peptide of any of claims 1-12 and 14 that exhibits 0.1-10% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least 20% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor.

10 19. The glucagon peptide of any of claims 1-12 and 14 that exhibits 1-10% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor and at least 20% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor.

15 20. The glucagon peptide of any of claims 1-19 wherein the amino acid at position 16 is glutamic acid, the amino acid at position 20 is lysine, and the C-terminal carboxylic acid group is replaced with an amide, optionally with a lactam bridge between the glutamic acid at position 16 and the lysine at position 20.

20 21. The glucagon peptide of claim 20 wherein a polyethylene glycol chain is covalently linked to the side chain of an amino acid at position 17, 21 or 24 or at the C-terminal amino acid.

22. The glucagon peptide of claim 20 wherein the amino acid at position 28 or 29 comprises an acidic amino acid.

25 23. The glucagon peptide of any of claims 1, 5, 8, 20, 21, or 22 wherein the amino acid at position 1 or 2 is modified to exhibit reduced susceptibility to cleavage by dipeptidyl peptidase IV.

30 24. The glucagon peptide of claim 1 wherein the peptide comprises the sequence of  $X_1X_2QGTFTSDY\text{SKYLD}ERX_5AKDFVX_3WLMNX_4$  (SEQ ID NO: 61) or  $X_1X_2QGTFTSDY\text{SKYLD}EQX_3AKEFI\text{X}_3WLMNX_4$  (SEQ ID NO: 62), with the proviso that when  $X_3$  is Cys-PEG,  $X_4$  is not Cys-PEG or GGPSSGAPPPSC-PEG, and when  $X_2$  is serine,  $X_1$  is not histidine.

25. The glucagon peptide of claim 24 wherein X<sub>3</sub> is Cys-PEG.
26. The glucagon peptide of claim 25 wherein X<sub>4</sub> is GGPSSGAPPPS.
- 5 27. The glucagon peptide of claim 24 wherein X<sub>4</sub> is GGPSSGAPPPSC-PEG.
- 10 28. The glucagon peptide of any of claims 24-27 which further comprises a lactam bridge between amino acids at positions 16 and 20.
- 15 29. The glucagon peptide of claim 1 wherein the peptide comprises the sequence of NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-COOH (SEQ ID NO: 9) wherein Xaa is selected from the group consisting of Met, Leu and Nle.
- 20 30. The glucagon peptide of claim 1 wherein the peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 and SEQ ID NO: 44.
31. The glucagon peptide of claim 1 wherein the peptide comprises the sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 and SEQ ID NO: 15.
- 25 32. The glucagon peptide of claim 23 wherein amino acid at position 2 is selected from the group consisting of d-serine, alanine, D-alanine, valine, glycine, N-methyl serine, N-methyl alanine, and amino isobutyric acid.
- 30 33. The glucagon peptide of claim 23 wherein amino acid at position 1 is selected from the group consisting of d-histidine, desaminohistidine, hydroxyl-histidine, acetyl-histidine homo-histidine, N-methyl histidine, alpha-methyl histidine, imidazole acetic acid, and alpha, alpha-dimethyl imidazole acetic acid (DMIA).

34. The glucagon peptide of any of claims 1-23 further comprising a hydrophilic moiety covalently bound at position 17, 21 or 24 or at the C-terminal amino acid of the glucagon peptide.

5 35. The glucagon peptide of claim 34 wherein said hydrophilic moiety is a polyethylene glycol chain.

36. The glucagon peptide of claim 1 or 31 wherein the glucagon peptide further comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26,  
10 SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 and SEQ ID NO: 65.

37. The glucagon peptide of claim 36 wherein the glucagon peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 33 wherein the amino acid at position 28 is aspartic acid, the amino acid at position 29 is glycine and the amino acid sequence of  
15 SEQ ID NO: 29 is covalently linked to the carboxy terminus of SEQ ID NO: 33.

38. The glucagon peptide of claim 37 wherein the peptide comprises the sequence of SEQ ID NO: 64.

20 39. The glucagon peptide of claim 1 wherein the glucagon peptide comprises SEQ ID NO: 20 wherein the amino acid at position 20 is selected from the group consisting of arginine, ornithine and citrulline.

40. The glucagon peptide of claim 1 wherein the peptide comprises a  
25 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11,

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 66),

30 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 67),

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 68),

35 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 69),

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 16),

5 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 17), and

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 18),  
10 and SEQ ID NO: 55,

wherein the Xaa at position 28 of the peptide is asparagine or aspartic acid;

the Xaa at position 29 of the peptide is threonine or glycine; and

15 R is SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29, COOH or CONH<sub>2</sub>.

41. The glucagon peptide of claim 40 wherein R is CONH<sub>2</sub>.

42. The glucagon peptide of claim 40 wherein the peptide comprises the  
20 sequence of SEQ ID NO: 10.

43. The glucagon peptide of claim 40 wherein the peptide comprises the  
sequence of SEQ ID NO: 11.

25 44. The glucagon peptide of claim 41 wherein the peptide further  
comprises a polyethylene glycol chain covalently bound to an amino acid residue at  
position 16, 17, 21 or 24 or at the C-terminal amino acid, and pharmaceutically  
acceptable salts of said glucagon peptide, with the proviso that when the peptide  
comprises SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 13 the  
30 polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 17,  
21 or 24, when the peptide comprises SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO: 15 the  
polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 16,  
17 or 21, when the peptide comprises SEQ ID NO: 55, the polyethylene glycol chain  
is covalently bound to an amino acid position at position 21 or 24 and when the  
35 peptide comprises SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 18 the  
polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 17  
or 21.



45. The glucagon peptide of claim 44 wherein the polyethylene glycol chain has a molecular weight selected from the range of about 1,000 to about 5,000 Daltons.

5

46. The glucagon peptide of claim 44 wherein the polyethylene glycol chain has a molecular weight of about 40,000 Daltons.

47. The glucagon peptide of claim 39 wherein the peptide further  
10 comprises an additional amino acid added to the carboxy terminus of the peptide, said additional amino acid comprising an amide group in place of the terminal carboxylic acid group of the native amino acid.

48. The glucagon peptide of claim 40 further comprising an extension  
15 peptide bound to amino acid 29 of said glucagon peptide, said amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28.

49. The glucagon peptide of claim 48 wherein the amino acid at position  
20 28 is aspartic acid, the amino acid at position 29 is glycine and the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 is covalently linked to amino acid 29 of said glucagon peptide.

25 50. A glucagon peptide comprising the sequence of  
NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-  
Xaa-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 2);  
NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-  
Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 3);  
30 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-  
Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 4); and  
glucagon agonist analogs of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO. 4,  
wherein R is COOH or CONH<sub>2</sub>, and the side chain of an amino acid residue at

position 17, 21 or 24 or at the C-terminal amino acid of said glucagon peptide further comprises a hydrophilic moiety covalently bound to the amino acid residue, and pharmaceutically acceptable salts of said glucagon peptide.

5           51.    The glucagon peptide of claim 50, wherein R is CONH<sub>2</sub> and said hydrophilic moiety is a polyethylene glycol chain.

          52.    The glucagon peptide of claim 51 wherein the peptide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 and  
10   SEQ ID NO: 25.

          53.    The glucagon peptide of claim 52 wherein the polyethylene glycol chain has a molecular weight selected from the range of about 1,000 to about 5,000 Daltons.

15

          54.    The glucagon peptide of claim 52 wherein the polyethylene glycol chain has a molecular weight of at least about 20,000 Daltons.

          55.    A homo dimer comprising two glucagon peptides of claim 37 bound to  
20   one another through a linker.

          56.    A pharmaceutical composition comprising the glucagon agonist of claim 1, or pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

25

          57.    A kit for administering a glucagon agonist to a patient in need thereof, said kit comprising

          a pharmaceutical composition of claim 56; and

          a device for administering said composition to a patient.

30

          58.    A method of treating hypoglycemia using a pre-formulated aqueous composition, said method comprising the steps of administering an effective amount of a pharmaceutical composition of claim 56.

59. A method of treating diabetes, said method comprising administering an effective amount of a pharmaceutical composition of claim 56.

5 60. A method of causing temporary paralysis of the intestinal tract, said method comprising administering an effective amount of a pharmaceutical composition of claim 56.

61. A method of reducing weight gain or inducing weight loss, said  
10 method comprising administering an effective amount of a composition comprising a glucagon agonist comprising a glucagon peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 55, wherein amino acid 29 of the glucagon peptide is bound to a second peptide  
15 through a peptide bond, and said second peptide comprises sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 and SEQ ID NO: 65.

62. A method of reducing weight gain or inducing weight loss, said  
20 method comprising administering an effective amount of a composition comprising a glucagon peptide of claim 36.

63. The method of claim 61 wherein the glucagon agonist further comprise a polyethylene glycol chain bound to the glucagon peptide at position 17, 21 or 24 and  
25 said polyethylene chain has a molecular weight selected from the range of about 5,000 to about 40,000 Daltons, with the proviso that when the peptide comprises SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 13 the polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 16, 17, 21 or 24, when the peptide comprises SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO: 15 the polyethylene glycol  
30 chain is covalently bound to an amino acid residue at position 16, 17 or 21, when the peptide comprises SEQ ID NO: 55, the polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid position at position 21 or 24, and when the peptide comprises SEQ

ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 18 the polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 17 or 21.

64. The method of claim 58 wherein the glucagon agonist further comprise  
5 a polyethylene glycol chain bound to the glucagon peptide at position 16, 17, 21 or 24  
and said polyethylene chain has a molecular weight selected from the range of about  
5,000 to about 40,000 Daltons, with the proviso that when the peptide comprises SEQ  
ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 13 the polyethylene  
glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 17, 21 or 24,  
10 when the peptide comprises SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO: 15 the polyethylene  
glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 16, 17 or 21, and  
when the peptide comprises SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO: 18 the  
polyethylene glycol chain is covalently bound to an amino acid residue at position 17  
or 21.

15

65. A glucagon peptide comprising a sequence selected from and of the  
sequences designated by SEQ ID NO: 70 through SEQ ID NO: 514.

1/24

Fig. 1: Stability of Glucagon Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub> (37°C)

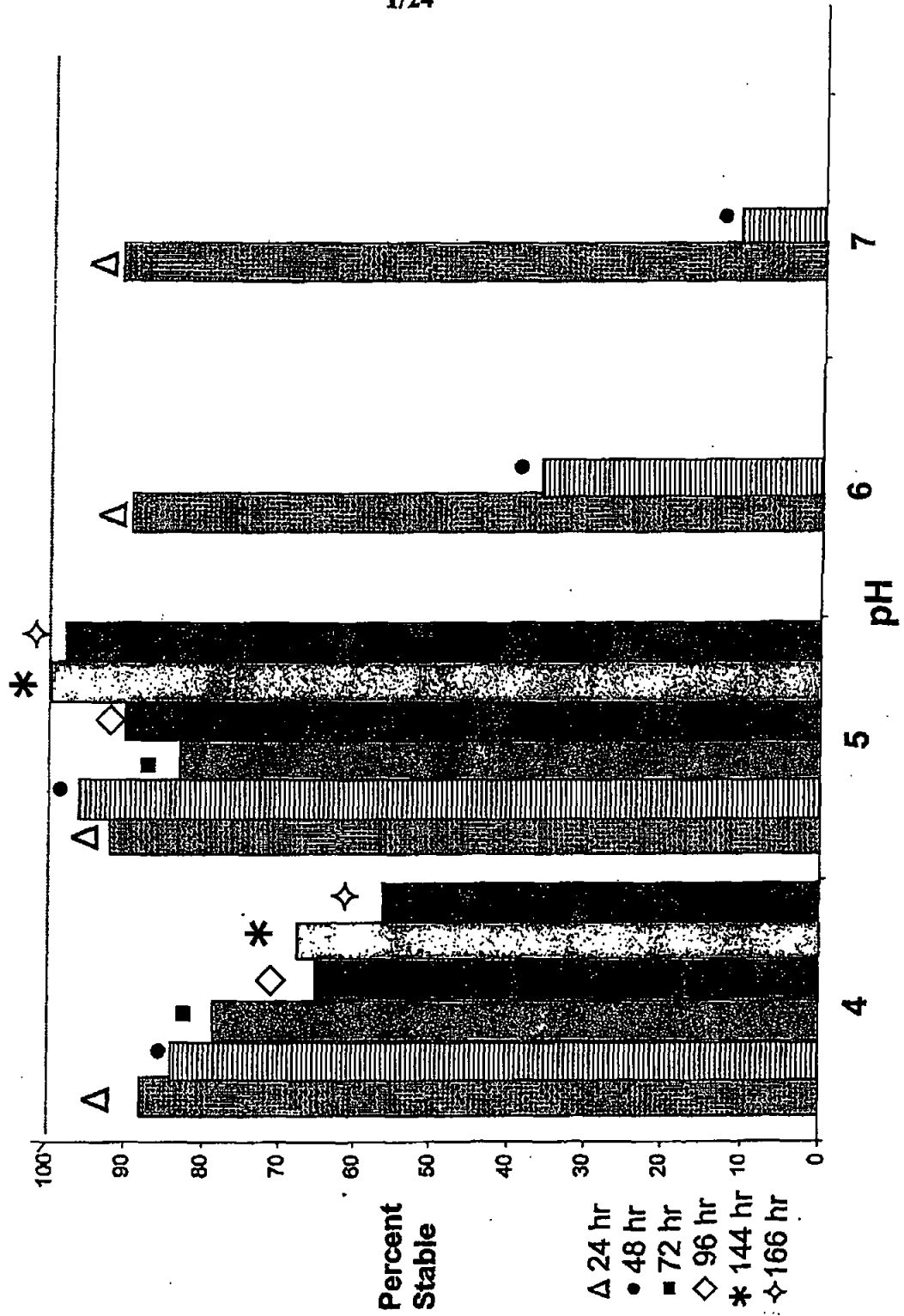
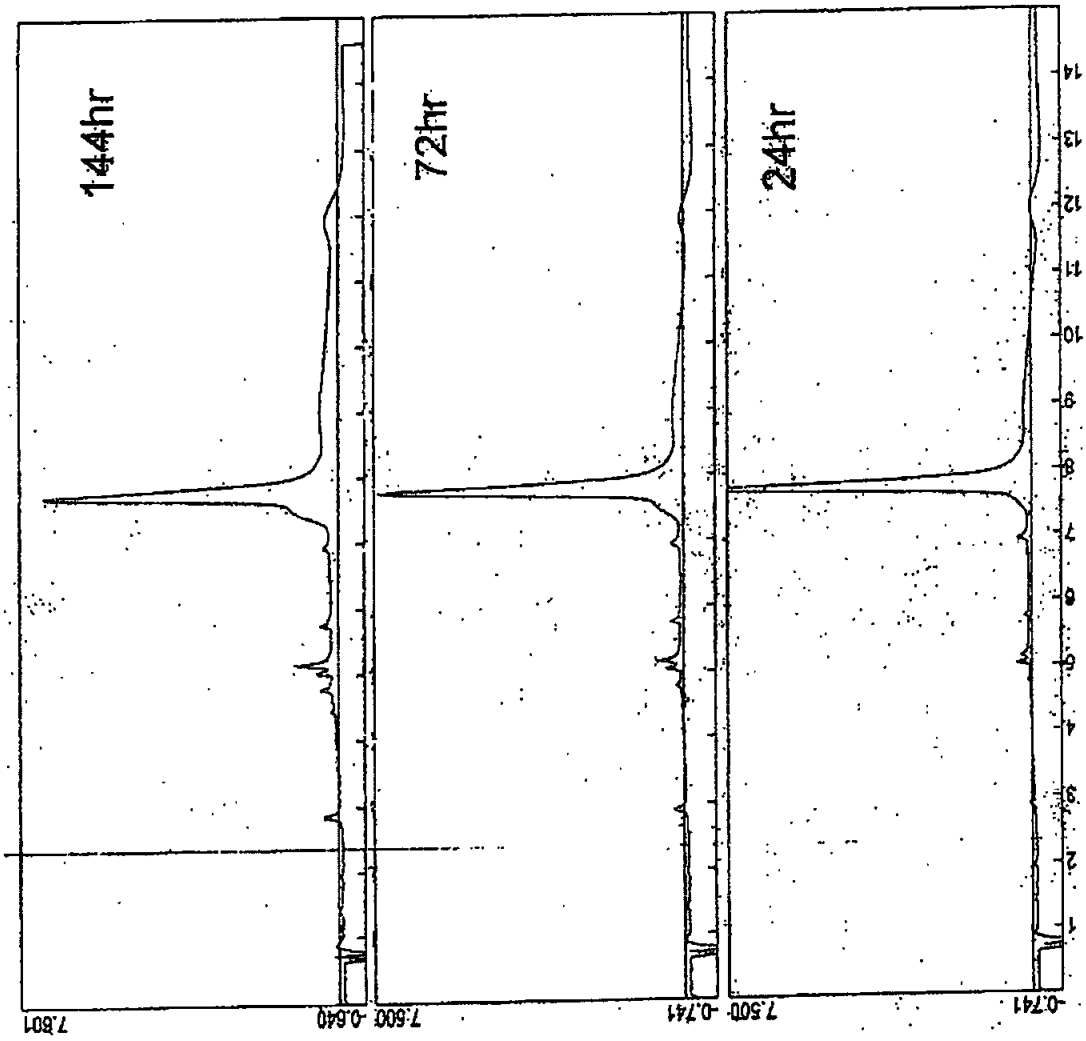


Fig. 2: HPLC Analysis of Glucagon Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub>  
at pH 5 (37°C)



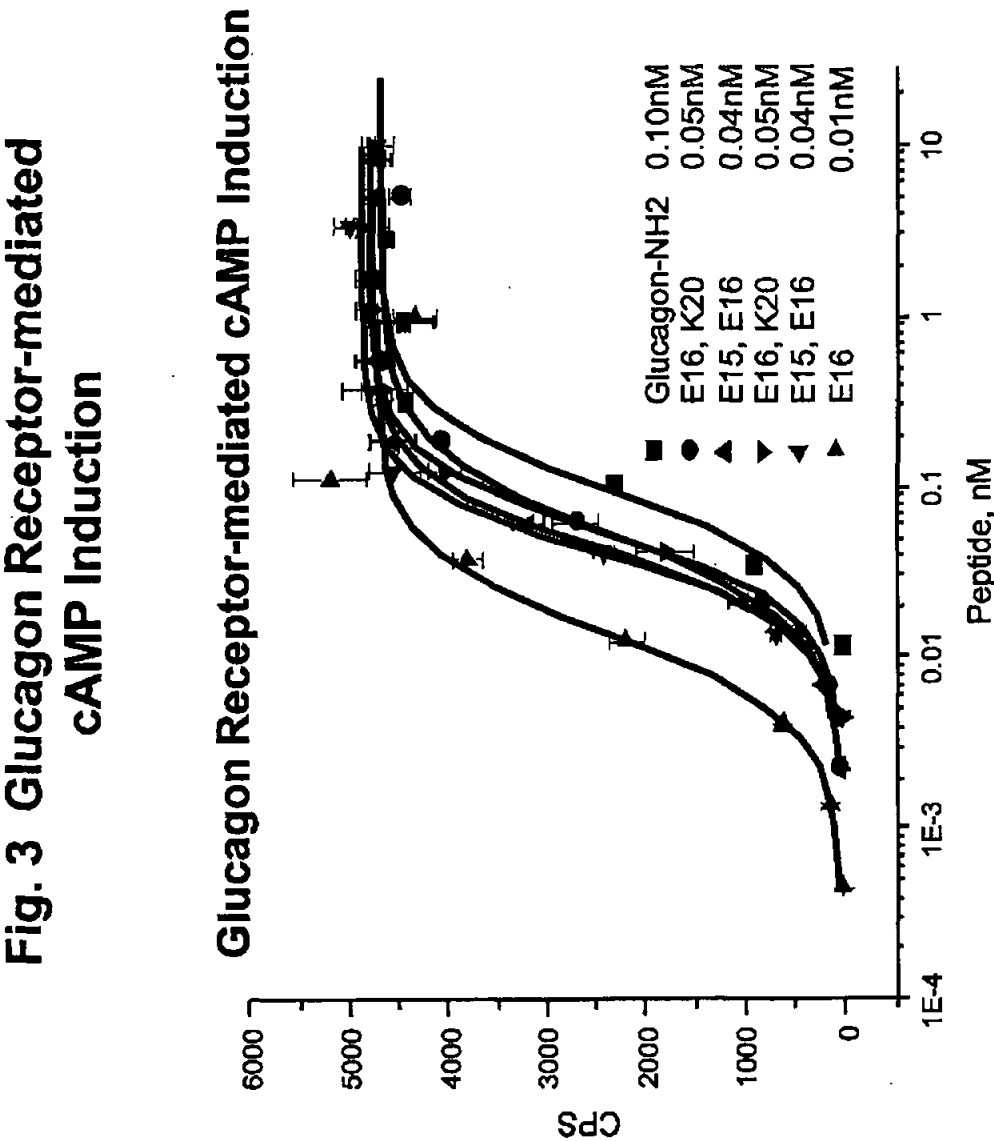
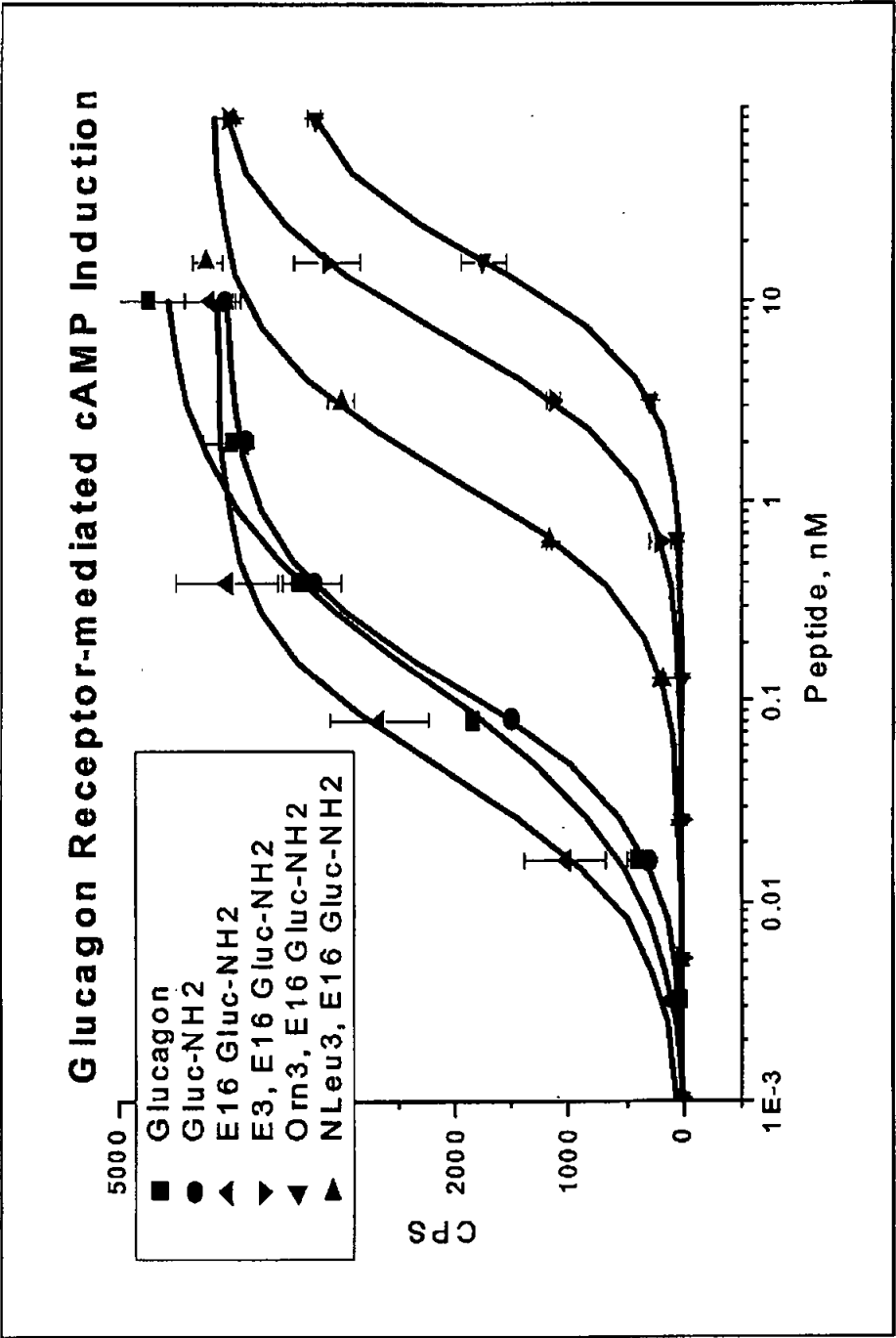


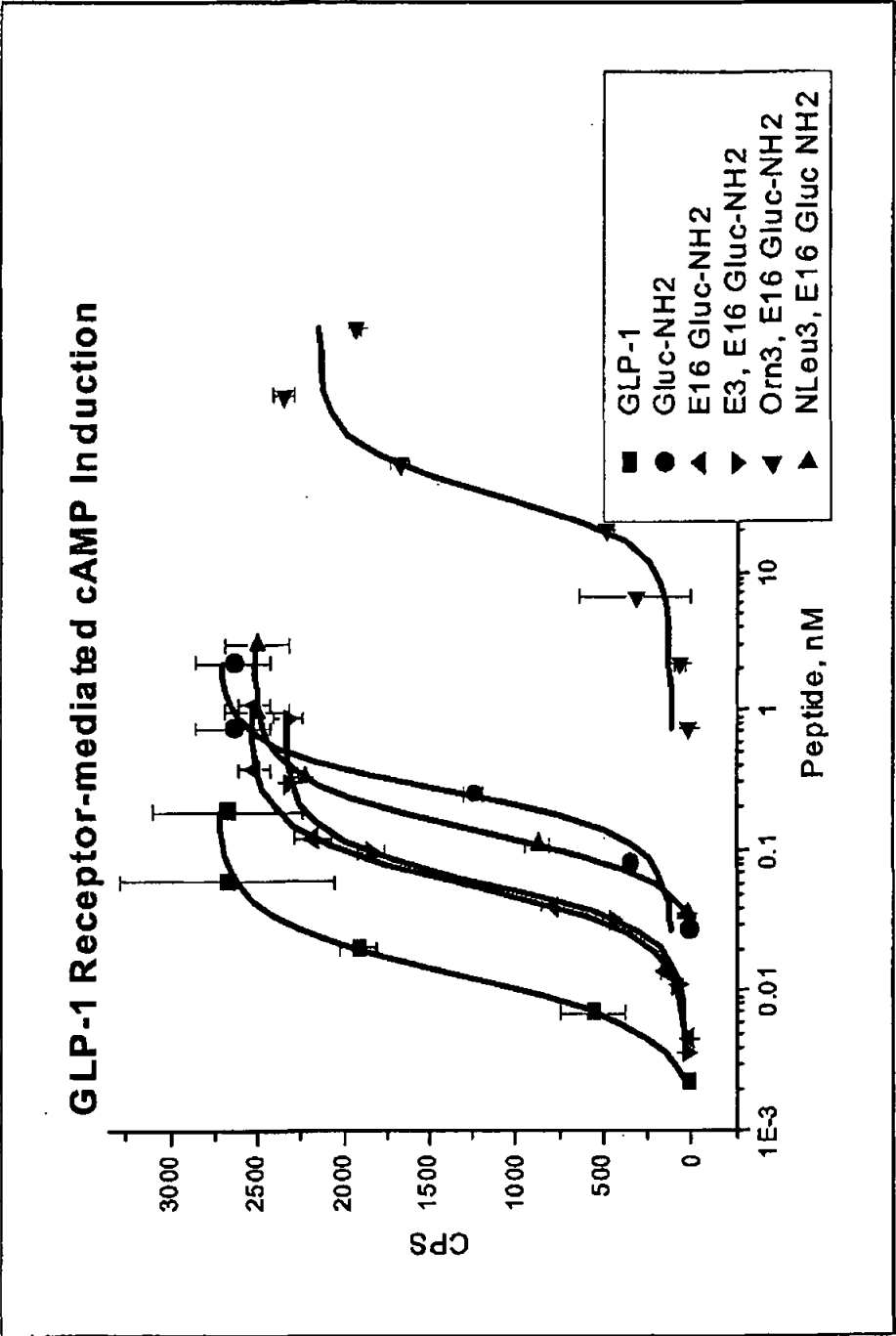
Fig. 4A





5/24

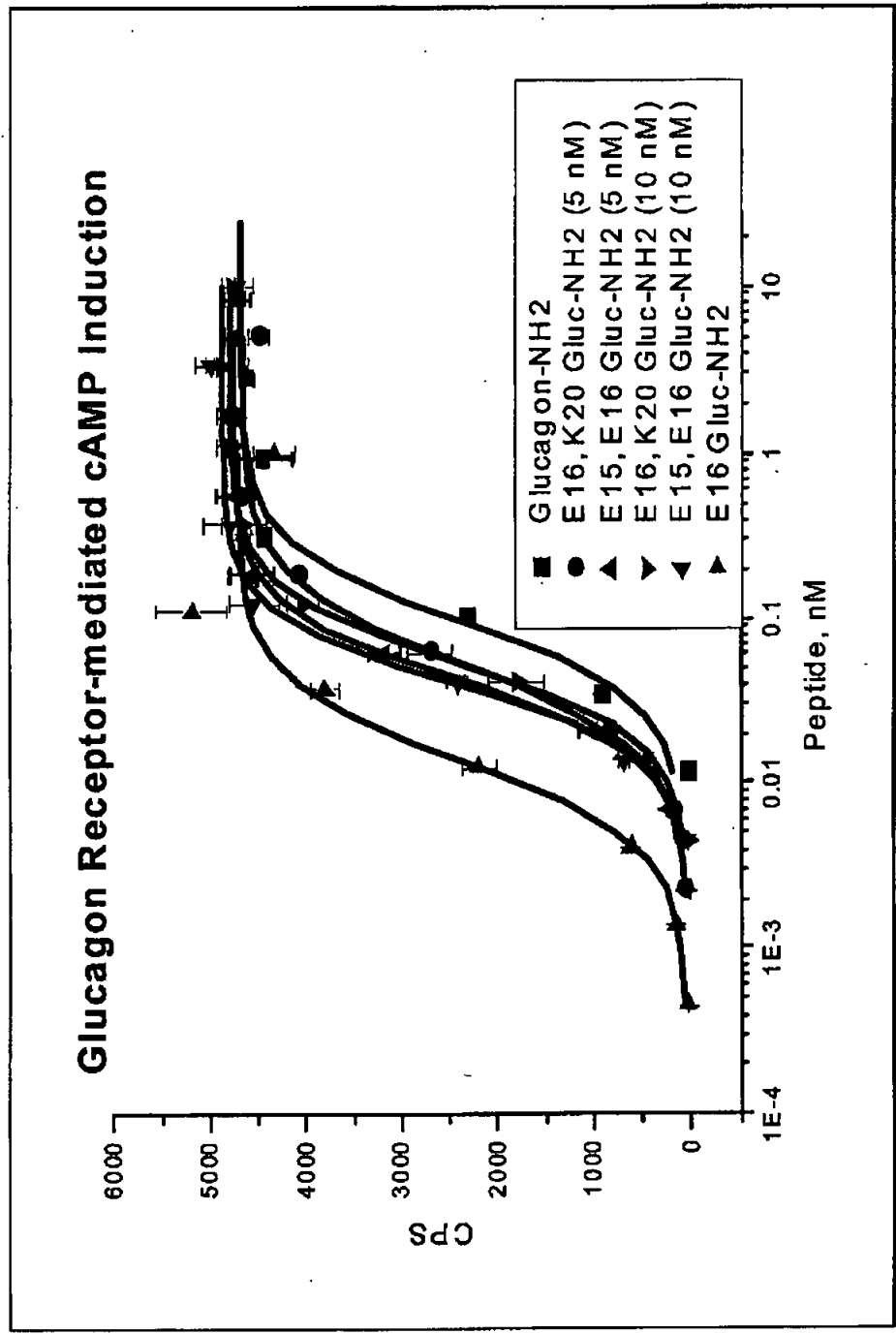
Fig. 4B



6/24

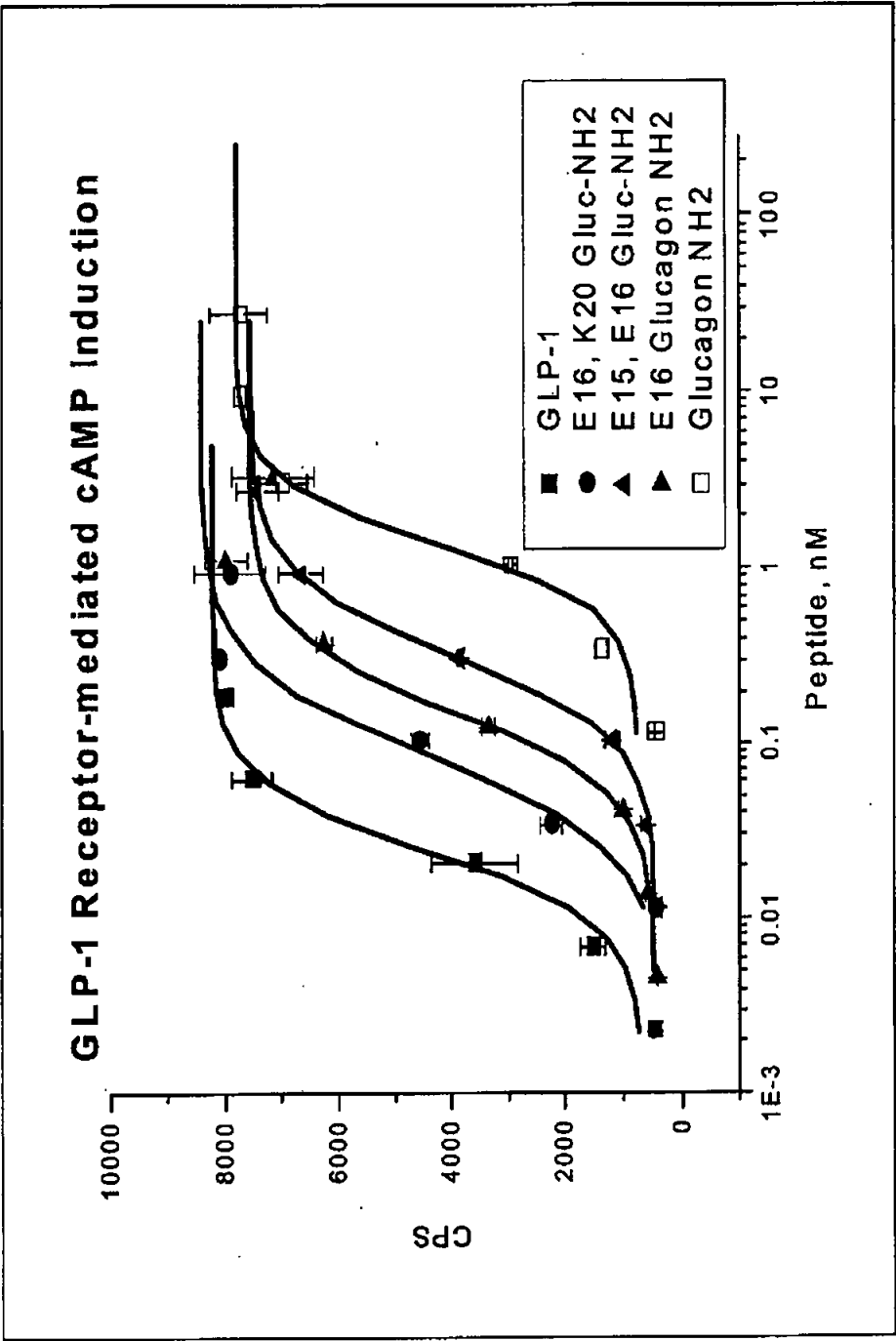
129

Fig. 5A



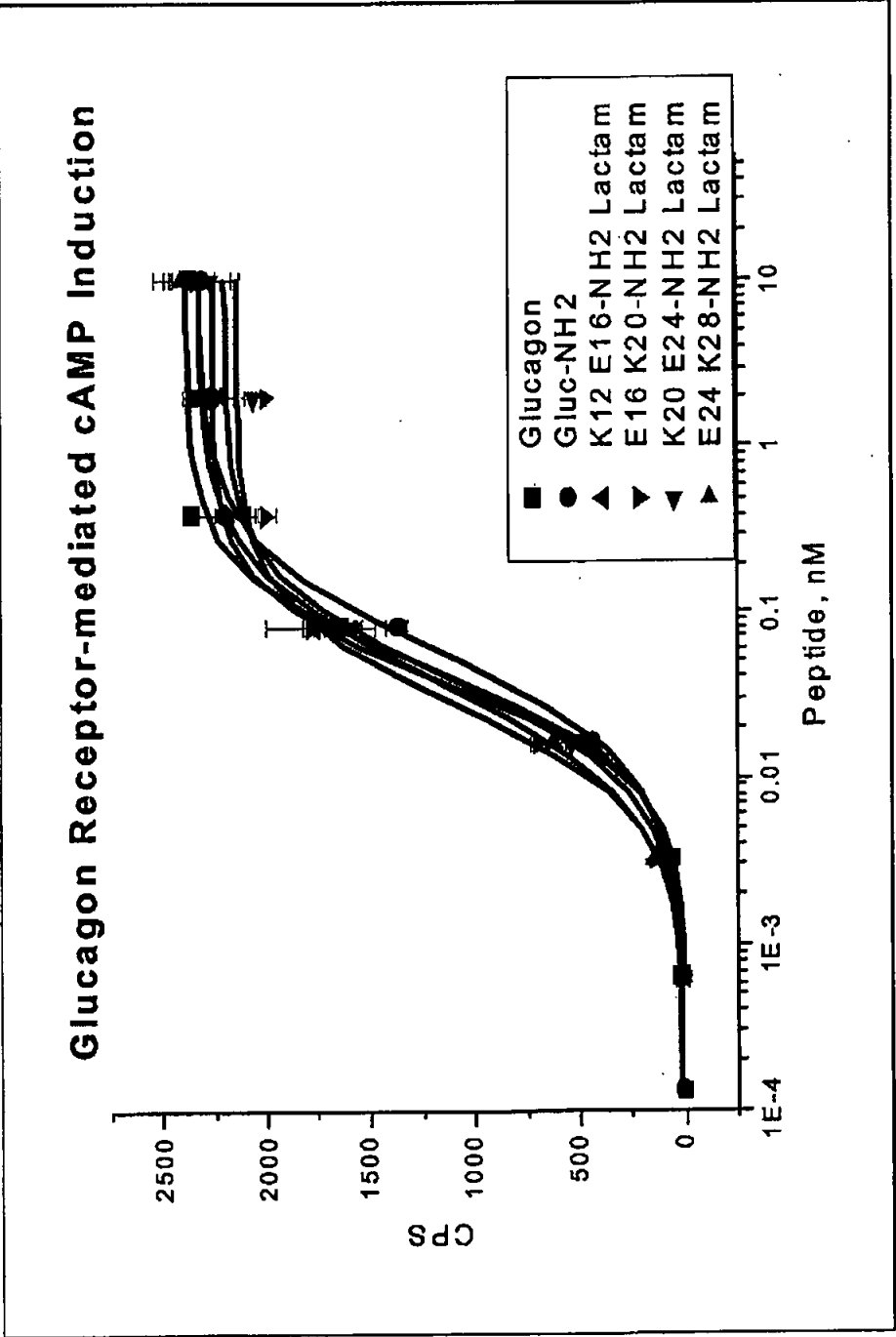
7/24

Fig. 5B



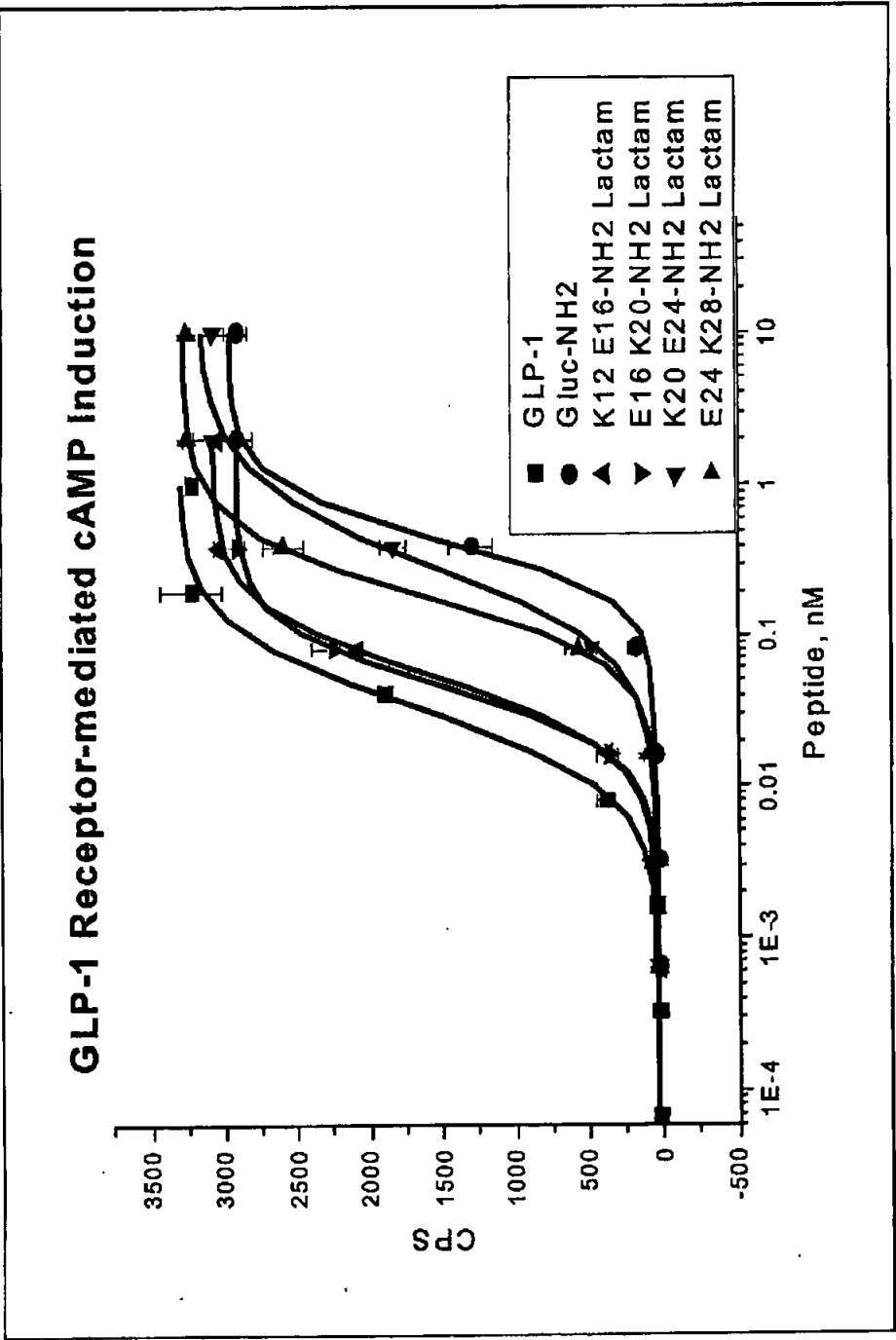
8/24

Fig. 6A



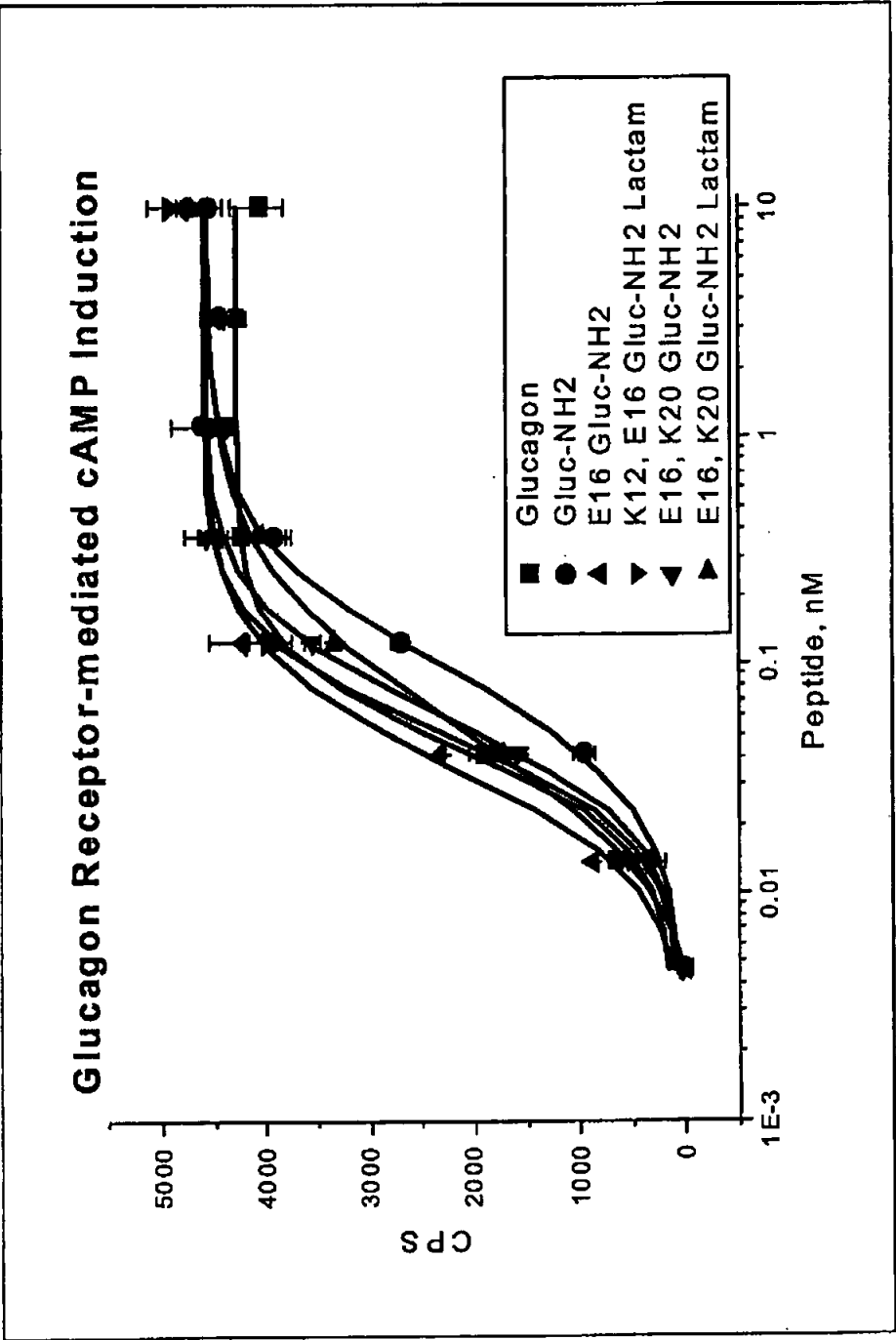
9/24

Fig. 6B



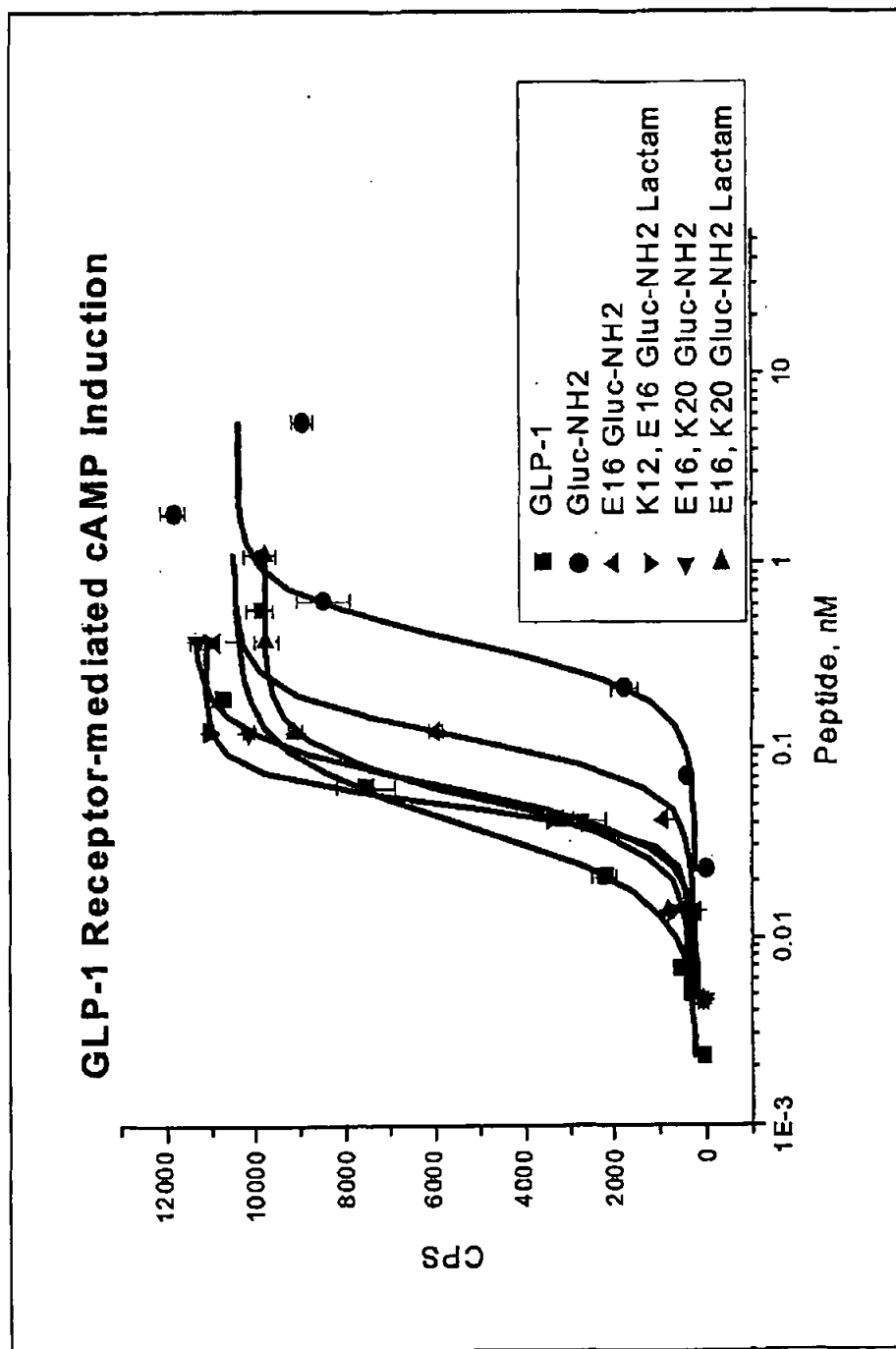
10/24

Fig. 7A



11/24

Fig. 7B



12/24

Fig.8A: Position 16 and C-terminal Modification of Glucagon

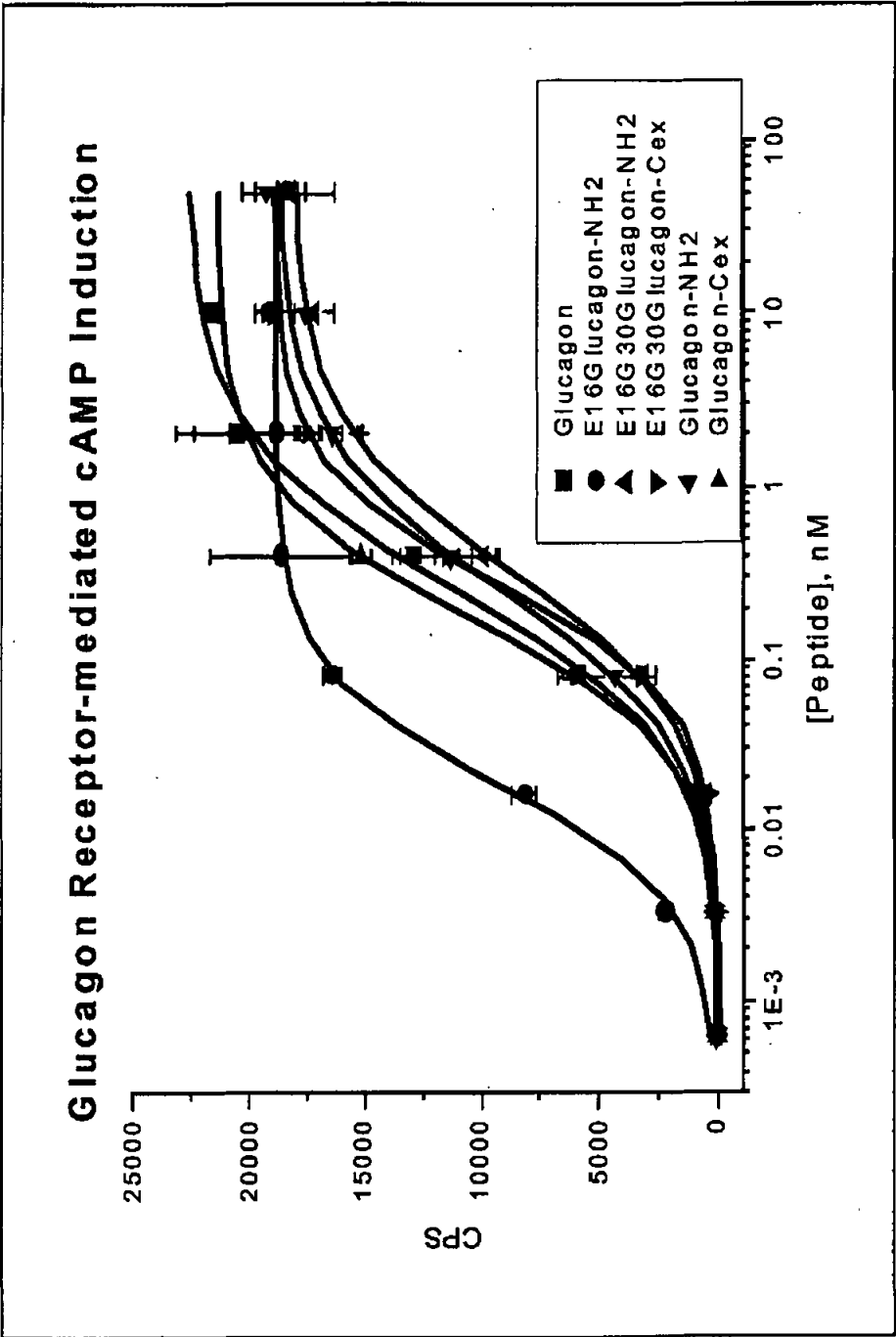
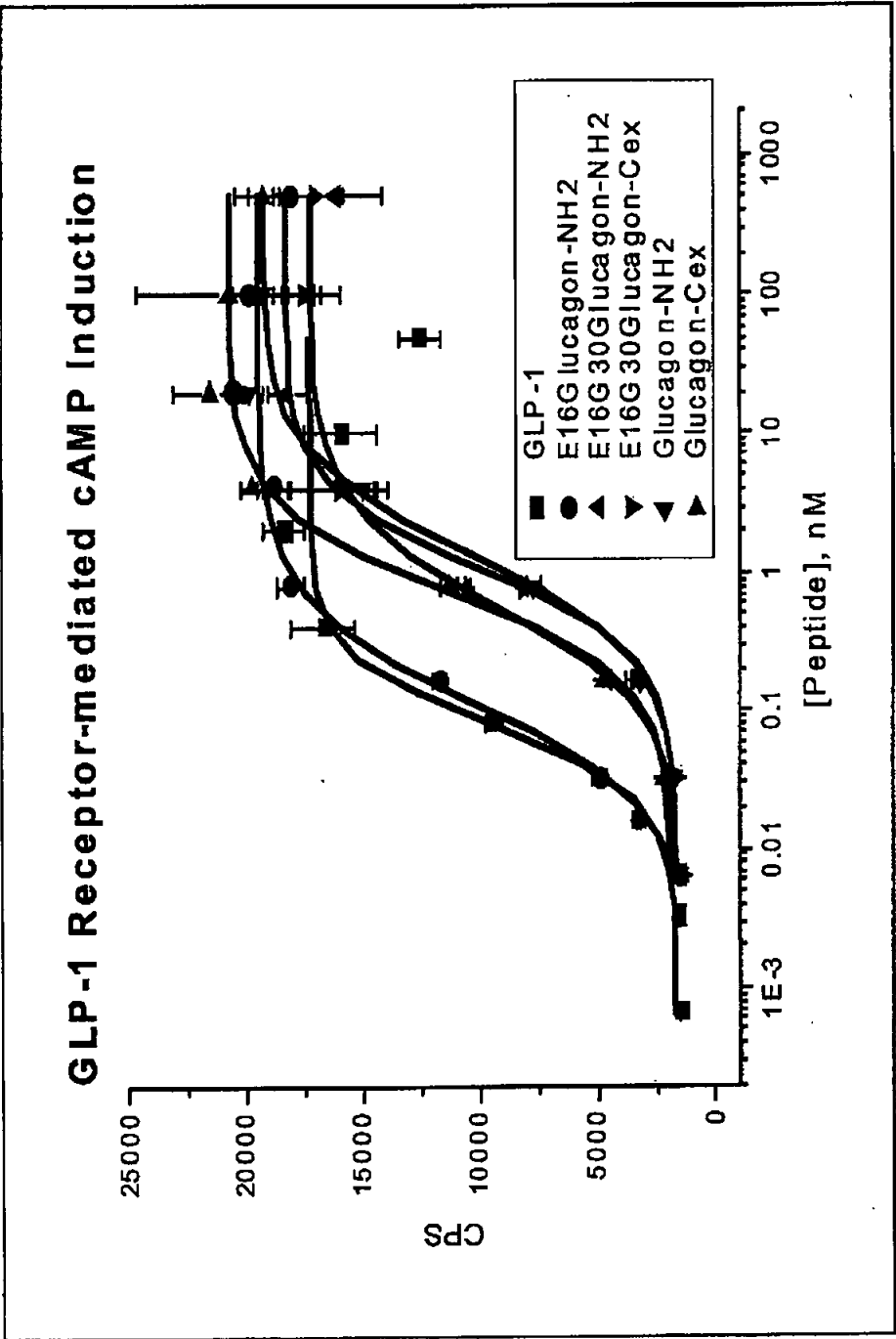


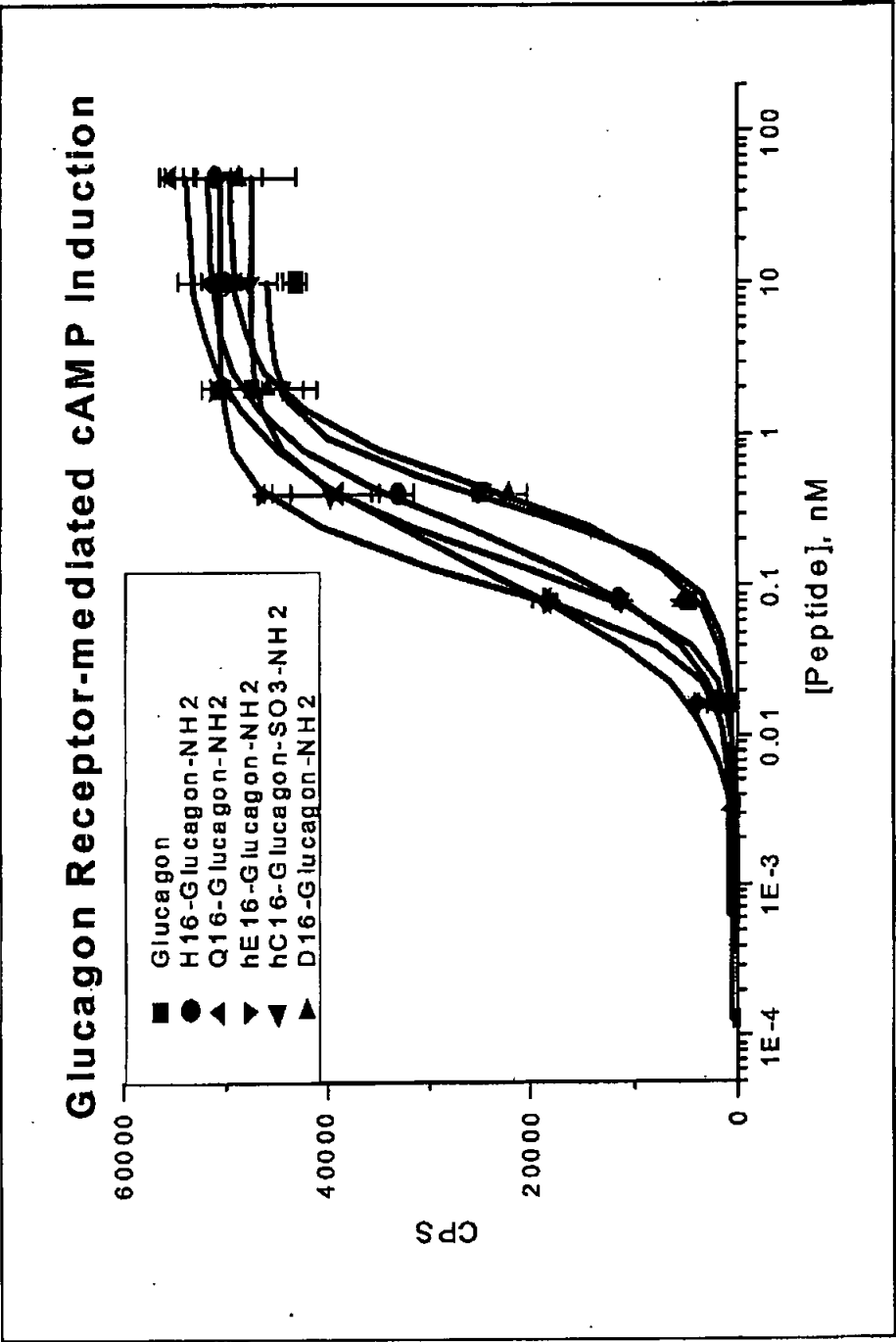


Fig. 8B: Position 16 and C-terminal Modification of Glucagon



14/24

Fig. 8C: Substitutions at Position 16 of Glucagon



15/24

8D: Substitutions at Position 16 of Glucagon

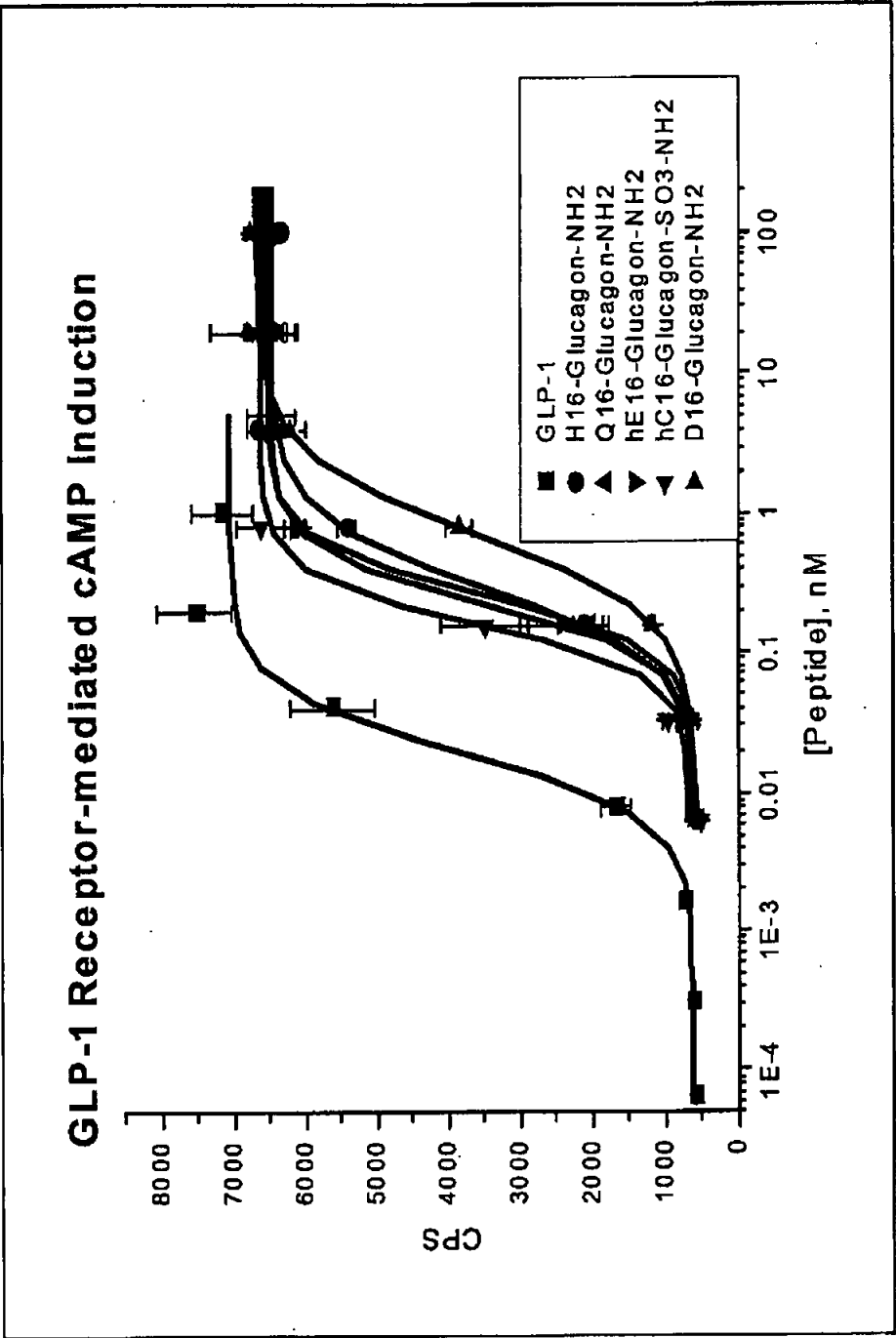


Fig. 8E: Substitutions at Position 16 of Glucagon

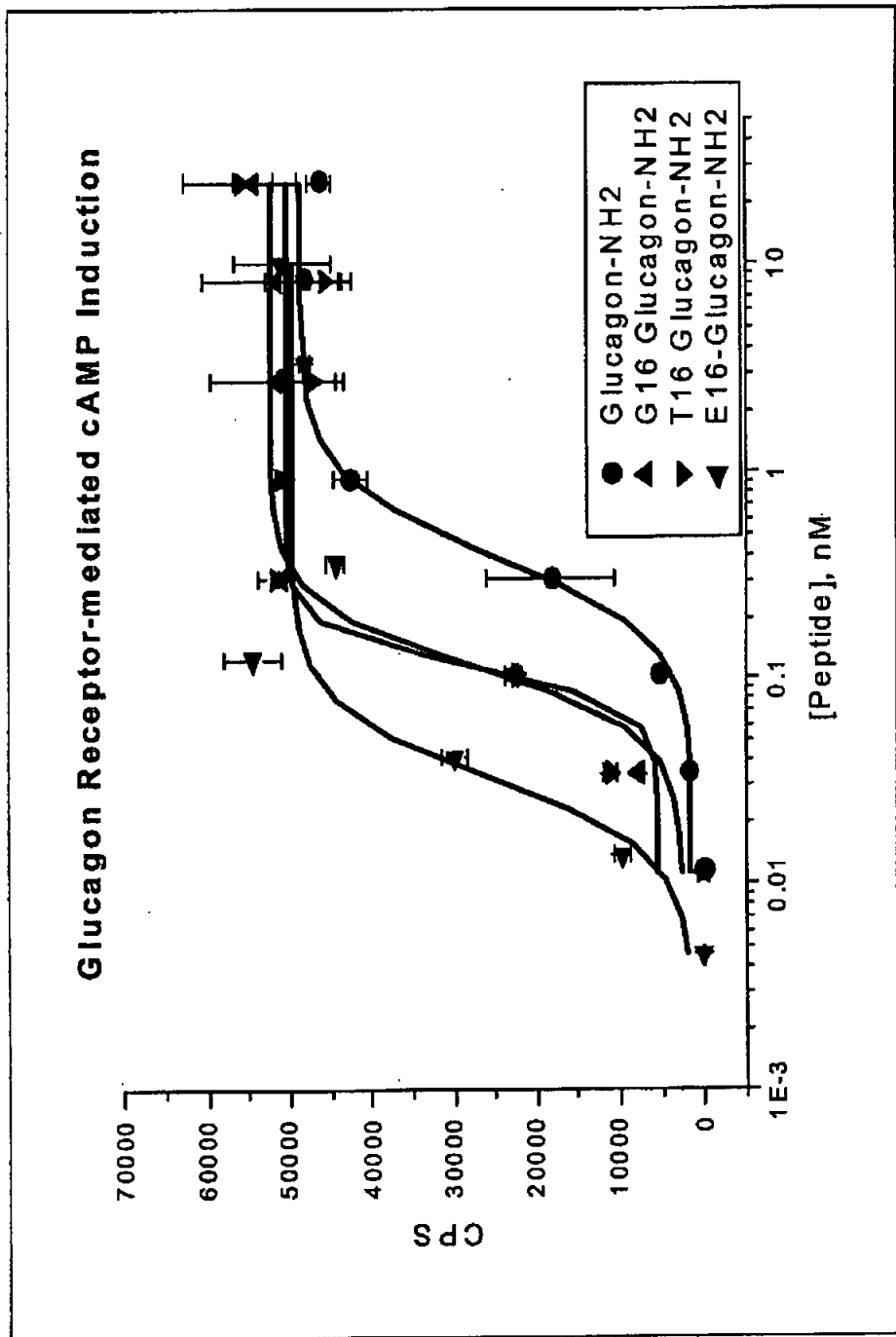


Fig. 8F Substitutions at Position 16 of Glucagon

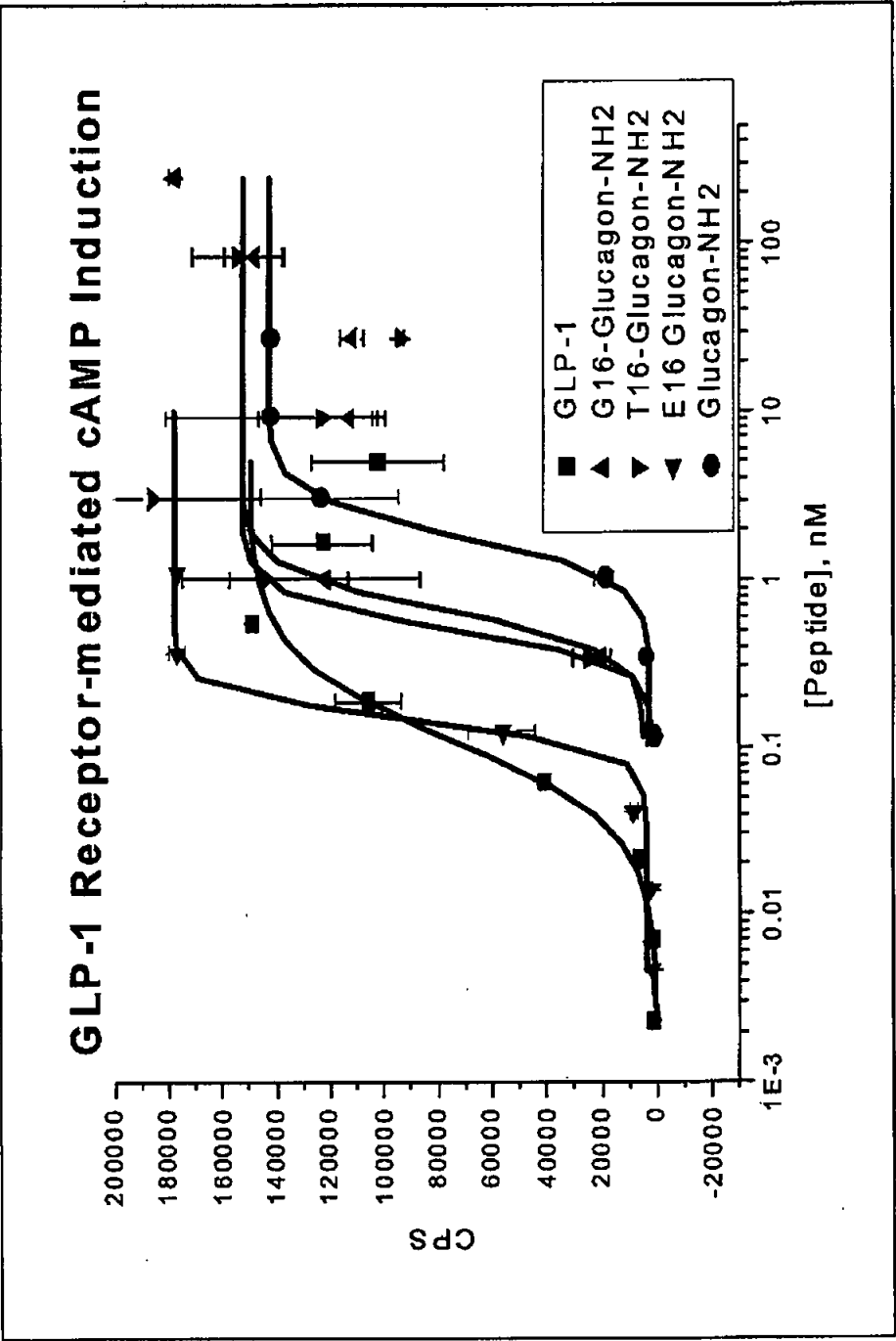


Fig 9A: cAMP Induction by GLP-1 17-26 Glucagon Analogs

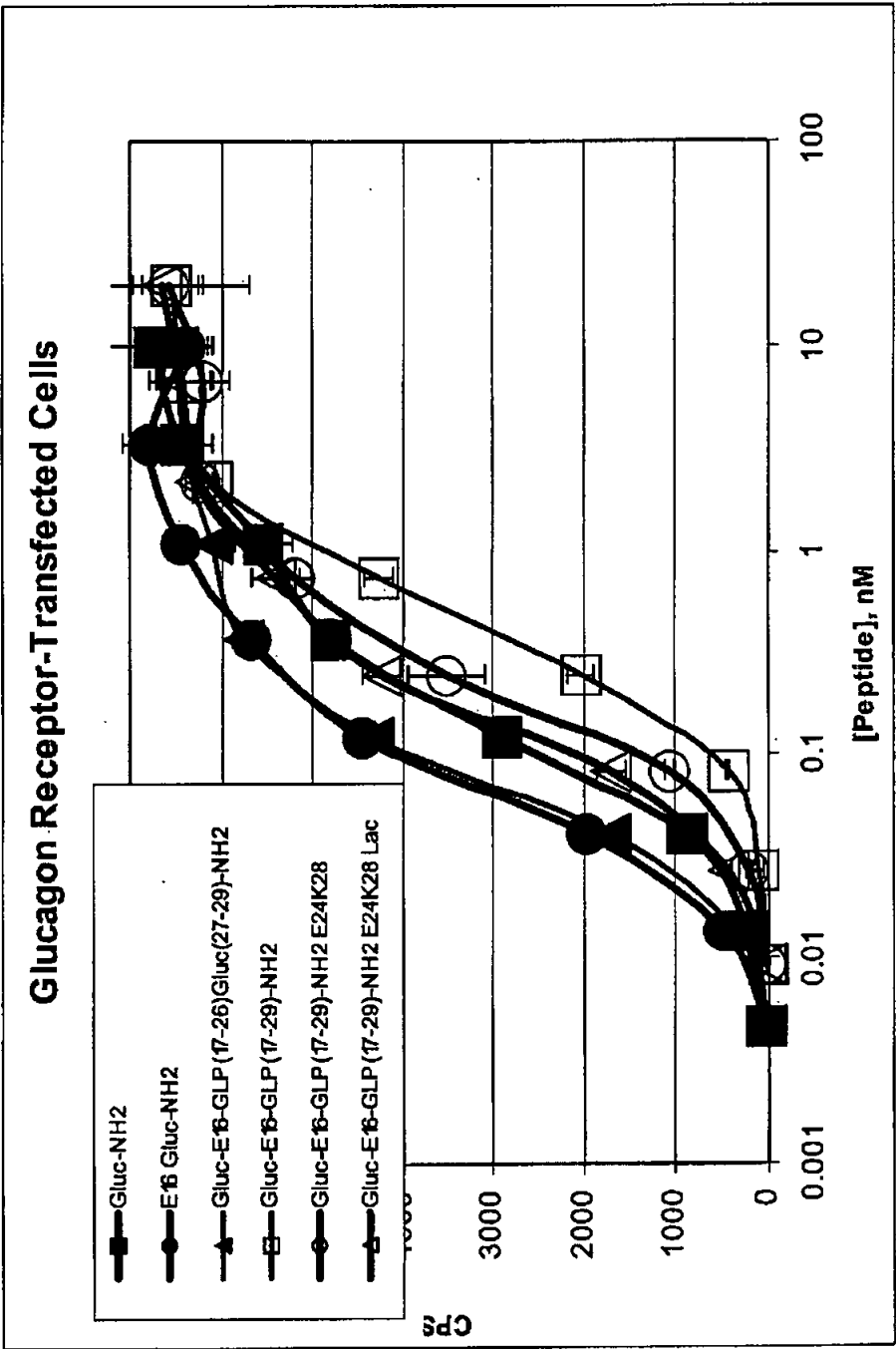
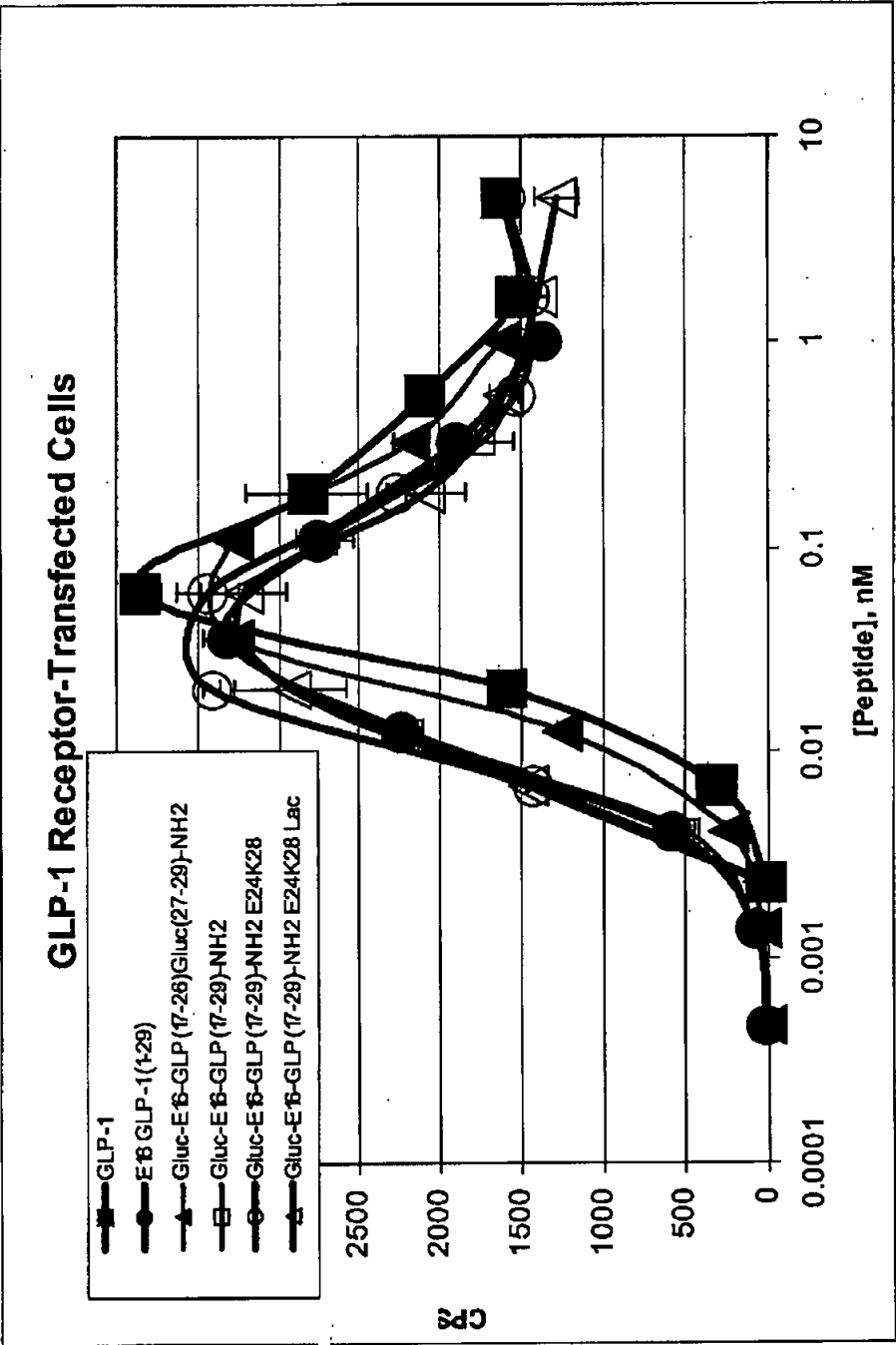


Fig. 9B: cAMP Induction by GLP-1 17-26 Glucagon Analogs



20/24

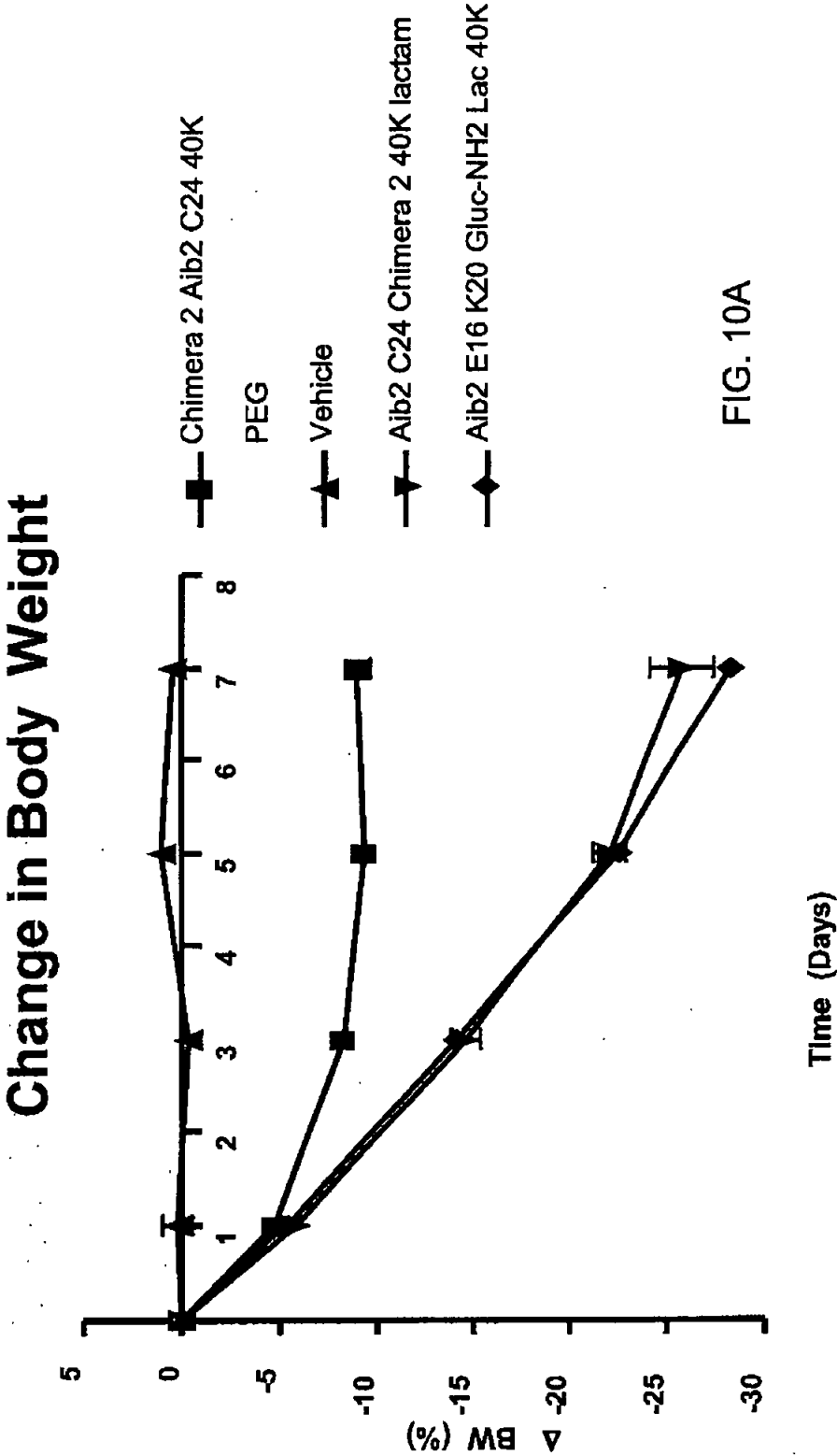


FIG. 10A

- Subcutaneous QW injection (325nmol/kg)
- N=8 DIO mice per group with initial average body weight of 51g



Change in Body Weight

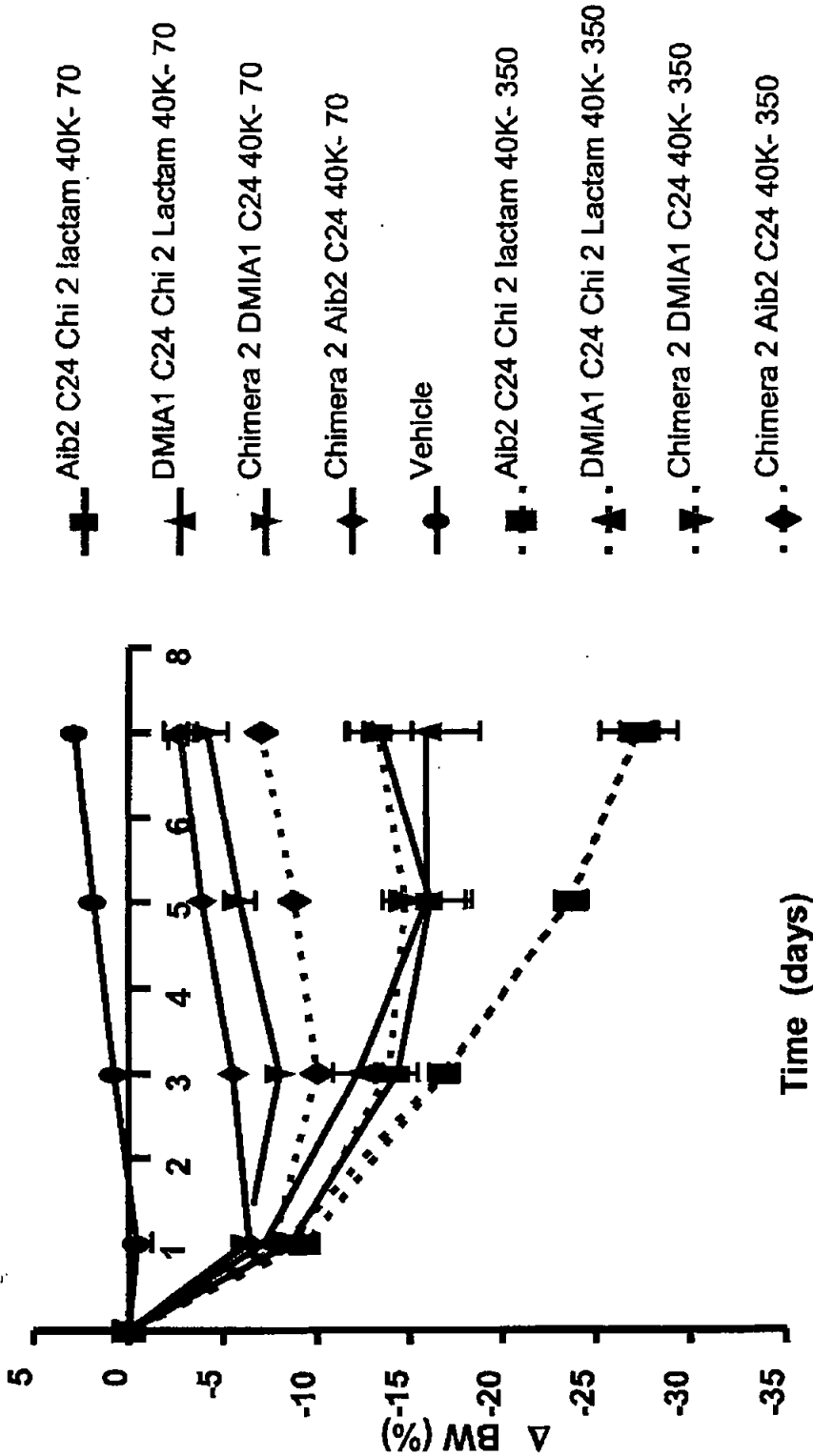


FIG. 10B

- Subcutaneous QW injections (70 or 350nmol/kg)
- N=8 DIO mice per group with initial average body weight of 44g

22/24

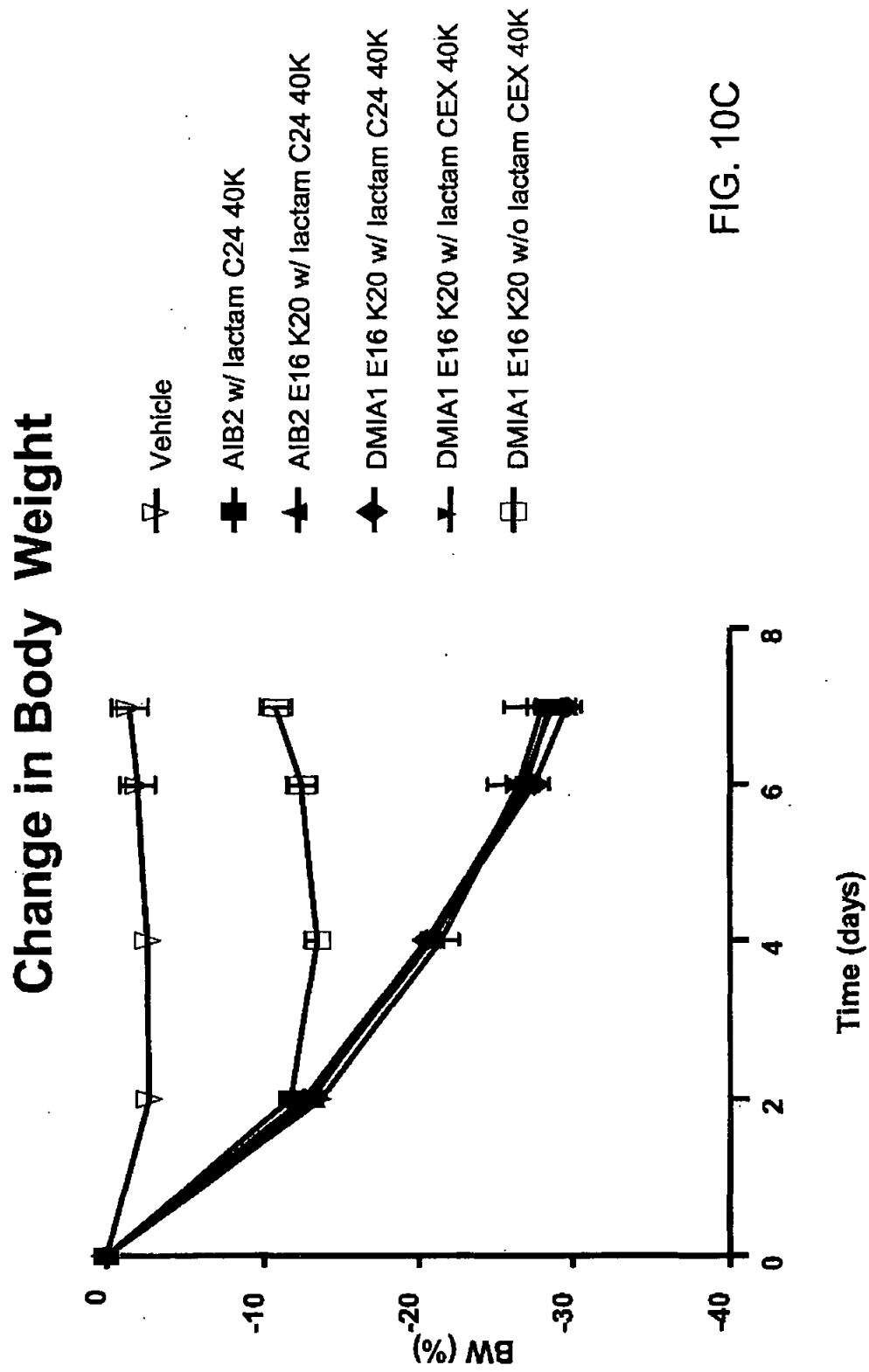


FIG. 10C

- Subcutaneous QW injection (QW=280 nmol/kg/wk)
- N=6 DIO mice per group with initial average body weight of 53g

Change in Body Weight

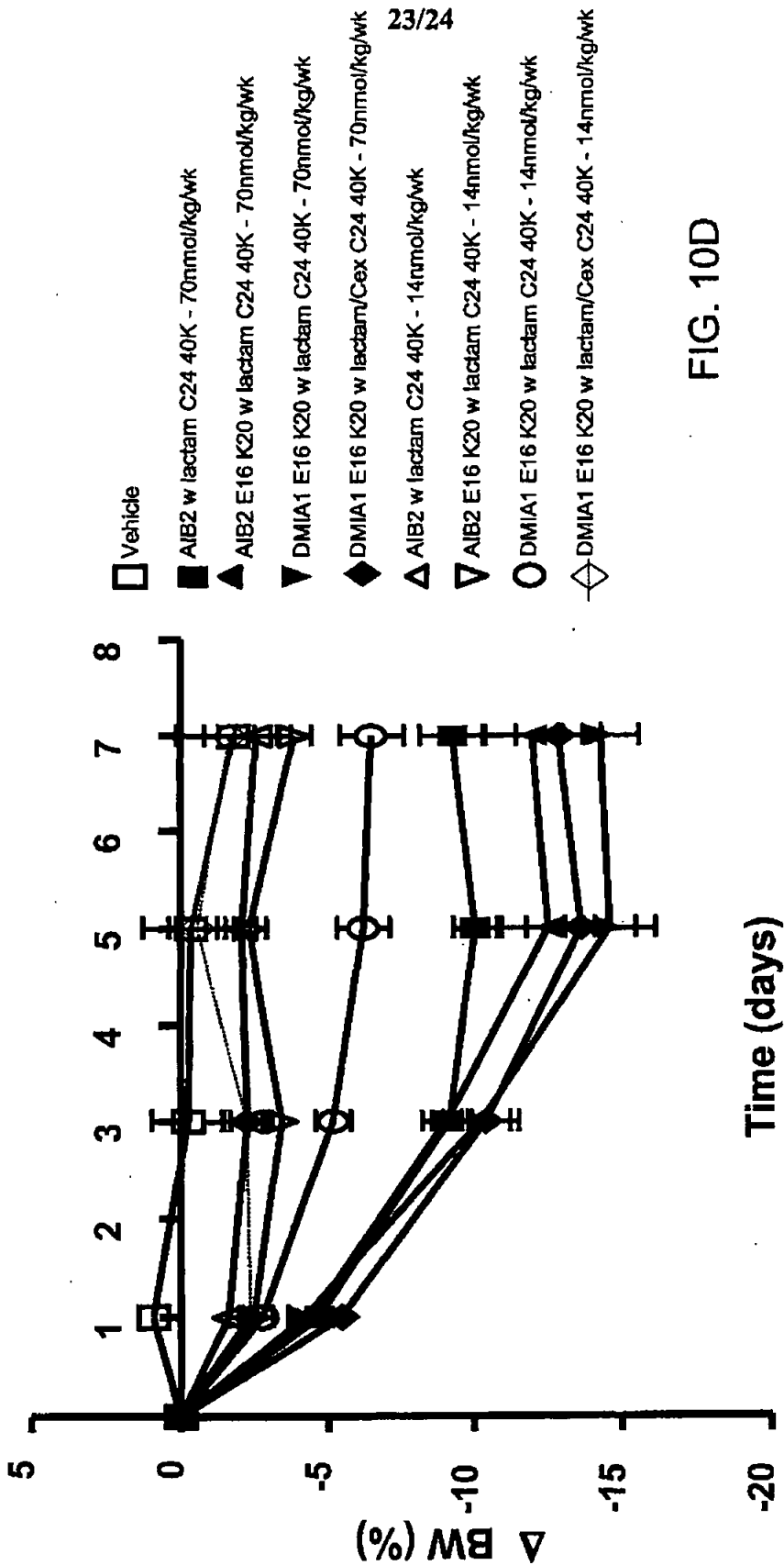


FIG. 10D

- Subcutaneous QW injection (QW=70 nmol/kg/wk or 14 nmol/kg/wk)
- N=8 DIO mice per group with initial average body weight of 44.3g

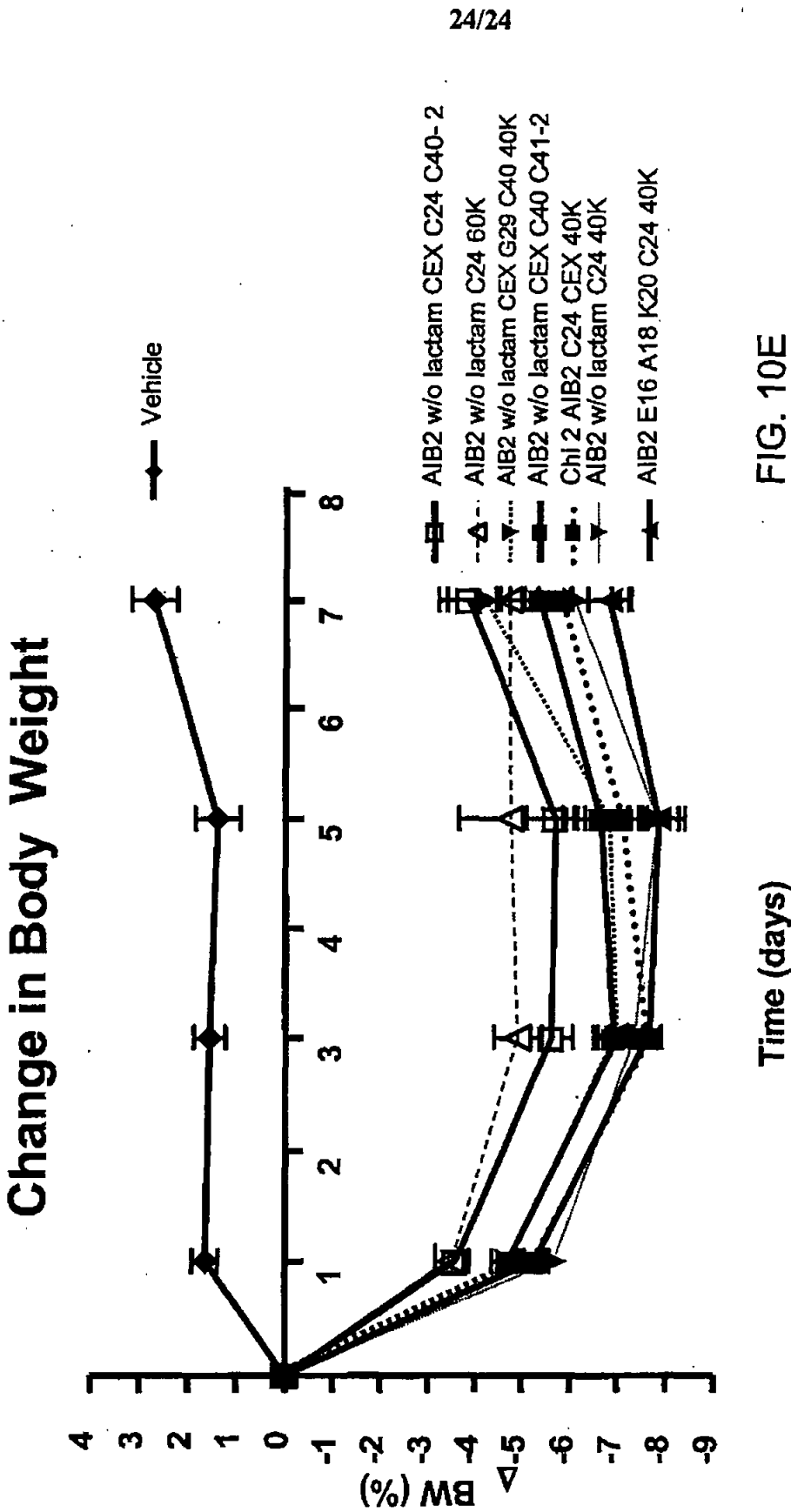


FIG. 10E

- Subcutaneous QW injection (QW=70 nmol/kg/wk)
- N=8 DIO mice per group with initial average body weight of 46.3g

## COAGONISTAS DE RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1

### Referencia Cruzada a Solicitudes de Patentes Relacionadas

5 Esta solicitud de patente reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisoria Estadounidense N° 60/890.087 presentada el 15 de febrero de 2007 y de la Solicitud de Patente Estadounidense N° 60/938.565 presentada el 17 de mayo de 2007. El objeto que se revela en estas solicitudes de patentes  
10 provisorias se incorpora por la presente expresamente como referencia en la presente solicitud de patente.

### Antecedentes

15 El pre-proglucagón es un precursor de polipéptido de 158 aminoácidos que se procesa en diferentes tejidos para formar numerosos péptidos derivados de proglucagón diferentes, que incluyen glucagón, péptido 1 similar a glucagón (GLP-1), péptido 2 similar a glucagón (GLP-2) y oxintomodulina (OXM),  
20 que están involucrados en una amplia variedad de funciones fisiológicas, que incluyen la homeostasis de glucosa, la secreción de insulina, el vaciado gástrico, y el crecimiento intestinal, así como la regulación de la ingesta de alimentos. El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a  
25 los aminoácidos 33 a 61 de pre-proglucagón, mientras que GLP-1

se produce como un péptido de 37 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 72 a 108 de pre-proglucagón. La amida de GLP-1 (7-36) o el ácido de GLP-1 (7-37) son formas biológicamente potentes de GLP-1, que demuestran una actividad esencialmente  
5 equivalente en el receptor de GLP-1.

La hipoglucemia ocurre cuando el nivel de glucosa en sangre cae demasiado bajo para proveer de energía suficiente para las actividades del cuerpo. En los adultos o en los niños mayores  
10 de 10 años, la hipoglucemia es poco común excepto como un efecto colateral del tratamiento de la diabetes, pero puede derivar de otras medicaciones o enfermedades, deficiencias de hormonas o enzimas, o tumores. Cuando la glucosa en sangre empieza a caer, el glucagón, una hormona producida por el  
15 páncreas, le indica al hígado que rompa el glicógeno y libere glucosa, provocando que los niveles de glucosa en sangre suban hacia un nivel normal. Por lo tanto, la función general del glucagón en la regulación de la glucosa es contrarrestar la acción de la insulina y mantener los niveles de glucosa en  
20 sangre. Sin embargo, para los diabéticos, se puede deteriorar esta respuesta del glucagón a la hipoglucemia, haciendo que sea más difícil que los niveles de glucosa vuelvan a la gama normal.

La hipoglucemia es un evento que pone en riesgo la vida que requiere atención médica inmediata. La administración de glucagón es una medicación establecida para tratar la hipoglucemia aguda y puede restablecer niveles normales de glucosa dentro de minutos de la administración. Cuando se usa glucagón en el tratamiento médico agudo de la hipoglucemia, se solubiliza una forma cristalina de glucagón con un tampón ácido diluido y la solución se inyecta inmediatamente. Si bien este tratamiento es eficaz, la metodología es engorrosa y peligrosa para alguien que está semiconsciente. Por consiguiente, existe una necesidad de un análogo de glucagón que mantenga o exceda el rendimiento biológico de la molécula madre pero que sea suficientemente soluble y estable, en condiciones fisiológicas relevantes, que se pueda preformular como una solución, lista para la inyección.

Además, se alienta a los diabéticos a mantener niveles de glucosa en sangre casi normales para retardar o prevenir complicaciones microvasculares. Alcanzar esta meta habitualmente requiere terapia intensiva con insulina. Al luchar para alcanzar esta meta, los médicos han encontrado un aumento sustancial en la frecuencia y gravedad de la hipoglucemia en sus pacientes diabéticos. Por consiguiente, se necesitan compuestos farmacéuticos y metodologías mejoradas

para tratar la diabetes que sea menos probable que induzcan la hipoglucemia que las terapias con insulina actuales.

GLP-1 tiene diferentes actividades biológicas comparado con glucagón. Sus acciones incluyen la estimulación de la síntesis y la secreción de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón, y la inhibición de la ingesta de alimentos. GLP-1 ha mostrado que reduce la hiperglucemia (niveles de glucosa elevados) en los diabéticos. Exendina 4, un péptido derivado de veneno de lagarto que comparte un 50% de la identidad de aminoácidos con GLP-1, activa el receptor de GLP-1 y en forma similar se ha demostrado que reduce la hipoglucemia en los diabéticos.

También existen pruebas de que GLP-1 y exendina 4 pueden reducir la ingesta de alimentos y promover la baja de peso, un efecto que sería beneficioso no solamente para los diabéticos sino también para los pacientes que sufren obesidad. Los pacientes con obesidad tienen un riesgo más alto de diabetes, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad cardiovascular y enfermedades musculoesqueléticas.

Por consiguiente, aún existe una necesidad de métodos alternativos y preferentemente mejorados para tratar la diabetes y la obesidad.



## Resumen

Como se describió anteriormente, se proporcionan agonistas de glucagón de alta potencia que también presentan actividad  
5 aumentada en el receptor de glucagón, y en otras realizaciones presentan estabilidad biofísica y/o solubilidad acuosa mejorada. Además, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan análogos de agonistas de glucagón que han perdido la selectividad del glucagón nativo para el receptor  
10 de glucagón contra el receptor de GLP-1, y por lo tanto representan coagonistas de esos dos receptores. Las modificaciones de aminoácidos seleccionadas dentro de los análogos de glucagón pueden controlar la actividad relativa del análogo en el receptor de GLP-1 contra el receptor de  
15 glucagón. Por lo tanto, aún otro aspecto de la invención proporciona análogos de coagonistas de glucagón que tienen más alta selectividad en el receptor de glucagón contra el receptor de GLP-1, análogos de coagonistas de glucagón que tienen una actividad aproximadamente en ambos receptores, y  
20 análogos de coagonista de glucagón que tienen actividad más alta en el receptor de GLP-1 contra el receptor de glucagón. Esta última categoría de coagonista puede crearse para presentar escasa o ninguna actividad en el receptor de glucagón y aún retener la capacidad de activar el receptor de  
25 GLP-1 con la misma o mejor potencia que GLP-1 nativo.

Cualquiera de estos análogos también puede incluir modificaciones que le confieren estabilidad biofísica y/o solubilidad acuosa mejoradas.

5 Los análogos de glucagón que demuestran coagonistas en los receptores de glucagón y de GLP-1 son ventajosos para varias aplicaciones. En primer lugar, el uso de glucagón para tratar la hipoglucemia puede sobrecompensar los bajos niveles de glucosa en sangre y derivar en niveles excesivos de glucosa en  
10 sangre. Si se administra un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1, la estimulación adicional de GLP-1 puede intensificar el efecto del agonista de glucagón para impedir los niveles excesivos de glucosa en sangre derivados del tratamiento de la hipoglucemia.

15

Además como se describe en la presente, se pueden usar análogos de coagonistas de glucagón de la invención para controlar la hiperglucemia, o para inducir la baja de peso o prevenir el aumento de peso, cuando se administran solos o  
20 combinados con otros tratamientos antidiabéticos o anti-obesidad. Otro compuesto que induce la baja de peso es oxintomodulina, una hormona digestiva natural que se halla en el intestino delgado (véase Diabetics 2005, 54:2390-2395). Oxintomodulina es un péptido de 37 aminoácidos que contiene la  
25 secuencia de 29 aminoácidos de glucagón (es decir, SEQ ID N°

- 1) seguidos por una prolongación de extremo de carboxi de 8 aminoácidos de SEQ ID N° 27 (KRNRNNIA). Si bien la presente invención contempla que los análogos de glucagón descritos en la presente se pueden unir optativamente a esta prolongación de extremo de carboxi de 8 aminoácidos (SEQ ID N° 27), la invención en algunas realizaciones también contempla específicamente análogos y usos de análogos que carecen de los 8 aminoácidos de carboxi contiguos de SEQ ID N° 27.
- 10 Los compuestos se pueden personalizar mediante modificaciones de aminoácidos para regular la actividad de GLP-1 del péptido, y por lo tanto los análogos de glucagón de la presente se pueden adaptar para tratar una condición o enfermedad particular. Más específicamente, aquí se proporcionan análogos de glucagón en donde cada análogo presenta un nivel relativo característico de actividad en los receptores de glucagón y de GLP-1 respectivos. Por ejemplo, se pueden hacer modificaciones a cada péptido para producir un péptido de glucagón que tiene cualquiera desde por lo menos el 10% (que incluye por lo menos
- 15 el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%) hasta el 200% o más alta actividad en el receptor de GLP-1 comparado con GLP-1 nativo y cualquiera desde por lo menos el 10% (que incluye por lo menos el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 350%, 400%, 450%) hasta
- 20 el 500% o más alta actividad en el receptor de glucagón
- 25

comparado con el glucagón nativo. La secuencia de aminoácidos del glucagón nativo es SEQ ID 1, la secuencia de aminoácidos de amida de GLP-1 (7-36) es SEQ ID N° 52 y la secuencia de aminoácidos del ácido de GLP-1 (7-37) es SEQ ID N° 50. En  
5 ejemplos de realizaciones, un péptido de glucagón puede presentar por lo menos un 10% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y por lo menos un 50% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, o por lo menos un 40% de la actividad del glucagón nativo en el  
10 receptor de glucagón y por lo menos un 40% de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, o por lo menos un 60% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y por lo menos un 60% de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.

15

La selectividad de un péptido de glucagón para el receptor de glucagón comparado con el receptor de GLP-1 se puede describir como la relación relativa de la actividad de glucagón/GLP-1 (la actividad del péptido en el receptor de glucagón en  
20 relación con el glucagón nativo, dividido por la actividad del péptido en el receptor de GLP-1 en relación con GLP-1 nativo). Por ejemplo, un péptido de glucagón que presenta un 60% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y un 60% de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1  
25 tiene una relación de 1:1 de la actividad de glucagón/GLP-1.

Ejemplos de relaciones de la actividad de glucagón/GLP-1 incluyen 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1 o 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:6, 1:4, 1:3, 1:2 o 1:1,5. Como un ejemplo, una relación de la actividad de glucagón:GLP-1 de 10:1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de glucagón comparado con el receptor de GLP-1. En forma similar, la relación de la actividad de GLP-1/glucagón de 10:1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de GLP-1 comparado con el receptor de glucagón.

10

De acuerdo con una realización, se proporcionan análogos de glucagón que tienen potencia mejorada y optativamente solubilidad y estabilidad mejorada. En una realización, una modificación de aminoácido en la posición 16 del glucagón nativo (SEQ ID N° 1) proporciona potencia aumentada de glucagón. A modo de ejemplo de realización, dicha potencia mejorada se puede proporcionar mediante la sustitución de la serina natural en la posición 16 con ácido glutámico o con otro aminoácido con carga negativa que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente, con cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico, o un aminoácido con una carga que tiene una cadena lateral que contiene por lo menos un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, P) y con una longitud de la cadena lateral de 4 (o 3-5) átomos. En una realización, el agonista de

glucagón de potencia aumentada comprende un péptido de SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7 o un agonista de glucagón de SEQ ID N° 5. De acuerdo con una realización, se proporciona una proteína de análogo de glucagón que tiene potencia mejorada en el receptor de glucagón comparado con el glucagón de tipo silvestre en donde el péptido comprende la secuencia de SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, o SEQ ID N° 10, en donde el péptido de glucagón retiene su selectividad para el receptor de glucagón comparado con los receptores de GLP-1.

La actividad del receptor de glucagón se puede reducir mediante una modificación de aminoácido en la posición 3, por ejemplo la sustitución de la glutamina natural en la posición 3 con cualquier aminoácido. Se ha demostrado que la sustitución en esta posición con un aminoácido ácido, básico, o hidrófobo (ácido glutámico, ornitina, norleucina) reduce sustancialmente o destruye la actividad del receptor de glucagón. En algunas realizaciones los análogos tienen un 10% o menos de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón, por ejemplo el 1%-10%, o el 0,1%-10%, o más del 0,1% pero menos del 10%, mientras que presentan por lo menos un 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1. Por ejemplo, ejemplos de análogos descritos en la presente tienen un 0,5%, un 1% o un 7% de la actividad del glucagón nativo, mientras

que presentan por lo menos un 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

En otra realización, se proporcionan análogos de glucagón que  
5 tienen potencia mejorada o retenida en el receptor de glucagón  
comparado con el péptido de glucagón nativo, pero también  
tienen actividad muy aumentada en el receptor de GLP-1. El  
glucagón normalmente tiene un 1% de la actividad del GLP-1  
nativo en el receptor de GLP-1, mientras que GLP-1 normalmente  
10 tiene menos del 0,01% de la actividad del glucagón nativo en  
el receptor de glucagón. Se proporciona actividad mejorada en  
el receptor de GLP-1 reemplazando el ácido carboxílico del  
aminoácido del extremo de C con un grupo de carga neutra, tal  
como una amida o un éster. En una realización, estos análogos  
15 de glucagón comprenden una secuencia de SEQ ID N° 20 en donde  
el aminoácido del extremo de carboxi tiene un grupo amida en  
lugar del grupo ácido carboxílico que se encuentra en el  
aminoácido nativo. Estos análogos de glucagón tienen actividad  
potente en los receptores de glucagón y de GLP-1 y por lo  
20 tanto actúan como coagonistas en ambos receptores. De acuerdo  
con una realización se proporciona un coagonista de receptor  
de glucagón y de GLP-1 en donde el péptido comprende la  
secuencia de SEQ ID N° 20, en donde el aminoácido en la  
posición 28 es Asn o Lys y el aminoácido en la posición 29 es  
25 Thr-amida.

La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 también se proporciona estabilizando la estructura de alfa-hélice en la parte de extremo de C del glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29), a través de la formación de un puente  
5 intramolecular entre las cadenas laterales de dos aminoácidos que están separados por tres aminoácidos intervinientes. En ejemplos de realizaciones, el puente o ligador es de 8 (o 7-9) átomos y se forma entre cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones 12 y 16, o en las posiciones 16 y 20, o en las  
10 posiciones 20 y 24, o en las posiciones 24 y 28. Las cadenas laterales de estos aminoácidos se pueden unir uno a otro a través de las interacciones de enlace de hidrógeno o iónicas, tales como la formación de puentes de sal, o mediante enlaces covalentes. De acuerdo con una realización, se  
15 proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón de SEQ ID N° 20, en donde se forma un anillo de lactama entre las cadenas laterales de un residuo de lisina, ubicado en la posición 12, 20 o 28, y un residuo de ácido glutámico, ubicado en la posición 16 o 24, en donde los dos  
20 aminoácidos del péptido de glucagón cuyas cadenas laterales participan en la formación del anillo de lactama están separados uno de otro por tres aminoácidos intervinientes. De acuerdo con una realización, el análogo de glucagón que transporta lactama comprende una secuencia de aminoácido  
25 seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12,



SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, y SEQ ID N° 18. En una realización el aminoácido de extremo de carboxi del péptido que transporta lactama comprende un grupo amida o un grupo éster en lugar del ácido carboxílico de extremo. En una realización un péptido de glucagón de SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, y SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 18 además comprende un aminoácido adicional unido en forma covalente al extremo de carboxi de SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, o SEQ ID N° 18. En otra realización, se proporciona un péptido de glucagón que comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68 y SEQ ID N° 69 además comprende un aminoácido adicional unido en forma covalente al extremo de carboxi de SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68 y SEQ ID N° 69. En una realización, el aminoácido en la posición 28 es asparagina o lisina y el aminoácido en la posición 29 es treonina.

Una modificación de aminoácido en la posición 20 proporciona también actividad mejorada en el receptor de GLP-1. En una realización, la glutamina en la posición 20 se reemplaza con otro aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que tiene una carga o tiene una capacidad de enlace de hidrógeno y

es tiene por lo menos 5 (o 4-6) átomos de longitud, por ejemplo, lisina, citrulina, arginina u ornitina.

Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente que  
5 aumenta o disminuye la actividad de receptor de glucagón y que  
aumenta la actividad de receptor de glucagón se puede aplicar  
individualmente o en combinación. Las combinaciones de las  
modificaciones que aumentan la actividad de receptor de GLP-1  
generalmente proporcionan actividad de GLP-1 más alta que  
10 cualquiera de dichas modificaciones tomadas solas. Por  
ejemplo, la invención proporciona análogos de glucagón que  
comprenden modificaciones en la posición 16, en la posición  
20, y en el grupo ácido carboxílico de extremo de C,  
optativamente con un enlace covalente entre los aminoácidos en  
15 las posiciones 16 y 20; análogo de glucagón que comprenden  
modificaciones en la posición 16 y en el grupo ácido  
carboxílico del extremo de C; análogos de glucagón que  
comprenden modificaciones en las posiciones 16 y 20,  
optativamente con un enlace covalente entre los aminoácidos en  
20 las posiciones 16 y 20; y análogos de glucagón que comprenden  
modificaciones en la posición 20 y en el grupo ácido  
carboxílico del extremo de C; optativamente con la condición  
de que el aminoácido en la posición 12 no sea Arg; u  
optativamente con la condición de que el aminoácido en la  
25 posición 9 no sea Glu.

Otras modificaciones en la posición 1 o 2, descritas en la presente, pueden aumentar la resistencia del péptido a la rotura de dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). Por ejemplo, el aminoácido en la posición 2 se puede sustituir con D-serina, alanina, D-alanina, valina, glicina, N-metil serina, N-metil alanina, o ácido amino isobutírico. Alternativamente o además, el aminoácido en la posición 1 se puede sustituir con D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina, N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, o ácido alfa, alfa-dimetil imidazol acético (DMIA). Se observó que las modificaciones en la posición 2 (por ejemplo, AIB en la posición 2) y en algunos casos modificaciones en la posición 1 pueden reducir la actividad de glucagón, algunas veces significativamente; sorpresivamente, esta reducción en la actividad de glucagón puede medirse mediante un enlace covalente entre aminoácidos en las posiciones 12 y 16, 16 y 20, o 20 y 24, por ejemplo, un puente de lactama entre un ácido glutámico en la posición 16 y una lisina en la posición 20.

20

En aún otro ejemplo de realización, cualquiera de los compuestos precedentes se puede modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad modificando el aminoácido en la posición 15 de SEQ ID N° 1 para reducir la degradación del

péptido en el tiempo, especialmente en tampones ácidos o alcalinos.

En otra realización la solubilidad de los péptidos de glucagón  
5 revelados en la presente se mejora con la ligadura covalente  
de un grupo hidrófilo al péptido. En una realización el grupo  
hidrófilo es una cadena de polietilenglicol (PEG),  
optativamente unida al péptido en una o más de las posiciones  
16, 17, 21, 24, 29 o el extremo de C. En algunas  
10 realizaciones, el aminoácido activo en esa posición se  
sustituye con un aminoácido que tiene una cadena lateral  
adecuada para el entrecruzamiento con grupos hidrófilos, para  
facilitar la ligadura del grupo hidrófilo al péptido. En otras  
realizaciones, un aminoácido modificado para comprender un  
15 grupo hidrófilo se agrega al péptido en el extremo de C. en  
una realización el coagonista de péptido comprende una  
secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 11, SEQ  
ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N°  
16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19 en donde la  
20 cadena lateral de un residuo de aminoácido en una de la  
posición 16, 17, 21 o 24 de dicho péptido de glucagón también  
comprende una cadena de polietilenglicol, que tiene un peso  
molecular seleccionado de la gama de 500 a 40.000 Dalton. En  
una realización la cadena de polietilenglicol tiene un peso  
25 molecular seleccionado de la gama de 500 a 5.000 Dalton. En

otra realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de 10.000 a 20.000 Dalton. En aún otro ejemplo de realización la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de 20.000 a 40.000 Dalton.

5

En otra realización, la solubilidad de cualquiera de los análogos de glucagón precedentes se puede mejorar con sustituciones y/o agregados de aminoácidos que introducen un aminoácido con una carga en la parte del extremo de C del péptido, preferentemente en una posición del extremo de C a la posición 27 de SEQ ID N° 1. Optativamente, se puede introducir uno, dos o tres aminoácidos con una carga dentro la parte del extremo de C, preferentemente el extremo de C a la posición 27. De acuerdo con una realización el aminoácido(s) nativo en las posiciones 28 y/o 29 se sustituye con aminoácidos con una carga, y/o en otra realización también se agregan uno a tres aminoácidos con una carga al extremo de C del péptido. En ejemplos de realizaciones, uno, dos o la totalidad de los aminoácidos con una carga tienen una carga negativa. Se pueden hacer otras modificaciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras, al péptido de glucagón que aún permiten que retenga la actividad de glucagón. En una realización, se proporciona un análogo del péptido de SEQ ID N° 20, en donde el análogo difiere de SEQ ID N° 20 en 1 a 2 sustituciones de aminoácidos en las posiciones 17-26, y en una realización el

25

análogo difiere del péptido de SEQ ID N° 20 en una sustitución de aminoácido en la posición 20.

De acuerdo con una realización los péptidos de glucagón  
5 revelados en la presente se modifican agregando un segundo  
péptido al extremo de carboxi del péptido de glucagón, por  
ejemplo, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27 o SEQ ID N° 28. En una  
realización un péptido de glucagón que tiene una secuencia de  
péptido seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 11, SEQ  
10 ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N°  
16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 66,  
SEQ ID N° 67, y SEQ ID N° 69 está unido en forma covalente a  
través de un enlace de péptido a un segundo péptido, en donde  
el segundo péptido comprende una secuencia seleccionada del  
15 grupo formado por SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27 y SEQ ID N° 28.  
En otra realización, en los péptidos de glucagón que  
comprenden la prolongación del extremo de C, la treonina en la  
posición 29 del péptido de glucagón activo se reemplaza con  
una glicina. Un análogo de glucagón que tiene una sustitución  
20 de glicina por treonina en la posición 29 y que comprende la  
prolongación del extremo de carboxi de SEQ ID N° 26 es cuatro  
veces más potente en el receptor de GLP-1 que el glucagón  
nativo modificado para comprender la prolongación del extremo  
de carboxi de SEQ ID N° 26. La potencia en el receptor de GLP-

1 se puede aumentar adicionalmente con una sustitución de alanina por la arginina nativa en la posición 18.

Por lo tanto, como se revela en la presente se proporcionan  
5 análogos de glucagón o análogos de coagonistas de glucagón de alta potencia que también presentan solubilidad y/o estabilidad mejorada. Un ejemplo de análogo de glucagón de alta potencia presenta por lo menos un 200% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón, y  
10 optativamente es soluble a una concentración de por lo menos 1 mg/mL a un pH de entre 6 y 8 (por ejemplo, pH 7) y optativamente retiene por lo menos un 95% del péptido original (por ejemplo, un 5% o menos del péptido original se degrada o se rompe) después de 24 horas a 25°C. Como otro ejemplo, un  
15 ejemplo de análogo de coagonista de glucagón presenta más del 40% o más del 60% de actividad en los receptores tanto de glucagón como de GLP-1 (a una relación de entre 1:3 y 3:1, o entre 1:2 y 2:1), es optativamente soluble a una concentración de por lo menos 1 mg/mL a un pH de entre 6 y 8 (por ejemplo,  
20 pH 7) y optativamente retiene por lo menos el 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Otro ejemplode análogo de coagonista de glucagón presenta un 175% o más de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y un 20% o menos de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1,  
25 es optativamente soluble a una concentración de por lo menos 1

mg/mL, a un pH de entre 6 y 8 (por ejemplo, pH 7) y optativamente retiene por lo menos un 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Aún otro ejemplo de análogo de coagonista de glucagón presenta por lo menos un 10% o menos de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y por lo menos un 20% de actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, es optativamente soluble a una concentración de por lo menos 1 mg/mL a un pH de entre 6 y 8 (por ejemplo, pH 7) y optativamente retiene por lo menos un 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Aún otro ejemplo de un análogo de coagonista de glucagón presenta un 10% o menos pero por encima del 0,1%, 0,5% o 1% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y por lo menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% o más de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, es optativamente soluble en a una concentración de por lo menos 1 mg/mL a un pH de entre 6 y 8 (por ejemplo, pH 7) y optativamente retiene por lo menos un 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. En algunas realizaciones, dichos análogos de glucagón retienen por lo menos 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 de los aminoácidos naturales en las posiciones correspondientes en el glucagón nativo (por ejemplo, tienen 1-7, 1-5 o 1-3 modificaciones en relación con el glucagón natural).



Cualquiera de los siguientes péptidos está excluido de los compuestos de la invención, aunque otras modificaciones de ellos que presentan la actividad de coagonista deseado, composiciones farmacéuticas, estuches y métodos de tratamiento  
5 que usan dichos compuestos pueden estar incluidos en la invención. El péptido de SEQ ID N° 1 con una sustitución [Arg12] y con una amida del extremo de C. El péptido de SEQ ID N° 1 con sustituciones [Arg12,Lys20] y con una amida de extremo de C. El péptido de SEQ ID N° 1 con sustituciones  
10 [Arg12,Lys24] y con una amida de extremo de C. El péptido de SEQ ID N° 1 con sustituciones [Arg12,Lys29] y con una amida de extremo de C. El péptido de SEQ ID N° 1 con una sustitución [Glu9]. El péptido de SEQ ID N° 1 que carece de His1, con sustituciones [Glu9, Glu16, Lys29] y amida de extremo de C. El  
15 péptido de SEQ ID N° 1 con sustituciones [Glu9, Glu16, Lys29] y con una amida de extremo de C. El péptido de SEQ ID N° 1 con sustituciones [Lys13, Glu17] unido a través de un puente de lactama y con una amida de extremo de C. El péptido de SEQ ID N° 1 con sustituciones [Lys17, Glu21] unido a través de un  
20 puente de lactama y con una amida de extremo de C. El péptido de SEQ ID N° 1 que no tiene His1, con sustituciones [Glu20, Lys24] unido a través del puente de lactama.

De acuerdo con una realización se proporciona una composición  
25 farmacéutica que comprende cualquiera de los péptidos de

glucagón novedosos revelados en la presente, preferentemente estéril y preferentemente a un nivel de pureza de por lo menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Dichas composiciones pueden contener un péptido de glucagón a una concentración de por lo menos 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml o más alta. En una

10 realización, las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones acuosas que se esterilizan y optativamente se almacenan dentro de diferentes recipientes. Los compuestos de la presente invención se pueden usar de acuerdo con una

15 realización para preparar soluciones preformuladas listas para la inyección. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un polvo liofilizado. Las composiciones farmacéuticas se pueden empaquetar también como parte de un estuche que incluye un dispositivo descartable

20 para administrar la composición a un paciente. Los recipientes o estuches se pueden rotular para su almacenamiento a temperatura ambiente o a una temperatura refrigerada.

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para

25 aumentar rápidamente el nivel de glucosa o tratar la

hipoglucemia usando una composición acuosa preformulada de péptidos de glucagón de la invención. El método comprende el paso de administrar una cantidad eficaz de una solución acuosa que comprende un péptido de glucagón modificado novedoso de la presente invención. En una realización el péptido de glucagón se pegila en la posición 21 o 24 del péptido de glucagón y la cadena de PEG tiene un peso molecular de 500 a 5.000 Dalton. En una realización la solución de glucagón modificado se preempaqueta en un dispositivo que se usa para administrar la composición al paciente que sufre hipoglucemia.

De acuerdo con una realización se proporciona un método mejorado para regular los niveles de glucosa en sangre en pacientes insulino dependientes. El método comprende los pasos de administrar insulina en una cantidad terapéuticamente eficaz para el control de la diabetes y administrar un péptido de glucagón modificado novedoso de la presente invención en una cantidad terapéuticamente eficaz para la prevención de la hipoglucemia, en donde dichos pasos de administración se realizan dentro de las doce horas uno de otro. En una realización el péptido de glucagón y la insulina se administran conjuntamente como una sola composición, en donde el péptido de glucagón se pegila con una cadena de PEG que tiene un peso molecular seleccionado de la gama de 5.000 a 40.000 Dalton.

En otra realización, se proporciona un método para inducir la parálisis temporaria del tracto intestinal. El método comprende el paso de administrar uno o más de los péptidos de glucagón revelados en la presente a un paciente.

5

En aún otra realización, se proporciona un método para tratar la hiperglucemia, o un método para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso, que consiste en administrar una cantidad eficaz de una solución acuosa que comprende un  
10 péptido de glucagón de la invención. En una realización cualquiera de los métodos comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista de glucagón seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N°  
15 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19. En otra realización, el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista de glucagón, en donde el agonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo formado por SEQ ID  
20 N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, y SEQ ID N° 69, en donde el aminoácido 29 del péptido de glucagón se une a un segundo péptido a través de un enlace de péptido, y dicho segundo péptido comprende la  
25 secuencia de SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27 o SEQ ID N° 28. En

otras realizaciones, se proporcionan métodos para tratar a diabéticos que comprende administrar conjuntamente una dosis convencional o una dosis reducida de insulina y un péptido de glucagón de la invención. También se proporcionan métodos para  
5 tratar a diabéticos con un péptido de glucagón de la invención, sin la administración conjunta de insulina.

En aún otro aspecto, la invención proporciona métodos novedosos para tratar la hiperglucemia, y métodos novedosos  
10 para reducir el apetito o promover la pérdida de peso corporal que consisten en la administración de una molécula de coagonista de glucagón/GLP-1 (que incluye sales farmacéuticamente aceptables de ella) que activa tanto el receptor de glucagón como el receptor de GLP-1. El agonismo,  
15 es decir la activación, de los receptores de glucagón y de GLP-1 proporciona un mejoramiento inesperado comparado con el agonismo de GLP-1 solo en el tratamiento de la hiperglucemia. Por lo tanto, el agregado de agonismo de glucagón proporciona un aditivo o efecto sinérgico inesperado, u otro  
20 beneficio(s) clínico inesperado. La administración con una dosis convencional de insulina, una dosis reducida de insulina, o sin insulina está contemplada de acuerdo con dichos métodos. El agonismo del receptor de glucagón también tiene un efecto beneficioso inesperado comparado con el

agonismo de GLP-1 solo en la promoción de la pérdida de peso o en la prevención del aumento de peso.

Ejemplos de moléculas de coagonistas de glucagón/GLP-1 incluyen péptidos de glucagón de la invención, análogos de GLP-1 que activan receptores de GLP-1 y de glucagón, fusiones de glucagón y GLP-1 o fusiones de análogos de glucagón y análogos de GLP-1, o derivados modificados químicamente de ellos. Alternativamente, un compuesto que activa el receptor de glucagón se puede administrar conjuntamente con un compuesto que activa el receptor de GLP-1 (tal como un análogo de GLP-1, un análogo de exendina 4, o derivados de ellos). La invención también contempla la administración conjunta de un análogo de agonista de glucagón con un análogo de agonista de GLP-1.

Dichos métodos para tratar la hiperglucemia y/o para disminuir el apetito o promover la pérdida de peso corporal incluyen la administración de un análogo de glucagón con una modificación en la posición 12 (por ejemplo Arg12), optativamente en combinación con modificaciones en la posición 16 y/o 20. Los métodos de la invención incluyen la administración de análogos de glucagón que comprenden un puente intramolecular entre las cadenas laterales de dos aminoácidos dentro de la región de los aminoácidos 12 y 29 que están separados por tres

aminoácidos intervinientes, por ejemplo las posiciones 12 y 16, las posiciones 13 y 17 (por ejemplo Lys13 Glu17 o Glu13 Lys 17), las posiciones 16 y 20, las posiciones 17 y 21 (por ejemplo Lys17 Glu 21 o Glu17 Lys 21), las posiciones 20 y 24 o las posiciones 24 y 28, con la condición opcional de que el aminoácido en la posición 9 no sea Glu, y que optativamente incluye una amida o éster de extremo de C.

De acuerdo con una realización, todos los análogos de glucagón o los análogos de GLP-1 conocidos en el arte previo que son útiles en dicho método están excluidos de dichas moléculas de coagonista de glucagón/GLP-1. En otra realización, los péptidos descritos en la Patente Estadounidense N° 6.864.069 que actúan como un agonista de GLP-1 y también como un antagonista de glucagón para tratar la diabetes también están excluidos como moléculas de coagonista de glucagón/GLP-1. en otra realización, se excluye el uso de antagonistas de glucagón para tratar la diabetes, tales como los antagonistas descritos en Unson et al, *J.Biol.Chem.*, 264:789-794 (1989), Alm et al, *J.Biol.Chem.*, 44:3109-3116 (2001) y Sapse et al, *Mol.Med.*, 8(5):251-262 (2002). En otra realización, oxintomodulina o un análogo de glucagón que contiene los 8 aminoácidos del extremo de C de oxintomodulina (SEQ ID N° 27) también están excluidos como moléculas de coagonista de glucagón/GLP-1.

Se informa que dichos métodos para tratar la hiperglucemia son  
útiles para una variedad de tipos de hiperglucemia, que  
incluyen diabetes, diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus  
tipo II, o diabetes gestacional, insulino-dependiente o no  
5 insulino-dependiente, y que reducen complicaciones de la  
diabetes que incluyen nefropatía, retinopatía y enfermedad  
vascular. Se espera que dichos métodos para reducir el apetito  
o promover la pérdida de peso corporal sean útiles en la  
reducción del peso corporal, la prevención del aumento de peso  
10 o el tratamiento de la obesidad con diferentes causas, que  
incluyen la obesidad inducida por fármacos, y la reducción de  
complicaciones asociadas con la obesidad que incluyen la  
enfermedad vascular (enfermedad de arterias coronarias,  
ataque, enfermedad vascular periférica, reperfusión de  
15 isquemia, etc), hipertensión, inicio de diabetes tipo II,  
hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas.

Todos los métodos terapéuticos, las composiciones  
farmacéuticas, los estuches y otras realizaciones similares  
20 descritas en la presente contemplan que el uso del término  
análogos de glucagón incluye todas las sales o ésteres  
farmacéuticamente aceptables de ellos.

**Breve Descripción de los Dibujos**



La Figura 1 es un gráfico de barras que representa la estabilidad de Glucagón Cys<sup>21</sup>maleimidoPEG<sub>5K</sub> a 37°C durante 24, 48, 72, 96, 144 y 166 horas, respectivamente.

- 5 La Figura 2 representa datos generados desde análisis de HPLC de Glucagón Cys<sup>21</sup> maleimidoPEG<sub>5K</sub> a pH 5 incubado a 37°C durante 24, 72 o 144 horas, respectivamente.

La Figura 3 representa datos que muestran la inducción de cAMP  
10 mediada por el receptor por análogos de glucagón. Más específicamente, la Figura 3A compara la incubación del receptor de glucagón por análogos de glucagón E16, K20 ●, E15, E16 ▲, E16, K20 ▼, E15, E16 ◀, y Glu-NH<sub>2</sub> ■.

- 15 Las Figuras 4A y 4B representan datos que muestran la inducción de cAMP mediada por el receptor por análogos de glucagón. Más específicamente, la Figura 4A compara la inducción del receptor de glucagón por análogos de glucagón Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E16Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, E3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▼, Om3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub>  
20 ◀ y Nle3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▶ en relación con el glucagón nativo ■, mientras que la Figura 4B compara la inducción del receptor de GLP-1 por análogos de glucagón Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, E3, E16Gluc-NH<sub>2</sub> ▼, Om3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ◀ y Nle3, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▶ en relación con GLP-1 ■.

Las Figuras 5A y 5B representan datos que muestran la inducción de cAMP mediada por el receptor por análogos de glucagón. Más específicamente, la Figura 5A compraa la inducción del receptor de glucagón por análogos de glucagón  
5 (E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> • (5nM, solución de materia prima), E15, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲ (5nM, solución de materia prima), E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> ▼ (10nM, solución de materia prima), E15, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> (10nM, solución de materia prima) y E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ►) en relación con glucagón-NH<sub>2</sub> (■), mientras que la Figura 5B compara la inducción  
10 del receptor de GLP-1 por análogos de glucagón (E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> •, E15, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲ y E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ►) en relación con GLP-1 (■) y glucagón-NH<sub>2</sub> (□).

Las Figuras 6A y 6B representan datos que muestran la inducción de cAMP mediada por el receptor por análogos de glucagón. Más específicamente, la Figura 6A compara la inducción del receptor de glucagón por análogos de glucagón  
15 (Gluc-NH<sub>2</sub> •, K12E16-NH<sub>2</sub> lactama ▲, E16K20-NH<sub>2</sub> lactama ▼, K20E24-NH<sub>2</sub> lactama ◀ y E24K20-NH<sub>2</sub> lactama ►) en relación con glucagón (■), mientras que la Figura 6B compara la inducción del receptor de GLP-1 por análogos de glucagón (Gluc-NH<sub>2</sub> •, K12E16-NH<sub>2</sub> lactama ▲, E16K20-NH<sub>2</sub> lactama ▼, K20E24-NH<sub>2</sub> lactama  
20 ◀ y E24K28-NH<sub>2</sub> lactama ►) en relación con GLP-1 (■).

Las Figuras 7A y 7B representan datos que muestran la inducción de cAMP mediada por el receptor por análogos de glucagón. Más específicamente, la Figura 7A compara la inducción del receptor de glucagón por análogos de glucagón (Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, K12, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> lactama ▼, E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> ◀ y E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> lactama ▶) en relación con glucagón (■), mientras que la Figura 7B compara la inducción del receptor de GLP-1 por análogos de glucagón (Gluc-NH<sub>2</sub> ●, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> ▲, K12, E16 Gluc-NH<sub>2</sub> lactama ▼, E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> ◀ y E16, K20 Gluc-NH<sub>2</sub> lactama ▶) en relación con GLP-1 (■).

Las Figuras 8A-8F representan datos que muestran la inducción de cAMP mediada por el receptor por análogos de glucagón en el receptor de glucagón (Figuras 8A, 8C y 8E) o el receptor de GLP-1 (Figuras 8B, 8C y 8F) en donde hE = ácido homoglutámico y hC = ácido homocisteico.

Las Figuras 9A y 9B representan datos que muestran la inducción de cAMP mediada por el receptor por análogos de GLP (17-26) glucagón, en donde las posiciones de aminoácidos 17-26 de glucagón nativo (SEQ ID N° 1) se han sustituido con los aminoácidos de las posiciones 17-26 de GLP-1 nativo (SEQ ID N° 50). Más específicamente, la Figura 9A compara la inducción del receptor de glucagón por los análogos de GLP (17-26) glucagón designados y la Figura 9B compara la inducción del

receptor de GLP-1 por los análogos de GLP (17-26) glucagón designados.

Las Figuras 10A-E son gráficos que proporcionan datos in vivo  
5 que demuestran la capacidad de los péptidos de glucagón de la presente invención de inducir la pérdida de peso en ratones a los cuales se inyectó por vía subcutánea con las cantidades indicadas de los compuestos respectivos. Los identificadores de secuencias para el péptido de glucagón enumerados en las  
10 Figuras 10A-10E son los siguientes: para la Figura 10A: Quimera 2 Aib2 C24 40K PEG (SEQ ID N° 485), Aib2 C24 Quimera 2 40K lactama (SEQ ID N° 504) y Aib2 E16 K20 Gluc-HH<sub>2</sub> Lac 40K (SEQ ID N° 528); Figura 10B: Aib2 C24 Chi 2 lactama 40K (SEQ ID N° 504), DMIA1 C24 Chi 2 Lactama 40K (SEQ ID N° 505),  
15 Quimera 2 DMDIA1 C24 40K (SEQ ID N° 519) y Quimera 2 Aib2 C24 40K (SEQ ID N° 485), en donde el número al final de la secuencia designa la dosificación usada, 70 o 350 nmol/kg; Figura 10C: AIB2 con lactama C24 40K (SEQ ID N° 504), AIB2 E16 K20 con lactama C24 40K (SEQ ID N° 528), DMIA1 E16 K20 con  
20 lactama C24 40K (SEQ ID N° 510), DMIA1 E16 K20 con lactama CEX 40K (SEQ ID N° 513) y DMIA1 E16 K20 sin lactama CEX 40K (SEQ ID N° 529); Figura 10D: AIB2 con lactama C24 40K (SEQ ID N° 504), AIB2 E16 K20 con lactama C24 40K (SEQ ID N° 528), DMIA1 E16 K20 con lactama C24 40K (SEQ ID N° 510) y DMIA1 E16 K20  
25 con lactama/Cex C24 40K (SEQ ID N° 513), en donde el número al

final de la secuencia designa la dosificación usada, de 14 o 70 nmol/kg/wk; Figura 10E: AIB2 sin lactama C24 40K (SEQ ID N° 486), Chi 2 AIB2 C24 CEX 40K (SEQ ID N° 533), AIB2 E16 A18 K20 C24 40K (SEQ ID N° 492), AIB2 sin lactama CEX G29 C40 40K (SEQ ID N° 488), AIB2 sin lactama CEX C40 C41-2 (SEQ ID N° 532), AIB2 sin lactama CEX C24 C40-2 (SEQ ID N° 531) y AIB2 sin lactama C24 60K (SEQ ID N° 498), en donde la designación 40K o 60K representa el peso molecular de la cadena de polietileno unida al péptido de glucagón.

10

#### **Descripción Detallada**

#### **Definiciones**

Al describir y reivindicar la invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

Como se usa en la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los portadores farmacéuticos comunes, tales como solución salina con tampón de fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diferentes tipos de agentes humectantes. El término también comprende cualquiera de los agentes aprobados por la agencia reguladora del

20

gobierno de Estados Unidos o enumerados en la Farmacopea de Estados Unidos para su uso en animales, que incluyen humanos.

Como se usa en la presente, el término "sal farmacéuticamente  
5    "aceptable" se refiere a sales de compuestos que retienen la  
actividad biológica del compuesto padre, y que no son  
biológica o de otro modo indeseables. Muchos de los compuestos  
revelados en la presente son capaces de formar sales ácidas  
y/o básicas en virtud de la presencia de grupos amino y/o  
10    carboxilo o grupos similares a ellos.

Las sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables se  
pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las  
sales derivadas de bases inorgánicas incluyen a modo de  
15    ejemplo solamente, sales de sodio, potasio, litio, amonio,  
calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas  
incluyen, en forma no taxativa, sales de aminas primarias,  
secundarias y terciarias.

20    Las sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables se  
pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos.  
Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido  
clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido  
nítrico, ácido fosfórico, y similares. Las sales derivadas de  
25    ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico,

ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido salicílico y similares.

Como se usa en la presente, el término "tratamiento" incluye la profilaxis del trastorno o condición específica, o el alivio de los síntomas asociados con un trastorno o condición específica y/o con la prevención o la eliminación de dichos síntomas. Por ejemplo, como se usa en la presente el término "tratamiento de diabetes" se refiere en general a la alteración de los niveles de glucosa en sangre en la dirección de los niveles normales y puede incluir el aumento o la disminución de los niveles de glucosa en sangre según la situación dada.

Como se usa en la presente, una cantidad "eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido de glucagón se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente del péptido para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, un efecto deseado sería la prevención o el tratamiento de la hipoglucemia, medida, por ejemplo, por un aumento en el nivel de glucosa en sangre. Otro efecto deseado para los análogos de

coagonistas de la presente invención incluiría tratar la hiperglucemia, por ejemplo, medida por un cambio en el nivel de glucosa en sangre más cercano al normal, o inducir la pérdida de peso/prevenir el aumento de peso, por ejemplo, medido mediante la reducción en el peso corporal, o prevenir o reducir un aumento en el peso corporal, o normalizar la distribución de grasa corporal. La cantidad que es "eficaz" varía de un sujeto a otro, según la edad y la condición general de la persona, el modo de administración y similares. Por lo tanto, no siempre es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en el arte usando la experimentación de rutina.

El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario sino por alguna otra vía tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal o intravenosa.

Como se usa en la presente, el término "purificado" y términos similares se relaciona con el aislamiento de una molécula o un compuesto en una forma que está sustancialmente libre de contaminantes que normalmente están asociados con la molécula o el compuesto en un medio nativo o natural. Como se usa en la presente, el término "purificado" no necesita una pureza absoluta, antes bien se desea que sea una definición relativa.



El término "polipéptido purificado" se usa en la presente para describir un polipéptido que se ha separado de otros compuestos que incluyen, en forma no taxativa, moléculas de ácido nucleico, lípidos y carbohidratos.

5

El término "aislado" necesita que el material de referencia se elimine de su medio original (por ejemplo, el medio natural si es natural). Por ejemplo, un polinucleótido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo  
10 polinucleótido, separado de algunos o de la totalidad de los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado.

Como se usa en la presente, el término "péptido" comprende una secuencia de 3 o más aminoácidos y normalmente menos de 50  
15 aminoácidos, en donde los aminoácidos son naturales o no naturales. Los aminoácidos no naturales se refieren a aminoácidos que no son naturales in vivo pero que, de todos modos, se pueden incorporar en las estructuras de péptidos descritas en la presente.

20

Como se usan en la presente, los términos "polipéptido" o "proteína" son términos que se usan en forma intercambiable para referirse a un polímero de aminoácidos, independientemente de la longitud del polímero. Normalmente,

los polipéptidos y las proteínas tienen una longitud del polímero que es mayor que aquella de los "péptidos".

Un "péptido de glucagón"! como se usa en la presente incluye  
5 cualquier péptido que comprende, la secuencia de aminoácido de  
SEQ ID N° 1, o cualquier análogo de la secuencia de aminoácido  
de SEQ ID N°1, que incluye sustituciones, agregados,  
eliminaciones o modificaciones postraslacionales (por  
ejemplo, metilación, acilación, ubiquitinación, enlace  
10 covalente intramolecular tal como formación de puente de  
lactama, PEGilación y similares) del péptido, en donde el  
análogo estimula la actividad del receptor de glucagón o de  
GLP-1, por ejemplo, medida mediante la producción de cAMP  
usando el ensayo que se describe en el Ejemplo 14.

15

El término "agonista de glucagón" se refiere a un complejo que  
comprende un péptido de glucagón que estimula la actividad del  
receptor de glucagón, por ejemplo, medida mediante la  
producción de cAMP usando el ensayo que se describe en el  
20 Ejemplo 14.

Como se usa en la presente, un "análogo de agonista de  
glucagón" es un péptido de glucagón que comprende una  
secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 10, SEQ  
25 ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N°

15, o un análogo de dicha secuencia que se ha modificado para incluir una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en una o más de las posiciones 2, 3, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29.

5  
Como se usa en la presente, una "modificación" de aminoácido se refiere a una sustitución, agregado o eliminación de un aminoácido, e incluye la sustitución o el agregado de cualquiera de los 20 aminoácidos que se hallan comúnmente en  
10 las proteínas humanas, así como los aminoácidos atípicos o no naturales. En toda la solicitud de patente, todas las referencias a una posición particular de aminoácido por número (por ejemplo posición 28) se refieren al aminoácido que está en esa posición en el glucagón nativo (SEQ ID N° 1) o la  
15 posición del aminoácido correspondiente en cualquier análogo de él. Por ejemplo, una referencia en la presente a la "posición 28" significaría la posición 27 correspondiente para un análogo de glucagón en el cual se ha eliminado el primer aminoácido de la SEQ ID N°1. En forma similar, una referencia  
20 en la presente a la "posición 28" significaría la posición 29 correspondiente para un análogo de glucagón en el cual se ha agregado un aminoácido antes del extremo de N de SEQ ID N° 1. Las fuentes comerciales de aminoácidos atípicos incluyen Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), ChemPep Inc. (Miami, FL), y  
25 Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA). Los aminoácidos

atípicos se pueden comprar a proveedores comerciales, sintetizados nuevamente, o modificados químicamente o derivados de otros aminoácidos.

5 Como se usa en la presente un "coagonista de glucagón" es un péptido de glucagón que presenta actividad en el receptor de glucagón de por lo menos el 10% al 500% o más en relación con el glucagón nativo y también presenta actividad en el receptor de GLP-1 de por lo menos el 10% al 200% o más en relación con  
10 GLP-1 nativo.

Como se usa en la presente una "molécula de coagonista de glucagón/GLP-1" es una molécula que presenta actividad en el receptor de glucagón de por lo menos el 10% en relación con el  
15 glucagón nativo y también presenta actividad en el receptor de GLP-1 de por lo menos el 10% en relación con el GLP-1 nativo.

Como se usa en la presente el término "glucagón nativo" se refiere a un péptido que comprende la secuencia de SEQ ID N° 1  
20 y el término "GLP-1 nativo" es un término genérico que designa la amida de GLP-1(7-36) (que comprende la secuencia de SEQ ID N° 52), el ácido de GLP-1(7-37) (que comprende la secuencia de SEQ ID N° 50) o una mezcla de esos dos compuestos. Como se usa en la presente, una referencia general a "glucagón" o "GLP-1"

en la ausencia de cualquier otra designación significa glucagón nativo o GLP-1, respectivamente.

Como se usa en la presente una "sustitución" de aminoácido se  
5 refiere al reemplazo de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente.

Como se usa en la presente, el término "sustitución de aminoácido conservadora" se define en la presente como  
10 intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

- I. Residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares:  
Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- 15 II. Residuos con carga negativa, polares y sus amidas y ésteres:  
Asp, Asn, Glu, Gln, ácido cisteico y ácido homocisteico
- III. Residuos con carga positiva, polar:  
His, Arg, Lys, Ornitiina (Orn)
- 20 IV. Residuos grandes, alifáticos, no polares:  
Met, Leu, Ile, Val, Cys, Norleucina (Nle), homocisteína
- V. Residuos grandes, aromáticos:  
Phe, Tyr, Trp, acetil fenilalanina

Como se usa en la presente el término general "cadena de poliegilenglicol" o "cadena de PEG" se refiere a mezclas de polimeros de condensación de óxido de etileno y agua, en una cadena ramificada o recta, representada por la fórmula general

5  $H(OCH_2CH_2)_nOH$ , en donde n es por lo menos 9. A falta de cualquier otra caracterización, el término incluye polímeros de etilenglicol con un peso molecular total promedio seleccionado de la gama de 500 a 40.000 Dalton. "Cadena de polietilenglicol" o "cadena de PEG" se usa en combinación con

10 un sufijo numérico para indicar el peso molecular promedio aproximado de ella. Por ejemplo, PEG-5.000 se refiere a una cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular total promedio de 5.000.

15 Como se usa en la presente el término "pegilado" y los términos similares se refieren a un compuesto que se ha modificado desde su estado nativo uniendo una cadena de polietilenglicol al compuesto. Un "péptido de glucagón pegilado" es un péptido de glucagón que tiene una cadena de

20 PEG unido en forma covalente al péptido de glucagón.

Como se usa en la presente una referencia general a un péptido comprende péptidos que tienen el extremo de amino y carboxi modificado. Por ejemplo, una cadena de aminoácido que

25 comprende un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del

extremo está comprendido por una secuencia de aminoácido que designa los aminoácidos comunes.

Como se usa en la presente, un "ligador" es un enlace, una  
5 molécula o un grupo de moléculas que une dos entidades separadas una de otra. Los ligadores pueden proporcionar la separación óptima de dos entidades o pueden proveer además una ligadura lábil que permite que las dos entidades se separen una de otra. Las ligaduras lábiles incluyen grupos  
10 fotorompibles, grupos lábiles al ácido, grupos lábiles a la base y grupos rompibles por enzimas.

Como se usa en la presente un "dímero" es un complejo que comprende dos subunidades unidas en forma covalente una a otra  
15 a través de un ligador. El término dímero, cuando se usa sin ningún lenguaje calificativo, comprende tanto homodímeros como heterodímeros. Un homodímero comprende dos subunidades idénticas, mientras que un heterodímero comprende dos subunidades que difieren, aunque las dos subunidades son  
20 sustancialmente similares una a otra.

Como se usa en la presente el término "aminoácido con una carga" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que tiene una carga negativa (es decir, desprotonada)  
25 o una carga positiva (es decir, protonada) en solución acuosa

a pH fisiológico. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico, y ácido homoglutámico, mientras que los aminoácidos con carga positiva incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos con una carga incluyen los aminoácidos con una carga entre los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas humanas, así como aminoácidos atípicos o no naturales.

10 Como se usa en la presente, el término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido que comprende un segundo grupo ácido, que incluye por ejemplo, un grupo ácido carboxílico o ácido sulfónico.

#### 15 **Realizaciones**

La invención proporciona péptidos de glucagón con actividad aumentada o disminuida en el receptor de glucagón, o receptor de GLP-1 o ambos. La invención también proporciona péptidos de glucagón con selectividad alterada para el receptor de glucagón contra el receptor de GLP-1.

Una modificación de aminoácido en la posición 16 del glucagón nativo (SEQ ID N° 1) que se describe en la presente proporciona actividad aumentada en el receptor de glucagón.



Por ejemplo, una modificación de aminoácido en la posición 3 que se describe en la presente proporciona actividad reducida en el receptor de glucagón.

- 5 La actividad aumentada en el receptor de GLP-1 se proporciona reemplazando el ácido carboxílico del aminoácido del extremo de C con un grupo de carga neutra, tal como una amida o un éster.
- 10 La actividad aumentada en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante las modificaciones que permiten la formación de un puente intramolecular entre las cadenas laterales de dos aminoácidos que están separadas por tres aminoácidos intervinientes, por ejemplo, las posiciones 12 y 16, o 16 y
- 15 20, o 20 y 24, como se describe en la presente.

La actividad aumentada en el receptor de GLP-1 se proporciona con una modificación de aminoácido en la posición 20 como se describe en la presente.

20

- La actividad aumentada en el receptor de GLP-1 se proporciona en los análogos de glucagón que comprende la prolongación del extremo de C de SEQ ID N° 26. La actividad de GLP-1 en dichos análogos que comprenden SEQ ID N° 26 se puede aumentar
- 25 adicionalmente modificando el aminoácido en la posición 18, 28

o 29, o en la posición 18 y 29, como se describe en la presente.

La restauración de la actividad de glucagón que se ha reducido  
5 por las modificaciones de aminoácidos en las posiciones 1 y 2  
se proporciona con un enlace covalente entre las cadenas  
laterales de dos aminoácidos que están separados por tres  
aminoácidos intervinientes, por ejemplo, las posiciones 12 y  
16, o 16 y 20, o 20 y 24, como se describe en la presente.

10

Otro aumento modesto en la potencia de GLP-1 se proporciona  
modificando el aminoácido en la posición 10 para que sea Trp.

Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente que  
15 aumentan o disminuyen la actividad de receptor de glucagón y  
que aumentan la actividad de receptor de GLP-1 se puede  
aplicar individualmente o en combinación. Cualquiera de las  
modificaciones descritas anteriormente también se puede  
combinar con otras modificaciones que confieren otras  
20 propiedades deseables, tales como la solubilidad y/o  
estabilidad y/o duración de acción aumentada.  
Alternativamente, cualquiera de las modificaciones descritas  
anteriormente se puede combinar con otras modificaciones que  
no afectan sustancialmente la solubilidad o la estabilidad o

la actividad. Ejemplos de modificaciones incluyen en forma no taxativa:

- (A) Mejorar la solubilidad, por ejemplo, introduciendo una, dos, tres o más aminoácido(s) con carga a la posición del extremo de C de glucagón nativa, preferentemente en una posición del extremo de C a la posición 27. Dicho aminoácido con carga se puede introducir sustituyendo un aminoácido nativo con un aminoácido con carga, por ejemplo en las posiciones 28 o 29, o alternativamente agregando un aminoácido con una carga, por ejemplo después de la posición 27, 28 o 29. En ejemplos de realizaciones, uno, dos, tres o la totalidad de los aminoácidos con carga pueden tener una carga negativa. En otras realizaciones, uno, dos, tres o la totalidad de los aminoácidos con carga tienen carga positiva. Dichas modificaciones aumentan la solubilidad, por ejemplo proporcionan por lo menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 25 veces, 30 veces o más la solubilidad en relación con el glucagón nativo a un pH dado entre 5,5 y 8, por ejemplo a pH 7, cuando se mide después de 24 horas a 25°C.
- (B) Aumentar la solubilidad y la duración de la acción o la semivida en circulación mediante el agregado de un grupo hidrófilo tal como una cadena de polietilenglicol, como se describe en la presente, por

ejemplo, en las posiciones 16, 17, 20, 21, 24, o 29 o en el extremo de C del péptido.

- (C) Aumentar la solubilidad mediante la modificación del ácido aspártico en la posición 15, por ejemplo, mediante la eliminación o la sustitución con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico. Dichas modificaciones pueden reducir la degradación o la rotura a un pH dentro de la gama de 5,5 a 8, por ejemplo, reteniendo por lo menos un 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% del péptido original después de 24 horas a 24°C.
- (D) Aumentar la estabilidad mediante la modificación del aminoácido en la posición 27, por ejemplo, mediante la sustitución con metionina, leucina o norleucina. Dichas modificaciones pueden reducir la degradación oxidativa.
- (E) Aumentar la resistencia a la rotura de dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) mediante la modificación del aminoácido en la posición 1 o 2 como se describe en la presente.
- (F) Sustituciones conservadoras, agregados o eliminaciones que no afectan la actividad, por ejemplo, las sustituciones conservadoras en una o más de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29; o eliminación del aminoácido 29 optativamente combinado con una amida o un éster del

extremo de C en el lugar del grupo ácido carboxílico del extremo de C.

(G) Agregar prolongaciones del extremo de C como se describe en la presente.

5 (H) Homodimerización o heterodimerización como se describe en la presente.

En ejemplos de realizaciones, el péptido de glucagón puede comprender un total de 1 hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5,  
10 hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta 10 modificaciones de aminoácidos en relación con la secuencia de glucagón nativo.

Una realización revelada en la presente se refiere a un  
15 agonista de glucagón que se ha modificado en relación con el péptido de tipo silvestre de His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID N° 1) para aumentar la potencia del péptido en el receptor de glucagón.  
20 Sorpresivamente, los solicitantes han descubierto que la serina que normalmente está en la posición 16 del glucagón nativo (SEQ ID N°1) se puede sustituir con aminoácidos selectos para aumentar la potencia de glucagón, en términos de su capacidad para estimular la síntesis de cAMP en un modelo  
25 de ensayo in vitro validado (véase el Ejemplo 14). Más

específicamente, esta sustitución aumenta la potencia del análogo por lo menos 2 veces, 4 veces, 5 veces, y hasta 10 veces más en el receptor de glucagón. Esta sustitución también aumenta la actividad del análogo en el receptor de GLP-1 por lo menos 5 veces, 10 veces, o 15 veces en relación con el glucagón nativo, pero la selectividad se mantiene para el receptor de glucagón comparado con el receptor de GLP-1.

De acuerdo con una realización el residuo de serina en la posición 16 del glucagón nativo se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo formado por ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, treonina o glicina. De acuerdo con una realización, el residuo de serina en la posición 16 del glucagón nativo se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo formado por ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico y ácido homocisteico y en una realización el residuo de serina se sustituye con ácido glutámico. En una realización, el péptido de glucagón que tiene especificidad aumentada para el receptor de glucagón comprende el péptido de SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 o un análogo de agonista de glucagón de él, en donde el aminoácido del extremo de carboxi retiene su grupo ácido carboxílico nativo. De acuerdo con una realización se proporciona un agonista de glucagón que comprende la secuencia NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-

Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-  
COOH (SEQ ID N° 10), en donde el péptido presenta  
aproximadamente una potencia aumentada cinco veces en el  
receptor de glucagón, en relación con el glucagón nativo  
5 medido mediante el ensayo de cAMP in vitro del Ejemplo 14.

Los péptidos de glucagón de la presente invención se pueden  
modificar adicionalmente para mejorar la solubilidad y la  
estabilidad del péptido en soluciones acuosas a pH fisiológico  
10 mientras que retiene la actividad biológica alta en relación  
con el glucagón nativo. De acuerdo con una realización, la  
introducción de grupos hidrófilos en las posiciones 17, 21 y  
24 del péptido de SEQ ID N° 9 o SEQ ID N° 10 se anticipan a  
mejorar la solubilidad y la estabilidad del análogo de  
15 glucagón de alta potencia en soluciones que tienen un pH  
fisiológico. La introducción de dichos grupos también aumenta  
la duración de acción, por ejemplo medida por una semivida en  
circulación prolongada. Los grupos hidrófilos adecuados  
incluyen cualquier polímero soluble en agua conocido en el  
20 arte, que incluye PEG, homo o copolímeros de PEG, un polímero  
sustituido con monometilo de PEG (mPEG) o glicerol de  
polioxietileno (POG). De acuerdo con una realización el grupo  
hidrófilo comprende una cadena de polietileno (PEG). Más  
específicamente, en una realización el péptido de glucagón  
25 comprende la secuencia de SEQ ID N° 6 o SEQ ID N° 7, en donde

una cadena de PEG está unido en forma covalente a las cadenas laterales de aminoácidos presentes en las posiciones 21 y 24 del péptido de glucagón y el aminoácido de extremo de carboxi del péptido tiene el grupo ácido carboxílico.

5

La presente invención también comprende otros conjugados en donde los péptidos de glucagón de la invención se unen, optativamente a través de un enlace covalente y optativamente a través de un ligador, a un conjugado. La ligadura se puede  
10 realizar mediante enlaces químicos covalentes, fuerzas físicas tales como interacciones de electrostáticas, de hidrógeno, iónicas, de van der Waals, o hidrófobas o hidrófilas. Se puede usar una variedad de sistemas de acoplamiento no covalentes, que incluyen biotina-avidina, receptor de ligando,  
15 enzima/sustrato, ácido nucleico/proteína de unión a ácido nucleico, lípido/proteína de unión a lípido, compañeros de molécula de adhesión celular; o cualquier compañero o fragmento de unión de ellos que tienen afinidad uno con otro.

20 Ejemplos de conjugados incluyen en forma no taxativa péptido o polipéptido heterólogo (que incluye, por ejemplo, una proteína de plasma), un agente dirigido, una inmunoglobulina o parte de él (por ejemplo, región variable, CDR, o región de Fc), un marcador de diagnóstico tal como un radioisótopo, fluoróforo,  
25 o marcador enzimático, un polímero que incluye polímeros



solubles en agua, u otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En una realización se proporciona un conjugado que comprende un péptido de glucagón de la presente invención y una proteína de plasma, en donde la proteína de plasma se  
5 selecciona del grupo formado por albúmina, transferina, fibrinógeno y globulina. En una realización el grupo proteína en plasma del conjugado es albúmina o transferina. En algunas realizaciones, el ligador comprende una cadena de átomos de 1 a 60, o de 1 a 30 átomos o más largas, de 2 a 5 átomos, de 2 a  
10 10 átomos, de 5 a 10 átomos, o de 10 a 20 átomos de largo. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena son todos átomos de carbono. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena principal del ligador se seleccionan del grupo formado por C, O, N y S. Los átomos y ligadores de la cadena se pueden  
15 seleccionar de acuerdo con su solubilidad (hidrofilicidad) esperada de manera tal que proporcionen un conjugado más soluble. En algunas realizaciones, el ligador proporciona un grupo funcional que está sujeto a la rotura por una enzima u otro catalizador o condiciones hidrolíticas halladas en el  
20 tejido u órgano o célula blanco. En algunas realizaciones, la longitud del ligador es suficientemente larga para reducir el potencial de impedimento estérico. Si el ligador es un enlace covalente o un enlace de peptidilo y el conjugado es un polipéptido, el conjugado completo puede ser una proteína de  
25 fusión. Dichos ligadores de peptidilo pueden tener cualquier

longitud. Ejemplos de ligadores tienen de 1 a 50 aminoácidos de longitud, de 5 a 50, de 3 a 5, de 5 a 10, de 5 a 15, o de 10 a 30 aminoácidos de longitud. Dichas proteínas de fusión se pueden producir alternativamente mediante métodos de ingeniería genética conocidos para un experto en el arte.

La presente invención también comprende péptidos o proteínas de fusión de glucagón en donde un segundo péptido o proteína se ha fusionado a un extremo, por ejemplo, el extremo de carboxi del péptido de glucagón. Más específicamente, el péptido de glucagón de fusión puede comprender un agonista de glucagón de SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 9 o SEQ ID N° 10 que además comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 26 (GPSSFAPPPS), SEQ ID N° 27 (KENRNNIA) o SEQ ID N° 28 (KRNR) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón. En una realización, la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID N° 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID N° 28 (KRNR) se une al aminoácido 29 del péptido de glucagón a través de un enlace de péptido. Los solicitantes han descubierto que en los péptidos de fusión de glucagón que comprenden el péptido de prolongación del extremo de C de Exendina 4 (por ejemplo, SEQ ID N° 26 o SEQ ID N° 29), la sustitución del residuo de treonina nativa en la posición 29 con glicina aumenta dramáticamente la actividad del receptor de GLP-1. Esta sustitución de aminoácido se puede usar en conjunto con otras

modificaciones reveladas en la presente para aumentar la afinidad de los análogos de glucagón para el receptor de GLP-1. Por ejemplo, la sustitución T29G se puede combinar con las sustituciones de aminoácidos S16E y N20K, optativamente con un  
5 puente de lactama entre los aminoácidos 16 y 20, y optativamente con el agregado de una cadena de PEG como se describe en la presente. En una realización se proporciona un receptor de glucagón/GLP-1, que comprende la secuencia de SEQ ID N° 64. En una realización la parte de péptido de glucagón  
10 del péptido de fusión de glucagón se selecciona del grupo formado por SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, y SEQ ID N° 5 en donde una cadena de PEG, cuando está presente en las posiciones 17, 21, 24, o el aminoácido del extremo de C, o tanto 21 como 24, se selecciona de la gama de  
15 500 a 40.000 Dalton. Más específicamente, en una realización el segmento de péptido de glucagón se selecciona del grupo formado por SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8 y SEQ ID N° 63, en donde la cadena de PEG se selecciona de la gama de 500 a 5.000. En una realización el péptido de glucagón es un péptido de fusión  
20 que comprende la secuencia de SEQ ID N° 55 y SEQ ID N° 65, en donde el péptido de SEQ ID N° 65 está unido al extremo de carboxi de SEQ ID N° 55.

De acuerdo con una realización, otra modificación química del  
25 péptido de glucagón de SEQ ID N° 10 confiere potencia

aumentada del receptor de GLP-1 a un punto donde la actividad relativa en los receptores de glucagón y de GLP-1 es virtualmente equivalente. Por consiguiente, en una realización se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 en donde el aminoácido de extremo de los péptidos de glucagón de la presente invención tienen un grupo amida en lugar del grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido nativo. La actividad relativa del análogo de glucagón en los receptores de glucagón y GLP-1 respectivos se puede ajustar mediante otras modificaciones al péptido de glucagón para producir análogos que demuestran del 40% al 500% o más de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y del 20% al 200% o más de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1, por ejemplo un aumento de 50 veces, 100 veces o más en relación con la actividad normal de glucagón en el receptor de GLP-1.

En otra realización se proporcionan análogos de glucagón que presentan actividad de coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 en donde se forma un puente intramolecular entre dos cadenas laterales de aminoácido para estabilizar la estructura tridimensional del extremo de carboxi del péptido. Más específicamente, las cadenas laterales de los pares de aminoácidos 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, o 24 y 28 están unidos uno a otro y por lo tanto estabilizan el alfa hélice de

glucgón. Las dos cadenas laterales se pueden unir una a otra a través de un enlace de hidrógeno, interacciones iónicas, tales como la formación de puentes de sal, o mediante enlaces covalentes. En algunas realizaciones, el tamaño del anillo o  
5 ligador es de 8 átomos, o de 7-9 átomos.

Ejemplos de pares de aminoácidos que son capaces de formar enlaces covalentes para formar un puente de unión de siete átomos incluyen Orn-Glu (anillo de lactama), Lys-Asp (lactama)  
10 o Homoser-Homoglu (lactona). Ejemplos de pares de aminoácidos que pueden formar un ligador de ocho átomos incluyen Lys-Glu (lactama); Homolys-Asp (lactama); Orn-Homglu (lactama); 4-aminoPhe-Asp (lactama); o Tyr-Asp (lactona). Ejemplos de pares de aminoácidos que pueden formar un ligador de nueve átomos  
15 incluyen Homolys-Glu (lactama), Lys-Homoglu (lactama), 4-aminoPhe-Glu (lactama), o Tyr-Glu (lactona). Cualquiera de las cadenas laterales o estos aminoácidos además se puede sustituir con otros grupos químicos, siempre que la estructura tridimensional del alfa-hélice no se rompa. Un experto en el  
20 arte puede prever pares alternativos o análogos de aminoácidos alternativos, que incluyen derivados modificados químicamente, que crearían una estructura estabilizadora de un tamaño similar y con el efecto deseado. Por ejemplo, un puente de homocisteína-disulfuro de homocisteína tiene 6 átomos de largo  
25 y se puede modificar además para proporcionar el efecto

deseado. Aún sin ligadura covalente, los pares de aminoácidos descritos anteriormente o análogos similares que un experto en el arte puede prever también pueden proporcionar estabilidad agregada al alfa-hélice a través de enlaces covalentes, por ejemplo, a través de la formación de puentes de sal o interacciones de enlace de hidrógeno.

Otros ejemplos de realizaciones incluyen los siguientes pares, optativamente con un puente de lactama: Glu en la posición 12 con Lys en la posición 16; Lys nativa en la posición 12 con Glu en la posición 16; Glu en la posición 16 con Lys en la posición 20; Lys en la posición 16 con Glu en la posición 20; Glu en la posición 20 con Lys en la posición 24; Lys en la posición 20 con Glu en la posición 24; Glu en la posición 24 con Lys en la posición 28; Lys en la posición 24 con Glu en la posición 28.

De acuerdo con una realización se proporciona un análogo de glucagón que presenta actividad de coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 en donde el análogo comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 11, 47, 48 y 49. En una realización las cadenas laterales están unidas en forma covalente unas a otras y en una realización los dos aminoácidos están unidos uno a otro para formar un anillo de lactama. El tamaño del anillo de lactama puede

variar según la longitud de las cadenas laterales de aminoácido, y en una realización la lactama se forma uniendo las cadenas laterales de un aminoácido de lisina a una cadena lateral de ácido glutámico.

5

El orden del enlace de amida en el anillo de lactama se puede invertir (por ejemplo, se puede formar un anillo de lactama entre las cadenas laterales de un Lys12 y un Glu16 o alternativamente entre un Glu 12 y un Lys16). De acuerdo con  
10 una realización, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID N° 45 en donde por lo menos se forma un anillo de lactama entre las cadenas laterales de un par de aminoácidos seleccionado del grupo formado por los pares de aminoácidos 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24 o 24 y 28. En una realización, se  
15 proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 en donde el coagonista comprende un análogo de péptido de glucagón de SEQ ID N° 20 en donde el péptido comprende un puente de lactama intramolecular formado entre las posiciones de aminoácido 12 y 16 o entre las posiciones de aminoácido 16  
20 y 20. En una realización, se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 que comprende la secuencia de SEQ ID N° 20, en donde se forma un puente de lactama intramolecular entre las posiciones de aminoácido 12 y 16, entre las posiciones de aminoácido 16 y 20 o entre las  
25 posiciones de aminoácido 20 y 24 y la posición de aminoácido

29 es glicina, en donde la secuencia de SEQ ID N° 29 está unida al aminoácido de extremo de C de SEQ ID N° 20. En otra realización el aminoácido en la posición 28 es ácido aspártico.

5

La solubilidad del péptido de glucagón de SEQ ID N° 20 se puede mejorar además, por ejemplo, introduciendo uno, dos, tres o más aminoácido(s) con una carga a la parte del extremo de C del péptido de glucagón de SEQ ID N°. 20, preferentemente en una posición al extremo de C a la posición 27. dicho aminoácido con una carga se puede introducir sustituyendo un aminoácido nativo con un aminoácido con una carga, por ejemplo en la posición 28 o 29, o alternativamente agregando un aminoácido con una carga, por ejemplo, después de la posición 10 27, 28, o 29. En ejemplos de realizaciones, uno, dos, tres o la totalidad de los aminoácidos con una carga tienen una carga negativa. Alternativamente, la solubilidad también se puede aumentar mediante la unión covalente de grupos hidrófilos, tales como polietilenglicol, al péptido.

20

De acuerdo con una realización, se proporciona un análogo de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID N° 55, en donde dicho análogo difiere de SEQ ID N° 55 en 1 a 3 aminoácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 25 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28 y 29, en donde dicho péptido de



glucagón presenta por lo menos un 20% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.

De acuerdo con una realización, se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 que comprende la secuencia:

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID N° 33) en donde Xaa en la posición 15 se selecciona del grupo de aminoácidos que comprenden Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 se selecciona del grupo de aminoácidos formado por Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico, Xaa en la posición 20 es Gln o Lys, Xaa en la posición 24 es Gln o Glu, Xaa en la posición 28 es Asn, Lys o un aminoácido ácido, Xaa en la posición 29 es Thr, Gly o un aminoácido ácido y R es COOH o CONH<sub>2</sub>, con la condición de que cuando la posición 16 es serina, la posición 20 sea Lys, o alternativamente cuando la posición 16 es serina la posición 24 sea Glu y la posición 20 o la posición 28 sea Lys. En una realización el coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID N° 33 en donde el aminoácido en la posición 28 es ácido aspártico y el aminoácido en la posición 29 es ácido glutámico. En otra realización el aminoácido en la posición 28 es la asparagina nativa, el aminoácido en la posición 29 es glicina y la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 29 o SEQ ID N° 65 está

unida en forma covalente al extremo de carboxi de SEQ ID N° 33.

En una realización se proporciona un coagonista que comprende la secuencia de SEQ ID N° 33 en donde se agrega un aminoácido ácido adicional al extremo de carboxi del péptido. En otra realización, el aminoácido de extremo de carboxi del análogo de glucagón tiene una amida en lugar del grupo ácido carboxílico del aminoácido natural. En una realización el análogo de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43 y SEQ ID N° 44.

De acuerdo con una realización, se proporciona un análogo de péptido de glucagón de SEQ ID N° 33, en donde dicho análogo difiere de SEQ ID N° 33 en 1 a 3 aminoácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, y 27, con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 16 es serina, en la posición 20 es lisina, o se forma un puente de lactama entre el aminoácido en la posición 24 y el aminoácido en la posición 20 o en la posición 28. De acuerdo con una realización el análogo difiere de SEQ ID N° 33 en 1 a 3 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 21 y 27. En una realización, el análogo de péptido de glucagón de SEQ ID N° 33 difiere de esa secuencia en 1 a 2

aminoácidos, o en una realización en un solo aminoácido, seleccionado de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21 y 27, con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 16 es serina, la posición 20 es  
 5 lisina, o se forma un puente de lactama entre el aminoácido en la posición 24 y el aminoácido en la posición 20 o en la posición 28.

De acuerdo con otra realización se proporciona un agonista de  
 10 receptor de GLP-1 relativamente selectivo que comprende la secuencia: NH<sub>2</sub>-His-Ser-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID N° 53) en donde Xaa en la posición 3 se selecciona del grupo formado por aminoácidos formados por Glu, Orn o Nle, Xaa en la posición 15 se selecciona del grupo de  
 15 aminoácidos formado por Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homnoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 se selecciona del grupo de aminoácidos formado por Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en la posición  
 20 20 es Gln o Lys, Xaa en la posición 24 es Gln o Glu, Xaa en la posición 28 es Asn, Lys o un aminoácido ácido, Xaa en la posición 29 es Thr, Gly o un aminoácido ácido, y R es COOH o CONH<sub>2</sub>, SEQ ID N° 26 o SEQ ID N° 29, con la condición de que cuando la posición 16 es serina, la posición 20 es Lys, o  
 25 alternativamente cuando la posición 16 es serina la posición

24 es Glu y la posición 20 o la posición 28 es Lys. En una realización el aminoácido en la posición 3 es ácido glutámico. En una realización el aminoácido sustituido en la posición 28 y/o 29 es ácido aspártico o ácido glutámico. En una  
 5 realización el péptido de glucagón, que incluye un péptido de coagonista, comprende la secuencia de SEQ ID N° 33 que además comprende un aminoácido ácido adicional agregado al extremo de carboxi del péptido. En otra realización el aminoácido del extremo de carboxi del análogo de glucagón tiene una amida en  
 10 lugar del grupo ácido carboxílico del aminoácido natural.

De acuerdo con una realización se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 que comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo formado por:

15 NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-R (SEQ ID N° 34), en donde Xaa en la posición 15 se selecciona del grupo formado por Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 se  
 20 selecciona del grupo formado por aminoácidos formados por Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en la posición 20 es Gln o Lys, Xaa en la posición 24 es Gln o Glu y Xaa en la posición 28 es Asn, Asp o Lys, R es COOH o CONH<sub>2</sub>, Xaa en la posición 29 es Thr o Gly, y R es COOH, CONH<sub>2</sub>, SEQ ID N°  
 25 26 o SEQ ID N° 29 con la condición de que cuando la posición

16 es serina, la posición 20 es Lys, o alternativamente cuando la posición 16 es serina la posición 24 es Glu y la posición 20 o la posición 28 es Lys. En una realización, R es CONH<sub>2</sub>, Xaa en la posición 15 es Asp, Xaa en la posición 16 se selecciona del grupo de aminoácidos formado por Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en las posiciones 20 y 24 son cada uno Glu, Xaa en la posición 28 es Asn o Arg y Xaa en la posición 29 es Thr. En una realización, Xaa en las posiciones 15 y 16 son cada uno Glu, Xaa en las posiciones 20 y 24 son cada uno Gln, Xaa en la posición 28 es Asn o Asp, Xaa en la posición 29 es Thr y R es CONH<sub>2</sub>.

Se ha informado que ciertas posiciones del péptido de glucagón nativo se pueden modificar mientras que retiene por lo menos algunos de la actividad del péptido padre. Por consiguiente, los solicitantes anticipan que uno o más de los aminoácidos ubicados en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29 del péptido de SEQ ID N° 11 se puede sustituir con un aminoácido diferente de aquel presente en el péptido de glucagón nativo, y aún retiene la actividad del receptor de glucagón. En una realización el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido nativo se carga a leucina o norleucina para prevenir la degradación oxidativa del péptido. En otra realización el aminoácido en la posición 20 se sustituye con Lys, Arg, Orn o Citruleno y/o la

posición 21 se sustituye con Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteico.

En una realización se proporciona un análogo de glucagón de  
5 SEQ ID N° 20 en donde 1 a 6 aminoácidos, seleccionados de 1,  
2, 5, 7, 10, 11, 14, 17, 18, 19, 21, 27, 28 o 29 del análogo  
difiere del aminoácido correspondiente de SEQ ID N° 1, con la  
condición de que cuando el aminoácido en la posición 16 es  
serina, la posición 20 es Lys, o alternativamente cuando la  
10 posición 16 es serina la posición 24 es Glu y la posición 20 o  
la posición 28 es Lys. De acuerdo con otra realización se  
proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID N° 20 en donde de  
1 a 3 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7,  
10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 27, 28 o 29 del análogo  
15 difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID N° 1. En  
otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ  
ID N° 8, SEQ ID N° 9 o SEQ ID N° 11 en donde 1 a 2 aminoácidos  
seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14,  
17, 18, 19, 20 o 21 del análogo difieren del aminoácido  
20 correspondiente de SEQ ID N° 1 y en otra realización de uno a  
dos aminoácidos diferentes representan sustituciones de  
aminoácidos conservadoras en relación con el aminoácido  
presente en la secuencia de glucagón nativo (SEQ ID N° 1). En  
una realización se proporciona un péptido de glucagón de SEQ  
25 ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 o SEQ ID N° 15, en donde

el péptido de glucagón también comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácido en las posiciones seleccionadas de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 27, o 29. En una realización las sustituciones en las  
5 posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 27 o 29 son sustituciones de aminoácidos conservadoras.

De acuerdo con una realización se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 que comprende una variante de la  
10 secuencia de SEQ ID N° 33, en donde de 1 a 10 aminoácidos seleccionados de las posiciones 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 27, 28 y 29 respectivamente, de la variante difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID N° 1. De acuerdo con una realización se proporciona una variante de la secuencia de SEQ  
15 ID N° 33 en donde la variante difiere de SEQ ID N° 33 en una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas del grupo formado por Gln17, Ala18, Glu21, Ile23, Ala24, Val27, y Gly29. De acuerdo con una realización se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 que comprende variantes de la  
20 secuencia de SEQ ID N° 33, n donde de 1 a 2 aminoácidos seleccionados de la posiciones 17-26 de la variante difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID N° 1. De acuerdo con una realización se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID N° 33 en donde la variante difiere de SEQ ID N° 33 en  
25 una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo formado

por Gln17, Ala18, Glu21, Ile23 y Ala24. De acuerdo con una realización se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID N° 33 en donde la variante difiere de SEQ ID N° 33 en una sustitución en la posición 18 en donde el aminoácido sustituido se selecciona del grupo formado por Ala, Ser, Thr, Pro y Gly. De acuerdo con una realización se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID N° 33 en donde la variante difiere de SEQ ID N° 33 en una sustitución de aminoácido de Ala en la posición 18. Dichas variaciones están comprendidas por SEQ ID N° 55. En otra realización se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 que comprende variantes de la secuencia de SEQ ID N° 33, en donde de 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-22 de la variante difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID N° 1 y en otra realización se proporciona una variante de SEQ ID N° 33 en donde la variante difiere de SEQ ID N° 33 en 1 o 2 sustituciones de aminoácido en las posiciones 20 y 21. De acuerdo con una realización se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 que comprende la secuencia NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID N° 51), en donde Xaa en la posición 15 es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 es Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico, Xaa en la posición 20 es Gln, Lys, Arg, Orn o



citrulina, Xaa en la posición 21 es Asp, Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteico, Xaa en la posición 24 es Gln o Glu, Xaa en la posición 28 es Asn, Lys o un aminoácido ácido, Xaa en la posición 29 es Thr o un aminoácido ácido y R es COOH o CONH<sub>2</sub>. En una realización R es CONH<sub>2</sub>. De acuerdo con una realización se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 que comprende una variante de SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48 o SEQ ID N° 49, en donde la variante difiere de dicha secuencia en una sustitución de aminoácido en la posición 20. En una realización la sustitución de aminoácido se selecciona del grupo formado por Lys, Arg, Orn o citrulina por la posición 20.

15 En una realización se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido de análogo de SEQ ID N° 34 en donde el análogo difiere de SEQ ID N° 34 al tener un aminoácido diferente de serina en la posición 2. En una realización el residuo de serina se sustituye con ácido aminoisobutírico o

20 alanina, y en una realización el residuo de serina se sustituye con ácido aminoisobutírico. Dichas modificaciones suprimen la rotura de dipeptidil peptidasa IV mientras que retiene la potencia implícita del compuesto padre (por ejemplo por lo menos 75, 80, 85, 90, 95% o más de la potencia

25 del compuesto padre). En una realización se aumenta la

solubilidad del análogo, por ejemplo, introduciendo uno, dos, tres o más aminoácido(s) con una carga a la parte del extremo de C de glucagón nativo, preferentemente en una posición del extremo de C a la posición 27. En ejemplos de realizaciones, uno, dos, tres o la totalidad de los aminoácidos con una carga tienen una carga negativa. En otra realización el análogo además comprende un aminoácido ácido sustituido por el aminoácido nativo en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido agregado al extremo de carboxi del péptido de SEQ ID N° 34.

10

En una realización los análogos de glucagón revelados en la presente se modifican además en la posición 1 o 2 para reducir la susceptibilidad de la rotura por dipeptidil peptidasa IV. En una realización se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 o SEQ ID N° 15 en donde el análogo difiere de la molécula madre en una sustitución en la posición 2 y presenta susceptibilidad reducida (es decir, resistencia) a la rotura por dipeptidil peptidasa IV. Más específicamente, en una realización la posición 2 del péptido de glucagón se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo formado por d-serina, alanina, valina, ácido amino n-butírico, glicina, N-metil serina y ácido aminoisobutírico. En una realización la posición 2 del análogo de péptido se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo formado por d-serina,

25

alanina, glicina, N-metil serina y ácido aminoisobutírico. En otra realización la posición 2 del análogo de péptido se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo formado por d-serina, glicina, N-metil serina y ácido aminoisobutírico. En 5 una realización el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 21 o SEQ ID N° 22.

En una realización, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID 10 N° 14 o SEQ ID N° 15 en donde el análogo difiere de la molécula madre en una sustitución en la posición 1 y presenta susceptibilidad reducida (es decir resistencia) a la rotura por dipeptidil peptidasa IV. Más específicamente, la posición 1 del análogo de péptido se sustituye con un aminoácido 15 seleccionado del grupo formado por d-histidina, ácido alfa, alfa-dimetil imidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. En otra realización se proporciona un agonista de glucagón que 20 comprende un análogo de péptido de SEQ ID N° 34 en donde el análogo difiere de SEQ ID 34 porque tiene un aminoácido diferente de histidina en la posición 1. En una realización se aumenta la solubilidad del análogo, por ejemplo, introduciendo uno, dos, tres o más aminoácido(s) con una carga a la parte 25 del extremo de C del glucagón nativo, preferentemente en una

posición de extremo de C a la posición 27. En ejemplos de realizaciones, uno, dos, tres o la totalidad de los aminoácidos con una carga tienen una carga negativa. En otra realización el análogo además comprende un aminoácido ácido  
5 sustituido por el aminoácido nativo en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido agregado al extremo de carboxi del péptido de SEQ ID N° 34. En una realización el aminoácido ácido es ácido aspártico o ácido glutámico.

10 En una realización el coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 comprende una secuencia de SEQ ID N° 20 que además comprende una prolongación del extremo de carboxi adicional de un aminoácido o un péptido seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, y SEQ ID N° 28. En la realización en  
15 la cual se agrega un solo aminoácido al extremo de carboxi de SEQ ID N° 20, el aminoácido normalmente se selecciona de uno de los 20 aminoácidos comunes y en una realización el aminoácido de extremo de carboxi adicional tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido nativo. En  
20 una realización el aminoácido adicional se selecciona del grupo formado por ácido glutámico, ácido aspártico y glicina.

En una realización alternativa se proporciona un coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 en donde el péptido comprende por  
25 lo menos un anillo de lactama formado entre la cadena lateral

de un residuo de ácido glutámico y un residuo de lisina, en donde el residuo de ácido glutámico y un residuo de lisina están separados por tres aminoácidos. En una realización el aminoácido de extremo de carboxi del péptido de glucagón que  
 5 transporta lactama tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido nativo. Más específicamente, en una realización se proporciona un coagonista de glucagón y GLP-1 que comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo formado por:

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 66)**

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 67)**

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 68)**

10

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Xaa-R (SEQ ID NO: 69)**

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 16)**

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 17)**

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 18)**

en donde Xaa en la posición 28 = Asp, o Asn, Xaa en la posición 29 es Thr o Gly, R se selecciona del grupo formado por COOH, CONH<sub>2</sub>, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, SEQ  
 15 ID N° 26, SEQ ID N° 27 y SEQ ID N° 28, y se forma un puente

de lactama entre Lys en la posición 12 y Glu en la posición 16 para SEQ ID N° 56, entre Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20 para SEQ ID N° 67, entre Lys en la posición 20 y Glu en la posición 24 para SEQ ID N° 68, entre Glu en la posición 24 y Lys en la posición 28 para SEQ ID N° 69, entre Lys en la posición 12 y Glu en la posición 16 y entre Lys en la posición 20 y Glu en la posición 24 para SEQ ID N° 16, entre Lys en la posición 12 y Glu en la posición 16 y entre Glu en la posición 24 y Lys en la posición 28 para SEQ ID N° 17 y entre Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20 y entre Glu en la posición 24 y Lys en la posición 28 para SEQ ID N° 18. En una realización R se selecciona del grupo formado por COOH, CONH<sub>2</sub>, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, el aminoácido en la posición 28 es Asn, y el aminoácido en la posición 29 es treonina. En una realización R es CONH<sub>2</sub>, el aminoácido en la posición 28 es Asn y el aminoácido en la posición 29 es treonina. En otra realización R se selecciona del grupo formado por SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 29, y SEQ ID N° 65 y el aminoácido en la posición 29 es glicina.

20

En otra realización el coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 se selecciona del grupo formado por SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 18, en donde el péptido además comprende una prolongación del extremo de carboxi adicional de

25

un aminoácido o un péptido seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, y SEQ ID N° 28. En una realización la prolongación del extremo comprende la secuencia de SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 29 o SEQ ID N° 65 y el péptido de glucagón  
5 comprende la secuencia de SEQ ID N° 55. En una realización el coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID N° 33 en donde el aminoácido en la posición 16 es ácido glutámico, el aminoácido en la posición 20 es lisina, el aminoácido en la posición 28 es asparagina y  
10 la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 26 o SEQ ID N° 29 está unido al extremo de carboxi de SE ID N° 33.

En la realización en donde se agrega un solo aminoácido al extremo de carboxi de SEQ ID N° 20, el aminoácido se  
15 selecciona normalmente de uno de los 20 aminoácidos comunes y en una realización el aminoácido tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido nativo. En una realización el aminoácido adicional se selecciona del grupo formado por ácido glutámico y ácido aspártico y glicina. En la  
20 realización en donde el análogo de agonista de glucagón además comprende una prolongación de extremo de carboxi, el aminoácido de extremo de carboxi de la prolongación, en una realización, termina en un grupo amida o un grupo éster antes que un ácido carboxílico.

Otra realización del coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia: NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Xaa-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID N° 19), en donde Xaa en la posición 30 representa cualquier aminoácido. En una realización Xaa se selecciona de uno los 20 aminoácidos comunes, y en una realización el aminoácido es ácido glutámico, ácido aspártico o glicina. La solubilidad de este péptido se puede mejorar uniendo en forma covalente una cadena de PEG a la cadena lateral de aminoácido en la posición 17, 21, 24 o 30 de SEQ ID N° 19. En otra realización el péptido comprende una prolongación del extremo de carboxi adicional de un péptido seleccionado del grupo formado por de SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27 y SEQ ID N° 28. De acuerdo con una realización el coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31 y SEQ ID N° 32.

Otras modificaciones específicas internas a la secuencia de glucagón de SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 y SEQ ID N° 64 se puede hacer que dé un grupo de agonistas de glucagón que posee niveles variables de agonistas de GLP-1. Por consiguiente, se pueden preparar y caracterizar los péptidos que poseen una potencia in vitro virtualmente idéntica en cada receptor. En forma similar, se han



identificado y caracterizado péptidos con una potencia  
aumentada selectivamente 10 veces en cada uno de los  
receptores. Como se indicó anteriormente la sustitución del  
residuo de serina en la posición 16 con ácido glutámico  
5 aumenta la potencia de glucagón nativo en los receptores de  
Glucagón y GLP-1, pero mantiene aproximadamente una  
selectividad de diez veces para el receptor de glucagón.  
Además mediante la sustitución de la glutamina nativa en la  
posición 3 con ácido glutámico (SEQ ID N° 22) genera un  
10 análogo de glucagón que presenta aproximadamente una  
selectividad de diez veces para el receptor de GLP-1.

La solubilidad de los péptidos de coagonistas de glucagón/GLP-  
1 puede aumentarse además en soluciones acuosas a pH  
15 fisiológica, mientras retiene la actividad biológica alta en  
relación con el glucagón nativo mediante la introducción de  
grupos hidrófilos en las posiciones 16, 17, 21 y 24 del  
péptido, o mediante el agregado de un solo aminoácido  
modificado (es decir, un aminoácido modificado para  
20 comprender un grupo hidrófilo) en el extremo de carboxidel  
péptido de coagonista de glucagón/GLP-1. De acuerdo con una  
realización el grupo hidrófilo comprende una cadena de  
polietileno (PEG). Más específicamente, en una realización el  
péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 10,  
25 SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 13, SEQ ID

N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 o SEQ ID N° 18 en donde una cadena de PEG está unido en forma covalente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24, 29 o el aminoácido del extremo de C del péptido de glucagón, con la condición de que cuando el péptido comprende SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12 o SEQ ID N° 13 la cadena de polietilenglicol se une en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 17, 21, o 24, cuando el péptido comprende SEQ ID N° 14 o SEQ ID N° 15 la cadena de polietilenglicol se une en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 16, 17 o 21 y cuando el péptido comprende SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 o SEQ ID N° 18 la cadena de polietilenglicol está unido en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 17 o 21.

15

En una realización el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12 o SEQ ID N° 13, en donde una cadena de PEG se une en forma covalente a la cadena lateral de un aminoácido en las posiciones 17, 21, 24 o el aminoácido del extremo de C del péptido de glucagón, y el aminoácido del extremo de carboxi del péptido tiene un grupo amida del grupo ácido carboxílico del aminoácido nativo. En una realización del péptido de coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID

25

N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19, en donde una cadena de PEG se une en forma covalente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17, 21 o 24 de SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, y SEQ ID N° 19, o en la posición 5 16, 17 o 21 de SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15 o en la posición 17 o 21 de SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 18 del péptido de glucagón. En otra realización el péptido de coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID N° 11 o SEQ ID N° 19, en donde una cadena de PEG se une en forma 10 covalente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17, 21 o 24 o el aminoácido de extremo de C del péptido de glucagón.

De acuerdo con una realización, y sujeta a las limitaciones de 15 condiciones descritas en los párrafos precedentes, el péptido de coagonista de glucagón se modifica para contener una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 16, 17, 21, 24 o 29 o el aminoácido del extremo de C, en donde el aminoácido nativo se sustituye con un aminoácido que tiene una cadena 20 lateral adecuada para el entrecruzamiento con grupos hidrófilos, que incluyen por ejemplo PEG. El péptido nativo se puede sustituir con un aminoácido natural o un aminoácido sintético (no natural). Los aminoácidos sintéticos o naturales se refieren a aminoácidos que no son naturales in vivo pero 25 que, de todos modos, se pueden incorporar en las estructuras

de los péptidos descritos en la presente. Alternativamente, el aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para el entrecruzamiento con grupos hidrófilos, que incluyen por ejemplo PEG se puede agregar al extremo de carboxi de cualquiera de los análogos de glucagón revelados en la presente. De acuerdo con una realización se hace una sustitución de aminoácido en el péptido de coagonista de receptor de glucagón/GLP-1 en una posición seleccionada del grupo formado por 16, 17, 21, 24 o 29 que reemplaza el aminoácido nativo con un aminoácido seleccionado del grupo formado por lisina, cisteína, ornitina, homocisteína y acetil fenilalanina, en donde la sustitución de aminoácido además comprende una cadena de PEG unida en forma covalente a la cadena lateral del aminoácido. En una realización un péptido de glucagón seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18 y SEQ ID N° 19 también se modifica para comprender una cadena de PEG se une en forma covalente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17 o 21 del péptido de glucagón. En una realización el coagonista de receptor de glucagón pegilado/PEG-1 además comprende la secuencia de SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27 o SEQ ID N° 29.

En otra realización el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 55 o SEQ ID N° 56, que además comprende

una prolongación del extremo C de SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 29 o SEQ ID N° 65 unido al aminoácido del extremo de C de SEQ ID N° 55 o SEQ ID N° 56, y optativamente que también comprende una cadena de PEG unida en forma covalente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17, 18, 21, 24 o 29 o el aminoácido del extremo de C del péptido. En otra realización el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 55 o SEQ ID N° 56, en donde una cadena de PEG está unida en forma covalente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 21 o 24 del péptido de glucagón y el péptido además comprende una prolongación del extremo de C de SEQ ID N° 26 o SEQ ID N° 29.

En otra realización el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 55, o SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34, en donde un aminoácido adicional se agrega al extremo de carboxi de SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34 y una cadena de PEG se une en forma covalente a la cadena lateral del aminoácido agregado. En otra realización, el análogo de glucagón pegilado además comprende una prolongación del extremo de C de SEQ ID N° 26 o SEQ ID N° 29 unido al aminoácido del extremo de C de SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 34. En otra realización el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 19, en donde una cadena de PEG se une en forma covalente a la cadena lateral del aminoácido en la posición 30 del péptido de glucagón y el

péptido además comprende una prolongación del extremo de C de SEQ ID N° 26 o SEQ ID N° 29 unido al aminoácido del extremo de C de SEQ ID N° 19.

- 5 La cadena de polietilenglicol puede estar en la forma de una cadena recta o puede ser ramificada. De acuerdo con una realización la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado de la gama de 500 a 10.000 Dalton. En una realización la cadena de polietilenglicol tiene
- 10 un peso molecular promedio seleccionado de la gama de 1.000 a 5.000 Dalton. En una realización alternativa la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado de la gama de 10.000 a 20.000 Dalton. De acuerdo con una realización el péptido de glucagón pegilado comprende dos o
- 15 más cadenas de polietileno unida en forma covalente al péptido de glucagón en donde el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de 1.000 a 5.000 Dalton. En una realización el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido formado por SEQ ID N° 5 o un análogo de agonista de glucagón de SEQ ID N°
- 20 5, en donde una cadena de PEG está unida en forma covalente al residuo de aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en donde el peso molecular combinado de las dos cadenas de PEG es de 1.000 a 5.000 Dalton.

Como se describe detalladamente en los Ejemplos, los agonistas de glucagón de la presente invención tienen estabilidad biofísica y solubilidad acuosa aumentada mientras que demuestran bioactividad aumentada en relación con el péptido nativo. Por consiguiente, se cree que los agonistas de glucagón de la presente invención son adecuados para cualquier uso que se ha descrito previamente para el péptido de glucagón nativo. Por consiguiente, los péptidos de glucagón nativo descritos en la presente se pueden usar para tratar la hipoglucemia o aumentar el nivel de glucosa en sangre, inducir la parálisis temporaria de los intestinos para usos radiológicos, o tratar otras enfermedades metabólicas que derivan de los bajos niveles de glucagón en sangre. También se espera que los péptidos de glucagón descritos en la presente se usen para reducir o mantener el peso corporal, o tratar la hiperglucemia, o reducir el nivel de glucosa en sangre, o normalizar el nivel de glucosa en sangre.

Los péptidos de glucagón de la invención se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes antidiabéticos o contra la obesidad. Los agentes antidiabéticos conocidos en el arte o bajo investigación incluyen insulina, sulfonilureas, tales como tolbutamida (Orinasa), acetohexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinasa), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronasa, Glinasa),

glimepirida (Amarilo), o gliclazida (Diamicron); meglitinidas, tales como repaglinida (Prnadin) o nateglinida (Starlix); biguanidas tales como metformina (Glucofago) o fenformina; tiazolidinadionas tales como rosiglitazona (Avandia),  
5 pioglitazona (Actos), o troglitazona (Rezulin), u otros inhibidores de PPAR $\gamma$ ; inhibidores de alfa glucósido que inhiben la digestión de carbohidratos, tales como miglitol (Glyset), acarbosa (Precose/Glucobay); exenatida (Byetta) o pramlindida; inhibidores de Dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) tales como  
10 vildagliptina o sitagliptina; inhibidores de SGLT (transportador de glucosa que depende sodio 1); o inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa).

Los agentes contra la obesidad conocidos en el arte o bajo  
15 investigación incluyen supresores del apetito, que incluyen estimulantes de tipo de fenetilamina, fentermina (optativamente con fenfluramina o dexfenfluramina), dietilpropion (Tenuate®), fendimetrazina (Prelu-2®), benzfetamina (Didrex®), sibutramina (Meridia®, Reductil®);  
20 clorhidrato de fluoxetina (prozac); Qnexa (topiramato y fentermina), Excalia (bupropion y zonisamida) o Contrave (bupropion y naltrexona); o inhibidores de lipasa, similares a xenical (Orlistat) o Cetilistat (también denominado ATL-962), o GT 389-255.



Un aspecto de la presente invención se refiere a una solución acuosa preformulada del agonista de glucagón que se revela actualmente para su uso en el tratamiento de la hipoglucemia. La estabilidad y solubilidad mejoradas de las composiciones de agonistas descritas en la presente permiten la preparación de soluciones acuosas preformuladas de glucagón para la administración rápida y el tratamiento de la hipoglucemia. En una realización se proporciona una solución que comprende un agonista de glucagón pegilado para la administración a un paciente que sufre hipoglucemia, en donde el peso molecular total de las cadenas de PEG unidas al agonista de glucagón pegilado es entre 500 y 5.000 Dalton. En una realización el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25 y los análogos de agonista de glucagón de SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25, o un derivado de lactama pegilado que comprende la secuencia de SEQ ID N° 20, en donde la cadena lateral de un residuo de aminoácido de dicho péptido de glucagón está unida en forma covalente a la cadena de polietilenglicol.

El método para tratar la hipoglucemia de acuerdo con la presente invención comprende los pasos de administrar los agonistas de glucagón revelados actualmente a un paciente que usa cualquier vía de administración normal, que incluye la vía

parenteral, tal como intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, oral, nasal o por inhalación. En una realización la composición se administra por vía subcutánea o intramuscular. En una  
5 realización, la composición se administra por vía parenteral y la composición de glucagón se preempaqueta en una jeringa.

Sorpresivamente los solicitantes han descubierto que se pueden preparar péptidos de glucagón pegilados que retienen la  
10 bioactividad y especificidad del péptido padre. Sin embargo, el aumento de la longitud de la cadena de PEG, o la unión de varias cadenas de PEG al péptido, de manera tal que el peso molecular total del PEG unido es superior a 5.000 Dalton, empieza a retardar el tiempo de acción del glucagón  
15 modificado. De acuerdo con una realización, se proporciona un péptido de glucagón de SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25, o un análogo de agonista de glucagón de él, o un derivado de lactama pegilada de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID N° 20, en donde el péptido comprende una o más cadenas  
20 de polietilenglicol, en donde el peso molecular total del PEG unido es superior a 5.000 Dalton, y en una realización es superior a 10.000 Dalton, pero inferior a 40.000 Dalton. Dichos péptidos de glucagón modificado tienen un tiempo de actividad retardado o prolongado pero sin pérdida de la  
25 bioactividad. Por consiguiente, dichos compuestos se pueden

administrar para prolongar el efecto del péptido de glucagón administrado.

Se pueden administrar péptidos de glucagón que se han  
5 modificado para unirse en forma covalente a una cadena de PEG  
que tiene un peso molecular superior a 10.000 Dalton en  
conjunto con insulina para intensificar las acciones de la  
insulina y contribuir a mantener niveles estables de glucosa  
en sangre en los diabéticos. Los péptidos de glucagón  
10 modificados de la presente invención se pueden administrar  
conjuntamente con la insulina como una sola composición,  
administrar simultáneamente como soluciones por separado, o  
alternativamente, la insulina y el péptido de glucagón  
modificado se puede administrar a un horario diferente en  
15 relación uno con otro. En una realización la composición que  
comprende insulina y la composición que comprende el péptido  
de glucagón modificado se administran dentro de 12 horas uno  
de otro. La relación precisa del péptido de glucagón ,  
modificado en relación con la insulina administrada depende en  
20 parte de la determinación de los niveles de glucagón del  
paciente, y se puede determinar a través de la experimentación  
de rutina.

De acuerdo con una realización se proporciona una composición  
25 que comprende insulina y un péptido de glucagón modificado

seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 y análogos de agonista de glucagón de él, en donde el péptido de glucagón modificado además comprende una cadena de polietilenglicol unida en forma covalente a una cadena lateral de aminoácido en la posición 17, 21, 24 o 21 y 24. En una realización la composición es una solución acuosa que comprende insulina y el análogo de glucagón. En realizaciones donde el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 24 o SEQ ID N° 25 la cadena de PEG está unida en forma covalente en la posición 21 o 24 del péptido de glucagón. En una realización la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de 10.000 a 40.000.

De acuerdo con una realización los péptidos de glucagón modificados que se revelan en la presente se usan para inducir la parálisis temporaria del tracto intestinal. Este método tiene utilidad con propósitos radiológicos y comprende el paso de administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido de glucagón pegilado, un péptido de glucagón que comprende una prolongación del extremo de C o un dímero de dichos péptidos. En una realización el péptido de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID

N° 14 y SEQ ID N° 15. En una realización el péptido de glucagón además comprende una cadena de PEG, de 1.000 a 40.000 Dalton, está unida en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 31 o 25. En una realización el  
5 péptido de glucagón se selecciona del grupo formado por SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15. En una realización la cadena de PEG tiene un peso molecular de 500 a 5.000 Dalton.

10 En otra realización la composición usada para inducir la parálisis temporaria del tracto intestinal comprende un primer péptido de glucagón modificado y un segundo péptido de glucagón modificado. El primer péptido modificado comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 23,  
15 SEQ ID N° 24, y SEQ ID N° 25, optativamente unido a una cadena de PEG de 500 a 5.000 Dalton, y el segundo péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N° 25, unido en forma covalente a una cadena de PEG de 10.000 a 40.000 Dalton. En esta realización  
20 la cadena de PEG de cada péptido está unida en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 17, 21 o 24 del péptido respectivo, e independiente uno de otro.

Oxintomodulina, se ha informado que una hormona digestiva  
25 natural hallada en el intestino delgado, produce pérdida de

peso cuando se administra a ratas o humanos (véase Diabetes 2005;54:2390-2395). Oxintomodulina es un péptido de 37 aminoácidos que contiene la secuencia de 29 aminoácidos de glucagón (es decir, SEQ ID N° 1) seguida por una prolongación del extremo de carboxi de 8 aminoácidos de SEQ ID N°27 (KRNRNNIA). Por consiguiente, los solicitantes creen que se puede retener la bioactividad de oxintomodulina (es decir, la supresión del apetito y la pérdida de peso/mantenimiento de peso inducido), mientras que el mejoramiento de la solubilidad y la estabilidad del compuesto y el mejoramiento de la farmacocinética, mediante la sustitución de la parte de péptido de glucagón de oxintomodulina con los péptidos de glucagón modificados revelados en la presente. Además los solicitantes también creen que una molécula de oxintomodulina truncada que comprende un péptido de glucagón de la invención, que tiene cuatro aminoácidos del extremo de oxintomodulina eliminados también es eficaz en la supresión del apetito y la inducción de la pérdida de peso/mantenimiento de peso.

Por consiguiente, la presente invención también comprende los péptidos de glucagón modificados de la presente invención que tienen una prolongación del extremo de carboxi de SEQ ID N° 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID N° 28. Estos compuestos se pueden administrar a individuos para inducir la pérdida de peso o para prevenir el aumento de peso. De acuerdo con una

realización un análogo de agonista de glucagón de SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 20, que también comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID N° 28 unido al aminoácido 29 del péptido de glucagón, se administra a  
5 individuos para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso. Más específicamente, el péptido de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SEQ ID N° 15, que además comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID  
10 N° 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID N° 28 unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón.

Exendina 4 es un péptido compuesto de 39 aminoácidos. Es un estimulante poderoso de un receptor denominado GLP-1. También  
15 se ha informado que el péptido suprime el apetito e induce la pérdida de peso. Los solicitantes han descubierto que la secuencia de Exendina 4 del extremo cuando se agrega en el extremo de carboxi de glucagón mejora la solubilidad y la estabilidad de glucagón sin comprometer la bioactividad de  
20 glucagón. En una realización los diez aminoácidos de extremo de Exendina 4 (es decir, la secuencia de SEQ ID N° 26 (GPSSGAPPPS)) se unen al extremo de carboxi de un péptido de glucagón de la presente invención. Estas proteínas de fusión se anticipan a tener actividad farmacológica para suprimir el  
25 apetito e inducir la pérdida de peso/mantenimiento de peso. De

acuerdo con una realización un análogo de agonista de glucagón de SEQ ID N° 33 o SEQ ID N° 20, que además comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 26 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID N° 29 unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón, se  
5 administra a individuos para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso. Más específicamente, el péptido de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18,  
10 SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 55 y SEQ ID N° 56 que además comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 28 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID N° 29 unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón. En una realización el análogo de péptido de glucagón administrado comprende la  
15 secuencia de SEQ ID N° 64.

La presente invención también comprende multímeros de los péptidos de glucagón modificados revelados en la presente. Dos o más de los péptidos de glucagón modificados se pueden unir  
20 juntos usando agentes y procedimientos de unión conocidos para los expertos en el arte. Por ejemplo, se pueden formar dímeros entre dos péptidos de glucagón modificados a través del uso de entrecruzamientos de tiol trifuncionales y entrecruzamientos de amina bifuncional, particularmente para los péptidos de  
25 glucagón que se han sustituido con residuos de cisteína,



lisina, ornitina, homocisteína o acetil fenilalanina (por ejemplo, SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4). El dímero puede ser un homodímero o alternativamente puede ser un heterodímero. En una realización el dímero comprende un homodímero de un péptido de fusión de glucagón en donde la parte de péptido de glucagón comprende SEQ ID N° 11 o SEQ ID N° 20 y una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID N° 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID N° 28 (KRNR) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón. En otra realización el dímero comprende un homodímero de un análogo de agonista de glucagón de SEQ ID N° 11, en donde el péptido de glucagón además comprende una cadena de polietilenglicol unida en forma covalente a la posición 21 o 24 del péptido de glucagón.

De acuerdo con una realización se proporciona un dímero que comprende un primer péptido de glucagón unido a un segundo péptido de glucagón a través de un ligador, en donde el primer péptido de glucagón comprende un péptido seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 y SEQ ID N° 11 y el segundo péptido de glucagón comprende SEQ ID N° 20. De acuerdo con otra realización se proporciona un dímero que comprende un primer péptido de glucagón unido a un segundo péptido de glucagón a través de un ligador, en donde dicho primer péptido de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3,

SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, y el segundo péptido de glucagón comprende SEQ ID N° 11 y sales farmacéuticamente aceptables de dichos polipéptidos de glucagón. De acuerdo con otra realización se  
5 proporciona un dímero que comprende un primer péptido de glucagón unido a un segundo péptido de glucagón a través de un ligador, en donde dicho primer péptido de glucagón se selecciona del grupo formado por SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID  
10 N° 17 y SEQ ID N° 18 y el segundo péptido de glucagón se selecciona independientemente del grupo formado por SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 18 y sales farmacéuticamente aceptables de dichos polipéptidos de  
15 glucagón. En una realización el primer péptido de glucagón se selecciona del grupo formado por SEQ ID N° 20 y el segundo péptido de glucagón se selecciona independientemente del grupo formado por SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9 y SEQ ID N° 11. En una realización el dímero se forma entre dos péptidos en donde  
20 cada péptido comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 11.

Los péptidos de glucagón modificados de la presente invención se pueden proporcionar de acuerdo con una realización como  
25 parte de un estuche. En una realización se proporciona un

estuche para administrar un agonista de glucagón a un paciente que lo necesita, en donde el estuche comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo formado por 1) un péptido de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, o SEQ ID N° 11); 2) un péptido de fusión de glucagón que comprende un análogo de agonista de glucagón de SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 20 o SEQ ID N° 55, y una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID N° 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID N° 28 (KRNR) unido al aminoácido 29 del péptido de glucagón; y 3) un péptido de glucagón pegilado de SEQ ID N° 11 o SEQ ID N° 51, que además comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID N° 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID N° 28 (KRNR) unido al aminoácido 29 del péptido de glucagón, en donde la cadena de PEG unida en forma covalente a la posición 17, 21 o 24 tiene un peso molecular de 500 a 40.000 Dalton. En una realización el estuche comprende un coagonista de glucagón/GLP-1 en donde el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 y SEQ ID N° 18.

En una realización se proporciona el estuche con un dispositivo para administrar la composición de glucagón a un paciente, por ejemplo una aguja de jeringa, un dispositivo de lapicera, un inyector de chorrou otro inyector sin agujas. El

estuche alternativamente o además puede incluir uno o más recipientes, por ejemplo, frascos, tubos, botellas, jeringas prellenadas de una sola cámara o de varias cámaras, cartuchos, bombas de infusión (externas o implantables), inyectores de chorro, dispositivos de lapiceras prellenadas y similares, que optativamente contienen el péptido de glucagón en una forma liofilizada o en una solución acuosa. Preferentemente, los estuches también incluyen instrucciones para su uso. De acuerdo con una realización el dispositivo del estuche es un dispositivo de distribución de aerosol, enm donde la composición está preempaquetada dentro del dispositivo de aerosol. En otra realización, el estuche comprende una jeringa y una aguja y en una realización la composición de glucagón estéril está preempaquetada dentro de la jeringa.

15

Los compuestos de esta invención se puede preparar mediante métodos sintéticos estándar, técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro método de preparación de péptidos y proteínas de fusión. Aunque ciertos aminoácidos no naturales no se pueden expresar mediante las técnicas de ADN recombinane estándar, las técnicas para su preparación son conocidas en el arte. Los compuestos de esta invención que comprenden partes que no son péptidos se pueden sintetizar mediante reacciones de química orgánica estándar, además de reacciones de química de péptidos estándar cuando son aplicables.

25

## Ejemplos

### Protocolo de Síntesis General

- 5 Se sintetizaron análogos de glucagón usando un solo acoplamiento "Fast Boc" activado por HBTU partiendo desde 0,2 mmol de Boc Thr(OBz)Pam resina sobre un sintetizador de péptidos Applied Biosystem 430 A modificado. Los aminoácidos de Boc y HBTU se obtuvieron de Midwest Biotech (Fishers, IN).
- 10 Los grupos protectores de cadena lateral usados fueron Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(pMeBzl), His(Bom), Lys(2Cl-Z), Ser(OBzl), Thr(OBzl), Tyr(2Br-Z) y Trp(CHO). El grupo protector de cadena lateral sobre His del extremo de N fue Boc.
- 15
- Cada resina de peptidilo terminada se trató con una solución de 20% de piperidina en dimetilformamida para eliminar el grupo formilo del triptofan. Se realizaron roturas de fluoruro de hidrógeno líquido en la presencia de p-cresol y sulfuro de
- 20 dimetilo. La rotura se realizó durante 1 hora en un baño de hielo usando un aparato de HF (Penninsula Labs). Después de la evaporación del HF, el residuo se suspendió en éter dietílico y los materiales sólidos se filtraron. Cada péptido se extrajo en 30-70 ml de ácido acético acuoso y una alícuota diluida se
- 25 analizó mediante HPLC [Beckman System Gold, 0,46x5cm Zorbax

C8, 1ml/minuto, 45°C, 214 nm, tampón A = 0,1% TFA, B=0,1% TFA/90% acetonitrilo, gradiente de 10% a 80% B durante 10 minutos].

- 5 Se realizó la purificación sobre una FPLC en una columna de 2,2 x 25 cm de Kromasil C18 mientras se monitoreaba la radiación ultravioleta a 214 nm y se recogían 5 fracciones por minuto. Las fracciones homogéneas se combinaron y se liofilizaron y dieron una pureza del producto de >95%. La masa
- 10 molecular correcta y la pureza se confirmaron usando un análisis de espectro de masa de MALDI.

#### Protocolo de Pegilación General: (Cys-maleimido)

- 15 Normalmente, el análogo de Cys de glucagón se disuelve en solución salina con tampón de fosfato (5-10 mg/ml) y se agrega 0,01 M ácido de etilendiamino tetraacético (10%-15% de volumen total). Se agrega exceso (2 veces) de reactivo de maleimido metoxiPEG (Nektar) y la reacción se agita a temperatura
- 20 ambiente mientras se monitorea el progreso de la reacción mediante HPLC. Después de 8-24 horas, la mezcla de la reacción se acidifica y se carga en una columna de fase invertida preparativa para la purificación usando 0,1% TFA/acetonitrilo grediente. Las fracciones apropiadas se combinaron y se
- 25 liofilizaron y dieron los análogos pegilados deseados.

## EJEMPLO 1

Síntesis de Glucagón Cys<sup>17</sup>(1-29) y Análogos de MonoCys similares

5 0,1 mmol Boc Thr(OBz) Pam resina (SynChem Inc) en un recipiente de reacción de 60 ml y se ingresó la siguiente secuencia y se corrió sobre un Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 430A modificado usando un solo acoplamiento activado por HBTU FastBoc.

10 **HSQGTFSTDYISKYLDSCRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 35)**

Se usaron los siguientes grupos protectores de cadena lateral: Arg(Tos), Asp(OcHex), Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex), His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO) y Tyr(Br-Z). la resina de peptidilo terminada se trató con 20% de  
15 piperidina/dimetilformamida para eliminar la protección de Trp formilo luego se transfirió a un recipiente de reacción de HF y se secó en vacío. Se agregaron 1,0 ml de p-cresol y 0,5 ml de sulfuro de dimetilo junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se montó al aparato de HF (Penninsula  
20 Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó y 10 ml de fluoruro de hidrógeno líquido se condensaron en él. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 hora y luego el HF se eliminó en vacío. El residuo suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter y el

péptido se extrajo en 50 ml de ácido acético acuoso. Se corrió un HPLC analítica [0,46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/minuto, 45°C, 214 nm, tampón A de 0,1% TFA, tampón B de 0,1% TFA/90% de ACN, gradiente = 10% B a 80% B durante 10 minutos] con una muestra  
5 pequeña del extracto de rotura. El extracto restante se cargó en una columna de fase invertida preparativa Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm y un gradiente de acetonitrilo se corrió usando un sistema de HPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 minutos mientras se monitoreaba la radiación ultravioleta a  
10 214 nm (2,0A). A = 0,1% TFA, B=0,1% TFA/50% acetonitrilo. Gradiente = 30% B a 100% B durante 450 minutos.

Las fracciones que contienen el producto más puro (48-52) se combinaron congeladas y se liofilizaron y dieron 30,1 mg. Un  
15 análisis de HPLC del producto demostró una pureza de >90% y el análisis de espectro de masa de MALDI demostró la masa deseada de 3429,7. Glucagon Cys<sup>21</sup>, Glucagon Cys<sup>24</sup> y Glucagon Cys<sup>29</sup> se prepararon en forma similar.

## 20 EJEMPLO 2

Síntesis de Glucagón-Cex y Otros Análogos de Extremo de C Prolongado



285 mg (0,2 mmol) de resina metoxibenzhidrilamina (Midwest Biotech) se colocaron en un recipiente para reacción de 60 ml y se ingresó la siguiente secuencia y se corrió en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A modificado  
5 usando un solo acoplamiento activado por HBTU de FastBoc.

**HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO:  
36)**

Se usaron los siguientes grupos protectores de cadena lateral:  
Arg(Tos), Asp(OcHex), Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex),  
10 His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO) y Tyr(Br-  
Z). La resina de peptidilo terminada se trató con 20% de piperidina/dimetilformamida para eliminar la protección de Trp formilo luego se transfirió a un recipiente de reacción de HF y se secó en vacío. Se agregaron 1,0 ml de p-cresol y 0,5 ml  
15 de sulfuro de dimetilo junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se montó al aparato de HF (Penninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó y 10 ml de fluoruro de hidrógeno líquido se condensaron en él. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 hora y  
20 luego el HF se eliminó en vacío. El residuo suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter y el péptido se extrajo en 50 ml de ácido acético acuoso. Se corrió un HPLC analítica [0,46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/minuto, 45°C, 214 nm, tampón A de 0,1% TFA, tampón B de 0,1% TFA/90% de ACN,

gradiente = 10% B a 80% B durante 10 minutos] con una muestra  
pequeña del extracto de rotura. El extracto restante se cargó  
en una columna de fase invertida preparativa Kromasil C18 de  
2,2 x 25 cm y un gradiente de acetonitrilo se corrió usando un  
5 sistema de HPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5  
minutos mientras se monitoreaba la radiación ultravioleta a  
214 nm (2,0A). A = 0,1% TFA, B=0,1% TFA/50% acetonitrilo.  
Gradiente = 30% B a 100% B durante 450 minutos. Las fracciones  
58-54 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron y dieron  
10 198,1 mg.

El análisis de HPLC del producto mostró una pureza superior al  
95%. El análisis de espectro de masa de MALDI mostró la  
presencia de la masa teórica deseada de 4316,7 con el producto  
15 como una amida de extremo de C. Oxintomodulina y  
oxintomodulina-KRNR se prepararon en forma similar como los  
ácidos carboxílicos del extremo de C partiendo con la resina  
de PAM cargada apropiadamente.

### 20 EJEMPLO 3

Glucagon Cys<sup>17</sup> Mal-PEG-5K

15,1 mg de Glucagon Cys<sup>17</sup> (1-29) y 27,3 mg de metoxi  
poli(etilenglicol) maleimida peso molecular promedio 5000  
25 (mPEG-Mal-5000, Nektar Therapeutics) se disolvieron en 3,5 ml

de solución salina con tampón de fosfato (PBS) y se agregó 0,5 ml de 0,01 M ácido etilendiamina tetraacético (EDTA). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitoreó mediante análisis de HPLC [0,46 x 5 cm Zorbax C8, 1ml/minuto, 45°C, 214 nm (0,5A), A=0,1% TFA, B=0,1% TFA/90% ACN, gradiente = 10% B a 80% B durante 10 minutos].

Después de 5 horas, la mezcla de la reacción se cargó sobre una columna de fase invertida preparativa Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm. Un gradiente de acetonitrilo se corrió sobre una FPLC Pharmacia mientras se monitoreaba la longitud de onda de radiación ultravioleta a 214 nm y se recogían fracciones de 5 minutos. A=0,1% TFA, B=0,1% TFA/50% acetonitrilo, gradiente = 30% B a 100% B durante 450 minutos. Las fracciones que corresponden al producto se combinaron, se congelaron y se liofilizaron y dieron 25,9 mg.

Este producto se analizó sobre HPLC [0,46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/minuto, 45°C, 214 nm (0,5A), A= 0,1% TFA, B= 0,1% TFA/90% ACN, gradiente = 10% B a 80% B durante 100 minutos] que mostró una pureza de aproximadamente el 90%. El análisis de espectro de masa de MALDI (ionización de desorción de láser asistida por la matriz) mostró una gama de masa ancha (normal de derivados de PEG) de 8700 a 9500. Esto muestra un agregado

a la masa del péptido de glucagón inicial (3429) de aproximadamente 5.000 a.m.u.

#### EJEMPLO 4

##### 5 Glucagón Cys<sup>21</sup> Mal-PEG-5K

21,6 mg de Glucagón Cys<sup>21</sup> (1-29) y 24 mg de mPEG-MAL-5000 (Nektar Therapeutics) se disolvieron en 3,5 ml de solución salina con tampón de fosfato (PBS) y se agregó 0,5 ml de 0,01M  
10 ácido etilendiamino tetraacético (EDTA). La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 horas, se agregaron otros 12,7 mg de mPEG-MAL-5000. Después de 8 horas, la mezcla de la reacción se cargó en una columna de fase invertida preparativa Vydac C18 de 2,2 x 25 cm y se corrió un gradiente de  
15 acetonitrilo sobre una HPLC Pharmacia a 4 ml/minuto mientras se recogían fracciones de 5 minutos. A=0,1% TFA, B=0,1% TFA/90% ACN. Gradiente= 20% a 80% B durante 450 minutos.

Las fracciones que corresponden a la apariencia del producto  
20 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron y dieron 34 mg. El análisis del producto mediante HPLC analítica [0,46 x 5 cm Zorbax CS, 1 ml/minuto, 45°C, 214 nm (0,5A), A=0,1% TFA, B= 0,1% TFA/90% ACN, gradiente = 10% B a 80% B durante 10 minutos] mostró un producto homogéneo que fue diferente del  
25 péptido de glucagón inicial. El análisis de espectro de masa

de MALDI (ionización de desorción de láser asistida por la matriz) mostró una gama de masa ancha (típica de análogos de PEG) de 8700 a 9700. Esto muestra un agregado a la masa del péptido de glucagón inicial (3470) de aproximadamente 5.000 a.m.u.

#### EJEMPLO 5

Glucagón Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-5K

10

20,1 mg de Glucagón C<sup>24</sup>(1-29( y 39,5 mg de mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) se disolvieron en 3,5 ml de PBS con agitación y se agregó 0,5 ml de 0,01 M de EDTA. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas, luego se  
15 agregaron otros 40 mg de mPEG-Mal-5000. Después de aproximadamente 15 horas, la mezcla de la reacción se cargó en una columna de fase invertida preparativa Vydac C18 de 2,2 x 25 cm y se corrió un gradiente de acetonitrilo usando una FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 minutos mientras  
20 se monitoreaba la radiación ultravioleta a 214 nm (2,0A). Tampón A = 0,1% TFA, tampón B = 0,1%TFA/50% ACN, gradiente = 30% B a 100% B durante 450 minutos. Las fracciones correspondientes al producto se combinaron, se congelaron y se liofilizaron y dieron 45,8 mg. El análisis de espectro de masa  
25 de MALDI mostró una señal ancha de PEG típica con un máximo a

9175,2 que es aproximadamente 5.000 a.m.u. más que Glucagón C<sup>24</sup> (3457,8).

#### EJEMPLO 6

##### 5 Glucagón Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-20K

25,7 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup>(1-29) y 40,7 mg mPEG-Mal-20K (Nektar Therapeutics) se disolvieron en 3,5 ml de PBS con agitación a temperatura ambiente y se agregó 0,5 ml de 0,01M EDTA. Después  
10 de 6 horas, la relación del material inicial al producto fue aproximadamente 60:40 determinado mediante HPLC. Se agregaron otros 25,1 mg de mPEG-Mal-20K y la reacción permitió agitar otras 16 horas. La relación del producto no había mejorado significativamente, de manera que la mezcla de la reacción se  
15 cargó en una columna de fase invertida preparativa Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm y se purificó sobre HPLC Pharmacia usando un gradiente del 30% B a 100% B durante 450 minutos. Tampón A = 0,1% TFA, tampón B = 0,1% TFA/50% ACN, flujo = 4 ml/minuto y se recogieron fracciones de 5 minutos mientras se monitoreaba  
20 la radiación ultravioleta a 214 nm (2,0A). Las fracciones que contenían el producto homogéneo se combinaron, se congelaron y se liofilizaron y dieron 25,7 mg. La pureza determinada mediante HPLC analítica fue 90%. Un análisis de espectro de masa de MALDI mostró un pico ancho de 23.000 a 27.000 que es

aproximadamente 20.000 a.m.u. más que el Glucagón C<sup>24</sup> inicial (3457,8).

#### EJEMPLO 7

5 20,0 mg de Glucagón Cys<sup>29</sup>(1-29) y 24,7 mg de mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) se disolvieron en 3,5 ml de PBS con agitación a temperatura ambiente y se agregó 0,5 ml de 0,01M EDTA. Después de 4 horas, se agregaron otros 15,6 mg de mPEG-Mal-5000 para impulsar la reacción hasta que termine. Después  
10 de 8 horas, la mezcla de la reacción se cargó en una columna de fase invertida preparativa Vydac C18 de 2,2 x 25 cm y se corrió un gradiente de acetonitrilo sobre un sistema de FPLC Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 minutos mientras se monitoreaba la radiación ultravioleta a 214 nm (2,0A). A =  
15 0,1% TFA, B=0,1% TFA/50% ACN. Las fracciones 75-97 se combinaron y se liofilizaron y dieron 40,0 mg del producto que es diferente del material inicial recuperado en HPLC (fracciones 58-63). El análisis del producto mediante HPLC analítico (0,46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/minuto, 214 nm (0,5A),  
20 A=0,1% TFA, B=0,1% TFA/90% ACN, gradiente = 10% B a 80% B durante 10 minutos] mostró una pureza superior al 95%. El análisis de espectro de masa de MALDI mostró la presencia de un componente PEG con una gama de masa de 8.000 a 10.000 (máximo a 9025,3) que es 5.540 a.m.u. mayor que el material  
25 inicial (3484,8).

## EJEMPLO 8

Glucagón Cys<sup>24</sup> (2-butirolactona)

A 24,7 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup>(1-29) se agregaron 4 ml de 0,05M de bicarbonato de amonio/50% de acetonitrilo y 5,5 ml de una solución de  $\gamma$ -lactona del ácido 2-bromo-4-hidrobutírico (100 ul en 900 ul de acetonitrilo). Después de 3 horas de agitar a temperatura ambiente, se agregaron otros 105 ul de solución de lactona a la mezcla de la reacción que se agitó durante otras 15 horas. La mezcla de la reacción se diluyó a 10 ml con 10% de ácido acético acuoso y se cargó en una columna de fase invertida preparativa de Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm. Un gradiente de acetonitrilo (20% B a 80% B durante 450 minutos) se corrió sobre FPLC Pharmacia mientras se recogían fracciones de 5 minutos y se monitoreaba la radiación ultravioleta a 214 nm (2,0A). Flujo = 4 ml/minuto, A = 0,1% TFA, B = 0,1% TFA / 50% de ACN. Las fracciones 74-77 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron y dieron 7,5 mg. El análisis de HPLC mostró una pureza del 95% y el análisis de espectro de masa de MALDI mostró una masa de 3540,7 u 84 unidades de masa más que el material inicial. Este resultado coincide con el agregado de un solo grupo butirolactona.





Peso Molecular = 3541,91

SEQ ID NO: 37

Masa Exacta = 3538

Fórmula Molecular = C<sub>155</sub>H<sub>226</sub>V<sub>42</sub>O<sub>50</sub>S<sub>2</sub>

#### EJEMPLO 9

Glucagón Cys<sup>24</sup> (S-carboximetilo)

5

18,1 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup>(1-29) se disolvieron en 9,4 ml 0,1M tampón de fosfato de sodio (pH = 9,2) y se agregó 0,6 ml de solución de ácido bromoacético (1,3 mg/ml en acetonitrilo). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la

10 reacción estuvo seguido por la HPLC analítica. La reacción se agitó otros 60 minutos, luego se acidificó con ácido acético acuoso y se cargó en una columna de fase invertida preparativa Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm para la purificación. Un gradiente de acetonitrilo se corrió sobre un FPLC Pharmacia (flujo = 4

15 ml/minuto) mientras se recogían fracciones de 5 minutos y se monitoreaba la radiación ultravioleta a 214 nm (2,0A). A = 0,1% TFA, B = 0,1% TFA/50% ACN. Las fracciones 26-29 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron y dieron varios mg del producto. La HPLC analítica mostró una pureza del 90% y el

20 análisis de espectro de masa de MALDI confirmó una masa de 3515 para el producto deseado.



Peso molecular = 3535,87

Masa exacta = 3512

Fórmula Molecular =  $\text{C}_{153}\text{H}_{224}\text{N}_{42}\text{O}_{50}\text{S}_2$

SEQ ID NO: 38

#### EJEMPLO 10

Glucagón Cys<sup>24</sup> maleimido PEG-3,4K-dímero

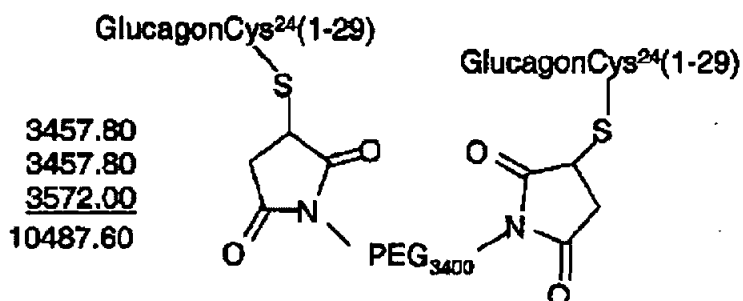
5

16 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> y 1,02 mg de Mal-PEG-Mal-3400, poli(etilenglicol)-bis-maleimida peso molecular promedio 3400 (Nektar Therapeutics) se disolvieron en 3,5 solución salina con tampón de fosfato y 0,5 ml 0,01M EDTA y la reacción se

10 agitó a temperatura ambiente. Después de 16 horas, se agregaron otros 16 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> y se continuó agitando. Después de aproximadamente 40 horas, la mezcla de la reacción se cargó en una columna PepRPC 16/10 Pharmacia y un gradiente de acetonitrilo se corrió sobre una FPLC Pharmacia mientras

15 se recogían fracciones de 2 minutos y se monitoreaba la radiación ultravioleta a 214 nm (2,0A). Flujo = 2 ml/minuto, A = 0,1% TFA, B = 0,1% TFA/50% ACN. Las fracciones 69-74 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron y dieron 10,4 mg. La HPLC analítica mostró una pureza del 90% y el análisis de

20 espectro de masa de MALDI muestra un componente en la gama de 9500-11.000 que coincide con el dímero deseado.



## EJEMPLO 11

## Síntesis de Lactamas de Glucagón

5

285 mg (0,2 mmol) de resina de metoxibenzhidrilamina (Midwest Biotech) se agregaron a un recipiente de reacción de 60 ml y la siguiente secuencia se montó en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A modificado usando un solo acoplamiento

10 activado por Boc DEPBT.

**HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT-NH<sub>2</sub> (12-16 Lactam; SEQ**

**ID NO: 12)**

Se usaron los siguientes grupos protectores de cadena lateral:

Arg(Tos), Asp(OcHx), Asn(Xan), Glu(OFm), His(BOM), Lys(Fmoc),

15 Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO), Tyr(Br-Z). Lys(Cl-Z) se usó en la posición 12 si se construyeron lactamas desde 16-20, 20-24 o 24-28. La resina de peptidilo terminada se trató con 20% de piperidina/dimetilformamida durante una hora con rotación para

eliminar el grupo Trp formilo así como la protección de Fmoc y Ofm de Lys12 y Glu16. Al confirmar la eliminación mediante un ensayo de ninhidrina positivo, la resina se lavó con dimetilformamida, seguida por dicloroemtano y nuevamente con dimetilformamida. La resina se trató con 520 mg (1 mmol) de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP) en dimetilformamida y diisopropiletilamina (DIEA). La reacción procedió durante 8-10 horas y la ciclación se confirmó con una reacción de ninhidrina negativa. La resina se lavó con dimetilformamida, luego con diclorometano y posteriormente se trató con ácido trifluoroacético durante 10 minutos. La eliminación del grupo Boc se confirmó con una reacción de ninhidrina positiva. La resina se lavó con dimetilformamida y diclorometano y se secó antes de ser transferida a un recipiente de reacción de ácido clorhídrico (HF). Se agregaron 500 µL de p-cresol junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se montó al aparato de HF (Penninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo/metanol, se evacuó, y se condensaron aproximadamente 10 mL de ácido fluorhídrico en el recipiente. La reacción se agitó durante 1 hora en un baño de hielo y posteriormente se eliminó HF en vacío. El residuo se suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter, y el péptido se solubilizó on 150 mL de 20% de acetonitrilo/1% de ácido acético.

Un análisis de HPLC analítico del péptido solubilizado crudo se realizó en las siguientes condiciones [4,6 X 30 mm Xterra C8, 1,50 mL/minuto, 220 nm, tampón A 0,1% de TFA/10% de ACN, tampón B 0,1% TFA/100% ACN, gradiente 5%-95% B durante 15 minutos]. El extracto se diluyó dos veces con agua y se cargó en una columna de fase invertida preparativa Vydac C4 de 2,2 x 25 cm y se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo sobre un sistema de HPLC Waters (tampón A de 0,1% de TFA/10% de ACN, Tampón B de 0,1% TFA/10% CAN y un gradiente de 0-100% B durante 120 minutos a un flujo de 15,00 ml/minuto. El análisis de HPLC del péptido purificado demostró más del 95% de pureza y el análisis de espectro de masa de ionización de electroaspersión confirmó una masa de 3506 Da para la lactama 12-16. Las lactamas de 16-20, 20-24 y 24-28 se prepararon en forma similar.

#### EJEMPLO 12

##### Ensayos de Solubilidad de Glucagón

Una solución (1mg/ml o 3 mg/ml) de glucagón (o un análogo) se prepara en 0,01N HCl. 100 ul de la solución de materia prima se diluye a 1 ml con 0,01 N HCl y se determina la absorbencia de radiación ultravioleta (276 nm). El pH de la solución de maeria prima restante se ajusta a pH 7 usando 200-250 ul 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9,2). Se deja la solución en reposo toda la noche a

4°C y luego se centrifuga. 100 ul del sobrenadante luego se diluyen a 1 ml con 0,01N HCl, y se determina la absorbencia de radiación ultravioleta (por duplicado).

- 5 La lectura de absorbencia inicial se compensa con el aumento en el volumen y se usa el siguiente cálculo para establecer el porcentaje de solubilidad:

Absorbencia Final X 100 = porcentaje soluble

- 10 Absorbencia Inicial

Los resultados se muestran en la Tabla 1 en donde Glucagón-Cex representa el glucagón de tipo silvestre (SEQ ID N° 1) más un agregado de extremo de carboxi de SEQ ID N° 26 y Glucagón-Cex R<sup>12</sup> representa SEQ ID N° 39:

- 15

**Tabla 1. Datos de la solubilidad para análogos de glucagón**

| <u>Análogo</u>       | <u>Porcentaje Soluble</u> |
|----------------------|---------------------------|
| Glucagón             | 16                        |
| Glucagón-Cex, R12    | 104                       |
| Glucagón-Cex         | 87                        |
| Oxintomodulina       | 104                       |
| Glucagón, Cys17PEG5K | 94                        |
| Glucagón, Cys21PEG5K | 105                       |
| Glucagón, Cys24PEG5K | 133                       |

## EJEMPLO 13

## Ensayo de Unión al Receptor de Glucagón

La afinidad de péptidos al receptor de glucagón se midió en un  
5 ensayo de competencia por la unión utilizando la tecnología de  
ensayo de proximidad de centelleo. Las diluciones de 3 veces  
en serie de los péptidos hechas en un tampón de ensayo de  
proximidad de centelleo (0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl,  
0,1% p/v de albúmina de suero bovino) se mezclaron en una  
10 placa de base blanca/transparente de 96 receptáculos (Corning  
Inc., Acton, MA) con 0,05 nM (3-[<sup>125</sup>I]-yodotirosilo) Tyr10  
glucagón (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 1-6  
microgramos por receptáculo, fragmentos de membrana de plasma  
preparados desde células que sobreexpresan el receptor de  
15 glucagón humano, y 1 mg/receptáculo de glóbulos de ensayo de  
proximidad de centelleo de aglutinina de germen de trigo tipo  
A tratado con polietilenimina (Amersham Biosciences,  
Piscataway, NJ). Después de 5 minutos de agitación a 800 rpm  
sobre un agitador giratorio, la placa se incubó durante 12  
20 horas a temperatura ambiente y luego se leyó sobre el contador  
de centelleo líquido MicroBeta 1450 (Perkin-Elmer, Wellesley,  
MA). La radioactividad unida en forma no específica (NSB) se  
midió en los receptáculos con una concentración 4 veces mayor  
del ligando nativo "frío" que la concentración más alta en  
25 muestras de ensayo y la radioactividad unida total se detectó

en los receptáculos con ningún competidor. El porcentaje de unión específica se calculó de la siguiente manera: 4 de Unión Específica =  $((\text{NSB Unido})/(\text{NSB Unido Total})) \times 100$ . Los valores de  $IC_{50}$  se determinaron usando el software Origin 5 (OriginLab, Northampton, MA).

#### EJEMPLO 14

##### Ensayo Funcional: Síntesis de cAMP

10 La capacidad de los análogos de glucagón de inducir cAMP se midió en un ensayo de informante basado en luciferasa de luciérnaga. Células HEK293 cotransfectadas con otro receptor de glucagón o GLP-1 y gen de luciferasa unido al elemento sensible a cAMP se despojaron del suero cultivando durante 16  
15 horas en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 0,25% de Suero de Crecimiento Bovino (HyClone, Logan, UT) y luego se incubaron con diluciones en serie de otro glucagón, GLP-1 o análogos de glucagón novedosos durante 5 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en placas de "Biocoat" recubiertas con poli-D-Lisina de  
20 96 receptáculos (BD Biosciences, San Jose, CA). Al final de la incubación, se agregaron 100 microlitros de reactivo de sustrato de luminiscencia LucLite (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) a cada receptáculo. La placa se agitó brevemente, se incubó durante 10 minutos en la salida de oscuridad y luz se  
25 midió sobre el contador de centelleo líquido MicroBeta-1450



(Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Las concentraciones del 50% eficaces se calcularon usando el software Origin (OriginLab, Northampton, MA). Los resultados se muestran en las Figuras 3-9 y en las Tablas 2 a 10.

5

**Tabla 2**  
**Incubación de cAMP por Análogos de Glucagón con Prolongación del Extremo de C**

| Péptido                | Inducción de cAMP     |    |                       |    |
|------------------------|-----------------------|----|-----------------------|----|
|                        | Receptor de Glucagón  |    | Receptor de GLP-1     |    |
|                        | EC <sub>50</sub> , nM | N* | EC <sub>50</sub> , nM | N  |
| Glucagón               | 0,22 ± 0,09           | 14 | 3,85 ± 1,64           | 10 |
| GLP-1                  | 2214,00 ± 182,43      | 2  | 0,04 ± 0,01           | 14 |
| Glucagón Cex           | 0,25 ± 0,15           | 6  | 2,75 ± 2,03           | 7  |
| Oxintomodulina         | 3,25 ± 1,65           | 5  | 2,53 ± 1,74           | 5  |
| Oxintomodulina<br>KRNR | 2,77 ± 1,74           | 4  | 3,21 ± 0,49           | 2  |
| Glucagón R12           | 0,41 ± 0,17           | 6  | 0,48 ± 0,11           | 5  |
| Glucagón R12<br>Cex    | 0,35 ± 0,23           | 10 | 1,25 ± 0,63           | 10 |
| Glucagón R12<br>K20    | 0,84 ± 0,40           | 5  | 0,82 ± 0,49           | 5  |
| Glucagón R12           | 1,00 ± 0,39           | 4  | 1,25 ± 0,97           | 5  |

|                              |             |   |             |   |
|------------------------------|-------------|---|-------------|---|
| K24                          |             |   |             |   |
| GlucagónR12 K29              | 0,81 ± 0,49 | 5 | 0,41 ± 0,24 | 6 |
| Glucagón Amida               | 0,26 ± 0,15 | 3 | 1,90 ± 0,35 | 2 |
| Oxintomodulina<br>C24        | 2,54 ± 0,63 | 2 | 5,27 ± 0,26 | 2 |
| Oxintomodulina<br>C24 PEG 2K | 0,97 ± 0,04 | 1 | 1,29 ± 0,11 | 1 |

\*: cantidad de experimentos

Tabla 3

Inducción de cAMP por Análogos de Glucagón Pegilado

| Péptido                | Inducción de cAMP     |    |                       |   |
|------------------------|-----------------------|----|-----------------------|---|
|                        | Receptor de Glucagón  |    | Receptor de GLP-1     |   |
|                        | EC <sub>50</sub> , nM | N* | EC <sub>50</sub> , nM | N |
| Glucagón               | 0,33 ± 0,23           | 18 | 12,71 ± 3,74          | 2 |
| Glucagón C17<br>PEG 5K | 0,82 ± 0,15           | 4  | 55,86 ± 1,13          | 2 |
| Glucagón C21<br>PEG 5K | 0,37 ± 0,16           | 6  | 11,52 ± 3,68          | 2 |
| Glucagón C24<br>PEG 5K | 0,22 ± 0,10           | 12 | 13,65 ± 2,95          | 4 |
| Glucagón C29<br>PEG 5K | 0,96 ± 0,07           | 2  | 12,71 ± 3,74          | 2 |

|                         |             |   |                |   |
|-------------------------|-------------|---|----------------|---|
| Glucagón C24<br>PEG 20K | 0,08 ± 0,05 | 3 | No determinada |   |
| Glucagón C24<br>Dímero  | 0,10 ± 0,05 | 3 | No determinada |   |
| GLP-1                   | > 1000      |   | 0,05 ± 0,02    | 4 |

\*: cantidad de experimentos

Tabla 4

Inducción de cAMP por Análogos de Glucagón E16

| Porcentaje de Potencia en Relación con el Ligando Nativo |       |          |
|----------------------------------------------------------|-------|----------|
| Péptido                                                  | GRec  | GLP-1Rec |
| E16-Gluc-NH <sub>2</sub>                                 | 187,2 | 17,8     |
| Glucagón                                                 | 100,0 | 0,8      |
| Gluc-NH <sub>2</sub>                                     | 43,2  | 4,0      |
| NLeu3, E16 Gluc-NH <sub>2</sub>                          | 7,6   | 20,6     |
| E3, E16 Gluc-NH <sub>2</sub>                             | 1,6   | 28,8     |
| Orn3, E16 Gluc-NH <sub>2</sub>                           | 0,5   | 0,1      |
| GLP-1                                                    | <0,1  | 100      |

Tabla 5

Inducción de cAMP por Análogos de Glucagón E16

| Porcentaje de Potencia en Relación con el Ligando Nativo |       |          |
|----------------------------------------------------------|-------|----------|
| Péptido                                                  | GRec  | GLP-1Rec |
| E16 Gluc-NH <sub>2</sub>                                 | 187,2 | 17,8     |
| E15, E16 Gluc-NH <sub>2</sub>                            | 147,0 | 9,2      |
| E16, K20 Gluc-NH <sub>2</sub>                            | 130,1 | 41,5     |
| Gluc-NH <sub>2</sub>                                     | 43,2  | 4,0      |

Tabla 6

5      Valores de EC<sub>50</sub> para Inducción de cAMP por Análogos de E16

Glucagón

|                                  | Receptor<br>de<br>Glucagón |       |    | Receptor<br>de GLP-1  |       |    |
|----------------------------------|----------------------------|-------|----|-----------------------|-------|----|
| Péptido                          | EC <sub>50</sub> (nM)      | StDev | n  | EC <sub>50</sub> (nM) | StDev | n  |
| Glucagón                         | 0,28                       | 0,14  | 10 | 4,51                  | N/A   | 1  |
| Glucagón-NH <sub>2</sub>         | 0,53                       | 0,33  | 8  | 1,82                  | 0,96  | 5  |
| E16 Gluc-NH <sub>2</sub>         | 0,07                       | 0,07  | 10 | 0,16                  | 0,14  | 10 |
| E16, G30<br>Gluc-NH <sub>2</sub> | 0,41                       | 0,36  | 5  | 0,24                  | 0,10  | 5  |
| E16, G30                         | 0,51                       | 0,46  | 5  | 1,19                  | 0,86  | 5  |

|          |      |     |   |      |      |   |
|----------|------|-----|---|------|------|---|
| Gluc-Cex |      |     |   |      |      |   |
| GLP-1    | 2214 | N/A | 1 | 0,03 | 0,02 | 9 |

Tabla 7

Valores de EC<sub>50</sub> para Inducción de cAMP por Análogos de E16

Glucagón

|                                                      | Receptor<br>de<br>Glucagón |       |    | Receptor<br>de GLP-1  |       |    |
|------------------------------------------------------|----------------------------|-------|----|-----------------------|-------|----|
| Péptido                                              | EC <sub>50</sub> (nM)      | StDev | n  | EC <sub>50</sub> (nM) | StDev | n  |
| E16<br>Glucagón<br>NH <sub>2</sub>                   | 0,07                       | 0,07  | 10 | 0,16                  | 0,14  | 10 |
| HCSO <sub>3</sub> 16<br>Glucagón-<br>NH <sub>2</sub> | 0,25                       | 0,12  | 2  | 0,19                  | 0,02  | 2  |
| hE16<br>Glucagón-<br>NH <sub>2</sub>                 | 0,17                       | 0,08  | 2  | 0,25                  | 0,03  | 2  |
| H16<br>Glucagón-<br>NH <sub>2</sub>                  | 0,45                       | 0,3   | 2  | 0,38                  | 0,11  | 2  |
| Q16<br>Glucagón-                                     | 0,22                       | 0,1   | 2  | 0,39                  | 0,08  | 2  |

|                                       |      |      |   |      |      |   |
|---------------------------------------|------|------|---|------|------|---|
| NH <sub>2</sub>                       |      |      |   |      |      |   |
| D16<br>Glucagón-<br>NH <sub>2</sub>   | 0,56 | 0,15 | 2 | 0,93 | 0,28 | 2 |
| (S16)<br>Glucagón-<br>NH <sub>2</sub> | 0,53 | 0,33 | 8 | 1,82 | 0,96 | 5 |

Tabla 8

Valores de EC<sub>50</sub> para Inducción de cAMP por Análogos de E16

Glucagón

|                                 | Receptor<br>de<br>Glucagón |       |    | Receptor<br>de GLP-1  |       |    |
|---------------------------------|----------------------------|-------|----|-----------------------|-------|----|
| Péptido                         | EC <sub>50</sub> (nM)      | StDev | n  | EC <sub>50</sub> (nM) | StDev | n  |
| E16<br>Glucagón-NH <sub>2</sub> | 0,07                       | 0,07  | 10 | 0,16                  | 0,14  | 10 |
| T16<br>Glucagón-NH <sub>2</sub> | 0,10                       | 0,02  | 3  | 1,99                  | 0,48  | 3  |
| G16<br>Glucagón-NH <sub>2</sub> | 0,10                       | 0,01  | 3  | 2,46                  | 0,60  | 3  |
| Glucagón NH <sub>2</sub>        | 0,53                       | 0,33  | 4  | 1,82                  | 0,96  | 5  |
| GLP-1                           | 2214                       | N/A   | 1  | 0,03                  | 0,02  | 9  |

E16 Gluc NH<sub>2</sub> fue 4 veces más potente en el receptor de glucagón en relación con G16-COOH y T16 Gluc NH<sub>2</sub> cuando los compuestos se ensayaron lado a lado.

5

Tabla 9

Inducción de cAMP por Análogos de E16/Lactama Glucagón

| Porcentaje de Potencia en Relación con el Ligando Nativo |       |          |
|----------------------------------------------------------|-------|----------|
| Péptido                                                  | GRec  | GLP-1Rec |
| E24K28 Gluc-NH <sub>2</sub> Lac                          | 196,4 | 12,5     |
| E16K20 Gluc-NH <sub>2</sub> Lac                          | 180,8 | 63,0     |
| K12E16 Gluc-NH <sub>2</sub> Lac                          | 154,2 | 63,3     |
| K20E24 Gluc-NH <sub>2</sub> Lac                          | 120,2 | 8,1      |
| E16 Gluc-NH <sub>2</sub>                                 | 187,2 | 17,8     |
| E16, K20 Gluc-NH <sub>2</sub>                            | 130,1 | 41,5     |
| Glucagón                                                 | 100,0 | 0,8      |
| Gluc-NH <sub>2</sub>                                     | 43,2  | 4,0      |

Tabla 10

Inducción de cAMP por Análogos de GLP-1 17-26 Glucagón

10

|         | Receptor de<br>Glucagón |     | Receptor<br>de GLP-1 |       |
|---------|-------------------------|-----|----------------------|-------|
| Péptido | EC50 (nM)               | StD | EC50 (nM)            | StD   |
| GLP-1   |                         |     | 0,023                | 0,002 |

|                                                 |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Gluc-NH <sub>2</sub>                            | 0,159 | 0,023 |       |       |
| E16 GLP-1                                       |       |       | 0,009 | 0,000 |
| E16 Glucagón-NH <sub>2</sub>                    | 0,072 | 0,007 |       |       |
| E16 GLP(17-26)Glu(27-29)-NH <sub>2</sub>        | 0,076 | 0,004 | 0,014 | 0,001 |
| E16 GLP(17-29)-NH <sub>2</sub>                  | 0,46  | 0,023 | 0,010 | 0,000 |
| E16 GLP(17-29)-NH <sub>2</sub> E24, K28         | 0,23  | 0,020 | 0,007 |       |
| E16 GLP(17-29)-NH <sub>2</sub> E24, K28 Lactama | 0,16  | 0,017 | 0,007 | 0,000 |

EJEMPLO 15

Ensayo de Estabilidad para análogos de glucagón Cys-maleimido PEG

5 Cada análogo de glucagón se disolvió en agua o PBS y se realizó un análisis de HPLC inicial. Después de ajustar el pH (4, 5, 6, 7), las muestras se incubaron durante un período de tiempo especificado a 37°C y se analizaron nuevamente por HPLC para determinar la integridad del péptido.. La concentración  
10 del péptido específico de interés se determinó y el porcentaje intacto remanente se calculó en relación con el análisis inicial. Los resultados para Glucagón Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub> se muestran en las Figuras 1 y 2.

15 EJEMPLO 16



Los siguientes péptidos de glucagón se construyen generalmente como se describió anteriormente en los Ejemplos 1-11:

En la totalidad de las siguientes secuencias, "a" significa una amida del extremo de C.

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 70)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 71)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 72)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 73)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 74)**

**HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 75)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 76)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 77)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 78)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 79)**

**HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 80)**

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 81)**

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 82)**

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 83)**

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 84)**

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 85)**

HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 86)

XISQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 87)

XISQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 88)

XISQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 89)

XISQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 90)

XISQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 91)

XISQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 92)

XISQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 93)

XISQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 94)

XISQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 95)

XISQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 96)

XISQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 97)

XISQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO: 98)

XISQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 99)

XISQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 100)

XISQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO: 101)

XISQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 102)

XISQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 103)

En donde en las secuencias precedentes, X1 = (Des-amino)His

- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 104)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 105)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 106)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 107)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 108)
- HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 109)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 110)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 111)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 112)
- HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 113)
- HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 114)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO: 115)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 116)
  
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 117)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO: 118)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 119)
- HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 120)

En donde en las secuencias precedentes X2 = ácido  
aminoisobutírico

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 121)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 122)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 123)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 124)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 125)  
HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 126)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 127)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 128)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 129)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 130)  
HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 131)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 132)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 133)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 134)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 135)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 136)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 137)

En donde en las secuencias precedentes X2 = (D-Ala)

HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 138)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 139)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 140)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 141)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 142)  
HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 143)

HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 144)

HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 145)

HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 146)

HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 147)

HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 148)

HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 149)

HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 150)

HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 151)

HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 152)

HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 153)

HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 154)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 155)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 156)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 157)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 158)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 159)

X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 160)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 161)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 162)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 163)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 164)

X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 165)

X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 166)

X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 167)

X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 168)

X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 169)

X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 170)

X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 171)

En donde en las secuencias precedentes X1 = (Des-amino)His

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 172)

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 173)

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 174)

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 175)

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 176)

HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 177)

HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 178)

HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 179)

HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 180)

HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 181)

HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 182)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 183)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 184)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 185)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 186)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 187)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 188)

5 En donde en las secuencias precedentes X2 = ácido  
aminoisobutírico

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 189)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 190)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 191)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 192)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 193)  
HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 194)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 195)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 196)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 197)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 198)  
HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 199)  
HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO: 200)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 201)  
HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 202)  
HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO: 203)  
HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 204)  
HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 205)

En donde en las secuencias precedentes X2 = (D-Ala)

HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 206)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 207)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 208)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 209)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 210)  
HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 211)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 212)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 213)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 214)  
HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 215)  
HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 216)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 217)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 218)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 219)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 220)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 221)  
HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 222)

X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 223)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 224)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 225)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 226)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 227)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 228)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 229)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 230)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 231)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 232)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 233)  
  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 234)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 235)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 236)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 237)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 238)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 239)

En donde en las secuencias precedentes X1 = (Des-amino)His; y  
 en donde el C\* es un Cys, o una Cys unida a un polímero  
 5 hidrófilo, o alternativamente el C\* es una Cys unida a un  
 polietilenglicol de 20 kD de peso molecular promedio, o  
 alternativamente, el C\* es una Cys unida a un polietilenglicol  
 de 40 kD de peso molecular.



HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 240)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 241)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 242)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 243)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 244)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 245)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 246)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 247)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 248)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 249)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 250)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 251)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 252)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 253)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 254)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 255)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 256)

En donde en las secuencias precedentes X2= ácido  
 aminoisobutírico; y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida  
 a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys  
 5 unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o  
 alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol  
 de 40 kD de peso promedio.

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 257)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 258)

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 259)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 260)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 261)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 262)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 263)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 264)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 265)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 266)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 267)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 268)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 269)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 270)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 271)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 272)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 273)

En donde en las secuencias precedentes X2 = (D-Ala); y en  
 donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero  
 hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un  
 5 polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o  
 alternativamente, la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol  
 de 40 kD de peso promedio.

HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 274)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 275)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 276)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 277)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 278)  
HSEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 279)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 280)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 281)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 282)  
HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 283)  
HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 284)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 285)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 286)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 287)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 288)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 289)  
HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 290)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 291)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 292)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 293)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 294)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 295)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 296)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 297)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 298)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 299)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 300)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 301)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 302)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 303)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 304)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 305)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 306)  
 X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 307)

En donde en las secuencias precedentes X1 = (Des-amino)His; y  
 en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero  
 hidrófilo; o alternativamente la C\* es una Cys unida a un  
 5 polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o  
 alternativamente, la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol  
 de 40 kD de peso promedio.

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 308)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 309)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 310)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 311)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 312)

HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 313)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 314)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 315)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 316)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 317)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 318)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 319)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 320)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 321)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 322)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 323)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 324)

En donde en las secuencias precedentes X2 = ácido  
 aminoisobutírico; y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida  
 a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys  
 5 unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o  
 alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol  
 de 40 kD de peso promedio.

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 325)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 326)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 327)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 328)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 329)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 330)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 331)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 332)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 333)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 334)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 335)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (SEQ ID NO: 336)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 337)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 338)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (SEQ ID NO: 339)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 340)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LVKGa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 341)

En donde en las secuencias precedentes X2 = (D-Ala); y en  
 donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero  
 hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un  
 5 polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente  
 la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso  
 promedio.

HSQGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 342)  
 HSQGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 343)  
 HSQGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 344)  
 HSQGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKG<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 345)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 346)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 347)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 348)  
 X1SQGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKG<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 349)

En donde X1 = (Des-amino)His; y en donde la C\* es una Cys, o  
 una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la  
 C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso  
 5 promedio, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un  
 polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

HX2QGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 350)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 351)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 352)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKG<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 353)

En donde X2= ácido aminoisobutírico; y en donde la C\* es una  
 10 Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o  
 alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol  
 de 20 kD de peso promedio, o alternativamente la C\* es una Cys  
 unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

HX2QGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 354)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 355)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 356)  
 15 HX2QGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKG<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 357)

En donde X2 = (D-Ala); y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

- HSEGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 358)
- HSEGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 359)
- HSEGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 360)
- HSEGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 361)
- X1SEGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 362)
- X1SEGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 363)
- X1SEGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 364)
- X1SEGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 365)

En donde X1= (Des-amino)His; y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

- HX2EGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 366)
- HX2EGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 367)
- HX2EGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LMNTa (SEQ ID NO: 368)
- HX2EGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFLAW LVKGa (SEQ ID NO: 369)

En donde X2 = (D-Ala); y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o



alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

**HX2EGT FTSDY SKYLD C\*RRAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 370)**

**HX2EGT FTSDY SKYLD C\*RAAK DFVQW LMNTa (SEQ ID NO: 371)**

**HX2EGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LMNTa (SEQ ID NO: 372)**

**HX2EGT FTSDY SKYLD C\*QAAK EFIAW LVKGa (SEQ ID NO: 373)**

- 5 En donde X2= (D-Ala); y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

10

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 374)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 375)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 376)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 377)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 378)**

**HSQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 379)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 380)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 381)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 382)**

**HSQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 383)**

**HSQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 384)**

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (SEQ ID NO: 385)**

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 386)**

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 387)**

X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 388)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 389)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 390)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 391)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 392)  
X1SQGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 393)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 394)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 395)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 396)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 397)  
X1SQGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 398)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 399)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 400)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 401)

En donde en las secuencias precedentes X1 = (Des-amino)His

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 402)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 403)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 404)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 405)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 406)  
  
HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 407)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 408)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 409)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 410)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 411)  
HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 412)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 413)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 414)  
HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 415)

5

En donde en las secuencias precedentes X2 = ácido  
aminoisobutírico

HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 416)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 417)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 418)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 419)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 420)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRRAB DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 421)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 422)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 423)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 424)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 425)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 426)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (SEQ ID NO: 427)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 428)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 429)

En donde en las secuencias precedentes X2= (D-Ala)

HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 430)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 431)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 432)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 433)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 434)  
 HSEGT FTSDY SKYLD KRRAB DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 435)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 436)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 437)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 438)  
 HSEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 439)  
 HSEGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 440)  
 HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (SEQ ID NO: 441)  
 HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 442)  
 HSEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 443)

X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 444)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 445)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 446)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 447)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 448)  
X1SEGT FTSDY SKYLD KRRAB DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 449)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 450)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 451)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 452)  
X1SEGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 453)  
X1SEGT FTSDY SKYLD KRAAB DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 454)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 455)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 456)  
X1SEGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 457)

En donde en las secuencias precedentes X1 = (Des-amino)His

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 458)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 459)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 460)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 461)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 462)  
HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAB DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 463)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (SEQ ID NO: 464)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 465)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 466)  
HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 467)  
HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DFVQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 468)  
HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (SEQ ID NO: 469)  
HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 470)

HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFLAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 471)

5 En donde en las secuencias precedentes X2= ácido  
aminoisobutírico

HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DfvQW LMDTa (SEQ ID NO: 472)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DfvQW LMDTa (SEQ ID NO: 473)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DfvQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 474)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAQ DfvQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 475)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERRAK DfvQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 476)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD KRRAE DfvQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 477)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DfvQW LMDTa (SEQ ID NO: 478)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DfvQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 479)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAQ DfvQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 480)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD ERAAK DfvQW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 481)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD KRAAE DfvQW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 482)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFlAW LMDTa (SEQ ID NO: 483)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFlAW LMDTa (lactam @ 12-16; SEQ ID NO: 484)  
 HX2EGT FTSDY SKYLD EQAAK EFlAW LMDTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 485)

En donde en las secuencias precedentes X2 = (D-Ala)

Los péptidos de glucagón siguientes con una relación de  
 5 actividad de GLP-1/glucagón de 5 o más también se construyen  
 generalmente como se describió anteriormente en los Ejemplos  
 1-11. Generalmente, en estos péptidos, AIB en la posición 2  
 proporciona resistencia a DPP IV pero también reduce  
 significativamente la actividad de glucagón.

HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 486)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 487)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 488)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC\*<sub>a</sub> (lactam @ 16-20;  
 SEQ ID NO: 489)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (SEQ ID NO: 490)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20;  
 SEQ ID NO: 491)

En donde en las secuencias precedentes X2=AIB, y en donde la  
 C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o  
 alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol  
 5 de 20 kD de peso promedio, o alternativamente la C\* es una Cys  
 unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 492)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 493)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO:  
 494)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*<sub>a</sub> (lactam @ 16-20;  
 SEQ ID NO: 495)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (SEQ ID NO: 496)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20;  
 SEQ ID NO: 497)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 498)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 499)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 500)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*<sub>a</sub> (lactam @ 16-20;  
 SEQ ID NO: 501)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (SEQ ID NO: 502)  
 HX2QGT FTSDY SKYLD ERAAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20;  
 SEQ ID NO: 503)

En donde en las secuencias precedentes X2=AIB, y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente, la Cys es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente  
5 la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

Los siguientes péptidos de glucagón que son coagonistas de GLP-1/glucagón también se construyen generalmente como se  
10 describió anteriormente en los Ejemplos 1-11. La formación de un puente de lactama entre los aminoácidos 16 y 20 restablece la reducción en la actividad de glucagón provocada por la sustitución en la posición 2.

15 **HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 504)**

En donde en la secuencia precedente X2=AIB, y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente la C\* es una Cys  
20 unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 505)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNC\*a (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 506)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (lactam @ 16-20;  
SEQ ID NO: 507)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNGG PSSGA PPPSC\*a (lactam @ 16-20;  
SEQ ID NO: 508)  
X1SQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20;  
SEQ ID NO: 509)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 510)  
HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNTa (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 511)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVQW LMNC\*a (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 512)  
X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPSa (lactam @ 16-20;  
SEQ ID NO: 513)

En donde en las secuencias precedentes X1=DMIA (ácido alfa,  
alfa-dimetil imidazol acético) y en donde la C\* es una Cys, o  
una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la  
5 C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso  
promedio, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un  
polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

**HSQGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNTa (optionally with lactam @ 16-20; SEQ  
ID NO: 514)**

10 En donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero  
hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un  
polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente  
la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso  
promedio.



**HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNT<sub>a</sub> (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 517)**

**HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNT<sub>a</sub> (lactam @ 16-20; SEQ ID NO: 528)**

**HX2QGT FTSDY SKYLD ERRAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPSC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 531)**

**HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIAW LMNGG PSSGA PPPSC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 532)**

**HX2QGT FTSDY SKYLD EQAAK EFIC\*W LMNGG PSSGA PPPS<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 533)**

En donde en la secuencia precedente X2= AIB, y en donde la C\* es una Cys, o una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

**HSQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIC\*W LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 518)**

**X1SQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIC\*W LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 519)**

**X1SQGT FTSDYSKYLD EQAAK EFIAW LMNC\*<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 520)**

**X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNGG PSSGA PPPS<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 529)**

**X1SQGT FTSDY SKYLD ERRAK DFVC\*W LMNT<sub>a</sub> (SEQ ID NO: 530)**

En donde en las secuencias precedentes X1= DMIA (ácido alfa, alfa-dimetil imidazol acético) y en donde la C\* es una Cys unida a un polímero hidrófilo, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 20 kD de peso promedio, o alternativamente la C\* es una Cys unida a un polietilenglicol de 40 kD de peso promedio.

HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMNTGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 521)  
HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMNGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 522)  
HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMKGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 523)  
HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LVKGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 524)  
HSQGT FTSDYSKYLD SRRAQ DFVQW LMDGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 525)  
HSQGT FTSDYSKYLD ERRAK DFVQW LMDGGPSSGAPPPSa (SEQ ID NO: 526)  
HABGT FTSDV SSYLE GQAAK EFIAW LVKGGa (SEQ ID NO: 527)

**X1X2QGT FTSDY SKYLD ERX5AK DFVX3W LMNX4 (SEQ ID NO: 61)**

En donde

X1= His, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina,  
acetil-histidina, homo-histidina o ácido alfa, alfa-dimetil  
5 imidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil  
histidina, o ácido imidazol acético,

X2= Ser, D-serina, Ala, Val, glicina, N-metil serina o ácido  
aminoisobutírico (AIB), N-metil alanina y D-alanina

X3= Ala, Gln o Cys-PEG

10 X4= Thr-CONH<sub>2</sub> o Cys-PEG o GGPSSGAPPPS (SEQ ID N° 515) o

**GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID NO: 516)**

Siempre que cuando X3 es Cys-PEG, X4 no sea Cys-PEG o  
GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID N° 516) y cuando X2=Ser, X1 no sea  
His

15 X5= Ala o Arg

**X1X2QGT FTSDY SKYLD EQ X5AK EFI X3W LMNX4 (SEQ ID NO: 62)**

En donde

- X1= His, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina o ácido alfa,alfa-dimetil imidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil histidina, o ácido imidazol acético
- 5 X2= Ser, D-serina, Ala, Val, glicina, N-metil serina o ácido aminoisobutírico (AIB), N-metil alanina y D-alanina
- X3= Ala, Gln o Cys-PEG
- X4 = Thr-CONH<sub>2</sub> o Cys-PEG o GGPSSGAPPPS (SEQ ID N° 515) o GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID N° 516)
- 10 Siempre que cuando X3 es Cys-PEG, X4 no sea Cys-PEG o GGPSSGAPPPSC-PEG (SEQ ID N° 516) y cuando X2= Ser, X1 no sea His
- X5= Ala o Arg
- 15 Cualquiera de las secuencias precedentes puede incluir modificaciones adicionales, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones que no destruyen la actividad, que incluyen en forma o taxativa las sustituciones W10 o R20 que se pueden usar para aumentar la potencia. Cualquiera de las secuencias
- 20 precedentes también se puede producir sin las modificaciones que confieren resistencia a DPP IV, es decir en donde la His nativa está en la posición 1 y la Ser nativa está en la posición 2. Además, cualquiera de los compuestos precedentes puede unirse optativamente a un conjugado, tal como
- 25 polipéptido heterólogo, una inmunoglobulina o una parte de

ellos (por ejemplo la región de Fc), un agente dirigido, un marcador de diagnóstico, o un agente de diagnóstico o terapéutico.

## 5 EJEMPLO 17

Los siguientes péptidos de glucagón modificados para comprender la prolongación del extremo de C de SEQ ID N° 26 unida al extremo de carboxi del péptido de glucagón se  
10 construyeron generalmente como se describió anteriormente en los Ejemplos 1-11 y se ensayaron por la actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón usando el ensayo in vitro descrito en el Ejemplo 14.

15 La Tabla 11 representa la actividad de diferentes análogos de glucagón en los receptores de glucagón y GLP-1. Los datos muestran que los análogos de glucagón que comprenden la prolongación del extremo de C de SEQ ID N° 26, las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 16, 20, 28 y 29  
20 pueden impactar en la actividad de los análogos en el receptor de GLP-1.

TABLA 11

Glucagón-Cex

Relación Estructura Actividad

| Péptido de Glucagón                                                            | EC50  |                       | BC50 (nM) |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------------------|-----------|-----------------------|
|                                                                                | (nM)  | Potencia Relativa (%) |           | Potencia Relativa (%) |
| -MNT <sup>29</sup> (SEQ ID NO: 1)                                              | 0.086 | 100                   |           |                       |
| -MNTG <sup>36</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 521)                                 | 0.14  | 61                    | 1.19      | 2                     |
| -MNGG <sup>36</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 522)                                 | 0.28  | 30                    | 0.31      | 8                     |
| -MKGG <sup>36</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 523)                                 | 0.61  | 14                    | 0.80      | 3                     |
| -VKGG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 524)                                 | 1.16  | 7                     | 0.21      | 12                    |
| -MDGG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 525)                                 | 0.12  | 72                    | 0.13      | 19                    |
| E <sup>16</sup> K <sup>20</sup> -MDGG <sup>30</sup> PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 526) | 0.22  | 39                    | 0.020     | 125                   |
| GLP-1-VKGG <sup>30</sup> (SEQ ID NO: 527)                                      |       |                       | 0.025     | 100                   |

5

EJEMPLO 18

La Tabla 12 representa datos in vitro acumulados para diferentes péptidos que comparan sus actividades relativas en los receptores de glucagón y GLP-1.

10

Tabla 12. COMPARACIÓN DE AGONISTAS Y COAGONISTAS con y sin PEG

|           | % de Potencia en Relación con el Nativo |       |
|-----------|-----------------------------------------|-------|
| CONTROLES | GR                                      | GL-1R |
| Glucagón  | 100                                     | 0,78  |
| GLP-1     | <0,01                                   | 100   |

|                                                              | Padre sin PEG                              |        | Padre con PEG                              |        |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------|--------------------------------------------|--------|
|                                                              | % de Potencia<br>en relación<br>con Nativo |        | % de Potencia<br>en relación<br>con Nativo |        |
| AGONISTAS                                                    | GR                                         | GLP-1R | GR                                         | GLP-1R |
| Quimera AIB2, Cys24 (SEQ ID N° 486)                          | 15,4                                       | 160,6  | 2,6                                        | 82,5   |
| Quimera AIB2, Cys29 (SEQ ID N° 487)                          | 20,1                                       | 124,6  | 5,6                                        | 54,3   |
| Quimera AIB2, Gly29, 30 Cys40<br>Cex (SEQ ID N° 488)         | 2,2                                        | 359,1  | 0,3                                        | 68,8   |
| Quimera AIB2, Gly29, 30 Cys40<br>Cex Lactama (SEQ ID N° 489) | 14,2                                       | 169,6  | 3,2                                        | 63,6   |
| Quimera AIB2, Gly29, 30 Cys24<br>Cex (SEQ ID N° 490)         | 2,5                                        | 457,8  | 0,2                                        | 95,4   |
| Quimera AIB2, Gly29, 30 Cys24<br>Cex Lactama (SEQ ID N° 491) | 25,2                                       | 381,5  | 1,4                                        | 96,4   |

|                                                             |       |        |      |        |
|-------------------------------------------------------------|-------|--------|------|--------|
| E16, K20AIB2, A18 Cys24 (SEQ ID N° 492)                     | --    | --     | 1,1  | 73,5   |
| E16, K20AIB2, A18 Gly29, 30 Cys24 Cex (SEQ ID N° 496)       | --    | --     | 0,1  | 88,5   |
|                                                             |       |        |      |        |
| COAGONISTAS                                                 | GR    | GLP-1R | GR   | GLP-1R |
| Quimera DMIA1, Cys24 Lactama (SEQ ID N° 505)                | 160,7 | 82,5   | 19,1 | 12,5   |
| Quimera AIB2, Cys24 Lactama (SEQ ID N° 504)                 | 114,2 | 230,4  | 9,2  | 38,0   |
| Quimera DMIA1, Cys29 Lactama (SEQ ID N° 506)                | --    | --     | --   | --     |
| Quimera DMIA1, Gly29, 30 Cys24 Cex Lactama (SEQ ID N° 507)  | --    | --     | --   | --     |
| E16, K20 DMIA1, Gly29, 30 Cys40 Cex Lactama (SEQ ID N° 508) | --    | --     | --   | --     |
| Quimera DMIA1, Gly29, 30 Cys24 Cex Lactama (SEQ ID N° 509)  | --    | --     | --   | --     |
| E16, K20 DMIA1, Cys24 Lactama (SEQ ID N° 510)               | --    | --     | 64,1 | 9,3    |
| E16, K20 AIB2, Cys24 Lactama (SEQ ID N° 517)                | 108,3 | 96,9   | 15,8 | 31,0   |
| Quimera Cys24 (SEQ ID N° 518)                               | --    | --     | 19,8 | 29,3   |

|                                                                   |       |      |      |      |
|-------------------------------------------------------------------|-------|------|------|------|
| E16, K20 DMIA1, Gly29, 30<br>Cys24 Cex Lactama (SEQ ID N°<br>513) | 116,0 | 76,3 | 12,6 | 11,3 |
| Quimera DMIA1, Cys29 (SEQ ID<br>N° 520)                           | --    | --   | 5,3  | 27,3 |
| Quimera DMIA1, Cys24 (SEQ ID<br>N° 519)                           | 28,9  | 64,5 | 6,9  | 19,3 |



**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido de glucagón no nativo que comprende la secuencia de SEQ ID N° 55 o un análogo de SEQ ID N° 55, en donde dicho  
5 análogo no es un péptido natural y dicho análogo difiere de SEQ ID N° 55 en 1 a 3 modificaciones de aminoácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28 y 29, en donde dicho péptido de glucagón presenta por lo menos un 20% de la actividad del  
10 receptor de GLP-1 en el receptor de GLP-1.
2. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido de glucagón comprende SEQ ID N° 55.
- 15 3. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido de glucagón comprende SEQ ID N° 45.
4. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde dicho péptido de glucagón  
20 también comprende un péptido seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 29 y SEQ ID N° 65 unido al extremo de carboxi del péptido de glucagón.
5. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 2 o  
25 3, en donde dicho péptido de glucagón además comprende SEQ ID

Nº 26 unido al extremo de carboxi de dicho péptido de glucagón.

5 6. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, que comprende un puente de lactama entre dos aminoácidos seleccionados del grupo formado por aminoácidos en las posiciones 16 y 20, aminoácidos en las posiciones 12 y 16, aminoácidos en las posiciones 20 y 24 y aminoácidos en las posiciones 24 y 28.

10

7. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el puente de lactama está entre los aminoácidos de las posiciones 16 y 20.

15 8. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido de glucagón comprende SEQ ID Nº 33.

9. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el aminoácido en la posición 28 es Asp, Asn o Lys y  
20 el aminoácido en la posición 29 es Gly o Thr.

10. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido de glucagón comprende un análogo de SEQ ID Nº 55 que difiere de SEQ ID Nº 55 en 1 o 2 aminoácidos.

25

11. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido de glucagón comprende un análogo de SEQ ID N° 55 que difiere de SEQ ID N° 55 en un 1 aminoácido.
- 5 12. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 53.
- 10 13. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el aminoácido en la posición 3 es glutamina.
14. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el aminoácido en la posición 3 es ácido glutámico.
- 15 15. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que presenta por lo menos un 10% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y por lo menos un 50% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.
- 20 16. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que presenta por lo menos un 40% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y por lo menos un 40% de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor
- 25 de GLP-1.

17. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que presenta por lo menos un 60% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y por lo menos un 60% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.

18. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y 14 que presenta un 0,1%-10% de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón y por lo menos un 20% de la actividad del GLP-1 en el receptor de GLP-1.

19. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y 14 que presenta un 1%-10% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.

20. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el aminoácido en la posición 20 es lisina, y el grupo ácido carboxílico del extremo de C se reemplaza con una amida, optativamente con un puente de lactama entre el ácido glutámico en la posición 16 y la lisina en la posición 20.

21. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 20, en donde una cadena de polietilenglicol está unido en

27. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 24, en donde X<sub>4</sub> es GGPSSGAPPPSC-PEG.

28. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las 5 reivindicaciones 24-27, que además comprende un puente de lactama entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20.

29. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido comprende la secuencia de NH<sub>2</sub>-His-Ser-  
10 Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-COOH (SEQ ID N° 9) en donde Xaa se selecciona del grupo formado por Met, Leu y Nle.

15 30. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43 y SEQ ID N° 44.

20 31. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido comprende la secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14 y SE ID N° 15.

32. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el aminoácido en la posición 2 se selecciona del grupo formado por d-serina, alanina, D-alanina, valina, glicina, N-metil serina, N-metil alanina, y ácido amino isobutírico.

33. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el aminoácido en la posición 1 se selecciona del grupo formado por d-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina, N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, ácido alfa-dimetil imidazol acético (DMIA).

34. El péptido de glucagón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, que además comprende un grupo hidrófilo unido en forma covalente en la posición 17, 21, o 24 o en el aminoácido del extremo de C del péptido de glucagón.

35. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 34, en donde dicho grupo hidrófilo es una cadena de polietilenglicol.

36. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1 o 31, en donde el péptido de glucagón además comprende una

secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 y SEQ ID N° 29.

37. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 5 36, en donde el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID N° 33, en donde el aminoácido en la posición 28 es ácido aspártico, el aminoácido en la posición 29 es glicina y la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 29 se une en forma covalente al extremo de carboxi de SEQ ID N° 33.

10

38. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el péptido comprende la secuencia de SEQ ID N° 64.

15 39. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido de glucagón comprende SEQ ID N° 20, en donde el aminoácido en la posición 20 se selecciona del grupo formado por arginina, ornitina y citrulina.

20 40. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11,

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 66),

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 67),

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 68),

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 69),

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 16),

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 17), and

NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 18),

y SEQ ID N° 55,

en donde Xaa en la posición 28 del péptido es asparagina o

5 ácido aspártico;

Xaa en la posición 29 del péptido es treonina o glicina; y

R es SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 29, COOH o CONH<sub>2</sub>.

41. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación  
10 40, en donde R es CONH<sub>2</sub>.

42. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación  
40, en donde el péptido comprende la secuencia de SEQ ID N°  
10.

15



43. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el péptido comprende la secuencia de SEQ ID N° 11.

5 44. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el péptido además comprende una cadena de polietilenglicol unida en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 16, 17, 21 o 24 o en el aminoácido de extremo de C y sales farmacéuticamente aceptables de dicho  
10 péptido de glucagón, con la condición de que cuando el péptido comprende SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12 o SEQ ID N° 13 la cadena de polietilenglicol está unida en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 17, 21 o 24, cuando el péptido comprende SEQ ID N° 14 o SEQ ID N° 15 la cadena de  
15 polietilenglicol está unida en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 16, 17 o 21, cuando el péptido comprende SEQ ID N° 55, la cadena de polietilenglicol está unida en forma covalente a una posición de aminoácido en la posición 21 o 24 y cuando el péptido comprende SEQ ID N° 16,  
20 SEQ ID N° 17 o SEQ ID N° 18 la cadena de polietilenglicol está unida en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 17 o 21.

45. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 44, en donde la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado de la gama de 1.000 a 5.000 Dalton.
- 5 46. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 44, en donde la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de 40.000 Dalton.
- 10 47. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el péptido además comprende un aminoácido adicional agregado al extremo de carboxi del péptido, dicho aminoácido adicional comprende un grupo amino en lugar del grupo ácido carboxílico de extremo del aminoácido nativo.
- 15 48. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 40, que además comprende una prolongación de péptido unido al aminoácido 29 del péptido de glucagón, dicha secuencia de aminoácido se selecciona del grupo formado por SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27 y SEQ ID N° 28.
- 20
49. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 48, en donde el aminoácido en la posición 28 es ácido aspártico, el aminoácido en la posición 29 es glicina y la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 29 está unida en forma
- 25 covalente al aminoácido 29 de dicho péptido de glucagón.

50. Un péptido de glucagón que comprende la secuencia de

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-Xaa-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 2);**

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 3);**

**NH<sub>2</sub>-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 4); y**

análogos de agonista de glucagón de SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 y  
SEQ ID N° 4, en donde R es COOH o CONH<sub>2</sub> y las cadenas laterales  
5 de un residuo de aminoácido en la posición 17, 21 o 24 o en el  
aminoácido del extremo de C de dicho péptido de glucagón  
además comprende un grupo hidrófilo unido en forma covalente  
al residuo de aminoácido, y sales farmacéuticamente aceptables  
de dicho péptido de glucagón.

10

51. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación  
50, en donde R es CONH<sub>2</sub> y dicho grupo hidrófilo es una cadena  
de polietilenglicol.

15

52. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación  
51, en donde el péptido comprende una secuencia seleccionada  
del grupo formado por SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24 y SEQ ID N°  
25.

53. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 52, en donde la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado de la gama de 1.000 a 5.000 Dalton.
- 5 54. El péptido de glucagón de acuerdo con la reivindicación 52, en donde la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de por lo menos 20.000 Dalton.
- 10 55. Un homodímero que comprende dos péptidos de glucagón de acuerdo con la reivindicación 37, unidos uno a otro a través de un ligador.
- 15 56. Una composición farmacéutica que comprende el agonista de glucagón de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de él y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 57. Un estuche para administrar un agonista de glucagón a un paciente que lo necesita, dicho estuche comprende:
- Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 56; y
- Un dispositivo para administrar dicha composición a un paciente.

58. Un método para tratar la hipoglucemia usando una composición acuosa preformulada, dicho método comprende los pasos de administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 56.

5

59. Un método para tratar la diabetes, dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26.

10 60. Un método para provocar la parálisis temporaria del tracto intestinal, dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 56

15 61. Un método para reducir el aumento de peso o para inducir la pérdida de peso, dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo formado por SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N°  
20 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, y SEQ ID N° 55, en donde el aminoácido 29 del péptido de glucagón se une a un segundo péptido a través de un enlace de péptido, y dicho segundo péptido comprende la secuencia seleccionada del grupo formado

por SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29 y  
SEQ ID N° 65.

62. Un método para reducir el aumento de peso o para inducir  
5 la pérdida de peso, dicho método comprende administrar una  
cantidad eficaz de una composición que comprende un péptido de  
glucagón de acuerdo con la reivindicación 36.

63. El método de acuerdo con la reivindicación 61, en donde el  
10 agonista de glucagón además comprende una cadena de  
polietilenglicol unida al péptido de glucagón en la posición  
17, 21 o 24 y dicha cadena de polietileno tiene un peso  
molecular seleccionado de la gama de 5.000 a 40.000 Dalton,  
con la condición de que cuando el péptido comprende SEQ ID N°  
15 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12 o SEQ ID N° 13 la cadena de  
polietilenglicol está unida en forma covalente a un residuo de  
aminoácido en la posición 16, 17, 21 o 24, cuando el péptido  
comprende SEQ ID N° 14 o SEQ ID N° 15 la cadena de  
polietilenglicol está unida en forma covalente a un residuo de  
20 aminoácido en la posición 16, 17 o 21, cuando el péptido  
comprende SEQ ID N° 55, la cadena de polietilenglicol está  
unida en forma covalente a una posición de aminoácido en la  
posición 21 o 24, y cuando el péptido comprende SEQ ID N° 16,  
SEQ ID N° 17 o SEQ ID N° 18, la cadena de polietilenglicol

está unida en forma covalente a un residuo de aminoácido en la posición 17 o 21.

64. El método de acuerdo con la reivindicación 58, en donde el  
5 agonista de glucagón además comprende una cadena de  
polietilenglicol unida al péptido de glucagón en la posición  
16, 17, 21 o 24 y dicha cadena de polietilenglicol tiene un  
peso molecular seleccionado de la gama de 5.000 a 40.000  
Dalton, con la condición de que cuando el péptido comprende  
10 SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12 o SEQ ID N° 13, la  
cadena de polietilenglicol está unida en forma covalente a una  
residuo de aminoácido en la posición 17, 21 o 24, cuando el  
péptido comprende SEQ ID N° 14 o SEQ ID N° 15 la cadena de  
polietilenglicol está unida en forma covalente a un residuo de  
15 aminoácido en la posición 16, 17 o 21, y cuando el péptido  
comprende SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 o SEQ ID N° 18 la cadena  
de polietilenglicol está unida a un residuo de aminoácido en  
la posición 17 o 21.

20 65. Un péptido de glucagón que comprende una secuencia  
seleccionada de las secuencias designadas por SEQ ID N° 70 a  
SEQ ID N° 514.

**RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

Se revelan péptidos de glucagón modificado que tienen potencia mejorada en el receptor de glucagón en relación con el glucagón nativo. Otra modificación de los péptidos de glucagón mediante la formación de puentes de lactona o la sustitución del ácido carboxílico de extremo con un grupo amida produce péptidos que presentan actividad de coagonista de receptor de glucagón/GLP-1. La solubilidad y la estabilidad de estos análogos de glucagón de alta potencia puede mejorarse adicionalmente mediante la modificación de los polipéptidos mediante la pegilación, sustitución de aminoácidos de extremo de carboxi, o el agregado de un péptido de extremo de carboxi seleccionado del grupo formado por SEQ ID N°: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID N° 26 (K-RNRNNIA) y SEQ ID N° 28 (KRNR).



## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DIMARCHI, RICHARD  
 CHABENNE, JOE  
 DIMARCHI, MARIA  
 DAY, JONATHON  
 PATTERSON, JAMES  
 SMILEY, DAVID

<120> COAGONISTAS DE RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1

<130> 29920-204749

<140>

<141>

<150> 60/890.087

<151> 15-02-2007

<150> 60/938.565

<151> 17-05-2007

<160> 533

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Ser | Gln | Gly | Thr | Phe | Thr | Ser | Asp | Tyr | Ser | Lys | Tyr | Leu | Asp | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Arg | Ala | Gln | Asp | Phe | Val | Gln | Trp | Leu | Met | Asn | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Análogo de Glucagón Sintético

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Arg, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Met, Leu o Nle

<400> 2  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

<210> 3  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Análogo de glucagón sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Asp, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Met, Leu o Nle

<400> 3  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

<210> 4  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Análogo de glucagón artificial

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Gln, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Met, Leu o Nle

<400> 4  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

<210> 5  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Análogo de glucagón sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Asp, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Gln, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Met, Leu o Nle

<400> 5  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

<210> 6  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Análogo de glucagón sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Asp, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Met, Leu o Nle

<400> 6  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

<210> 7  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Análogo de Glucagón sintético

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Gln, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Met, Leu o Nle

<400> 7  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

<210> 8  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuenci Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Análogo de glucagón sintético

<220>

Figura 1: Estabilidad de Glucag 'n Cys21-maleimid PEG5K (37°C)

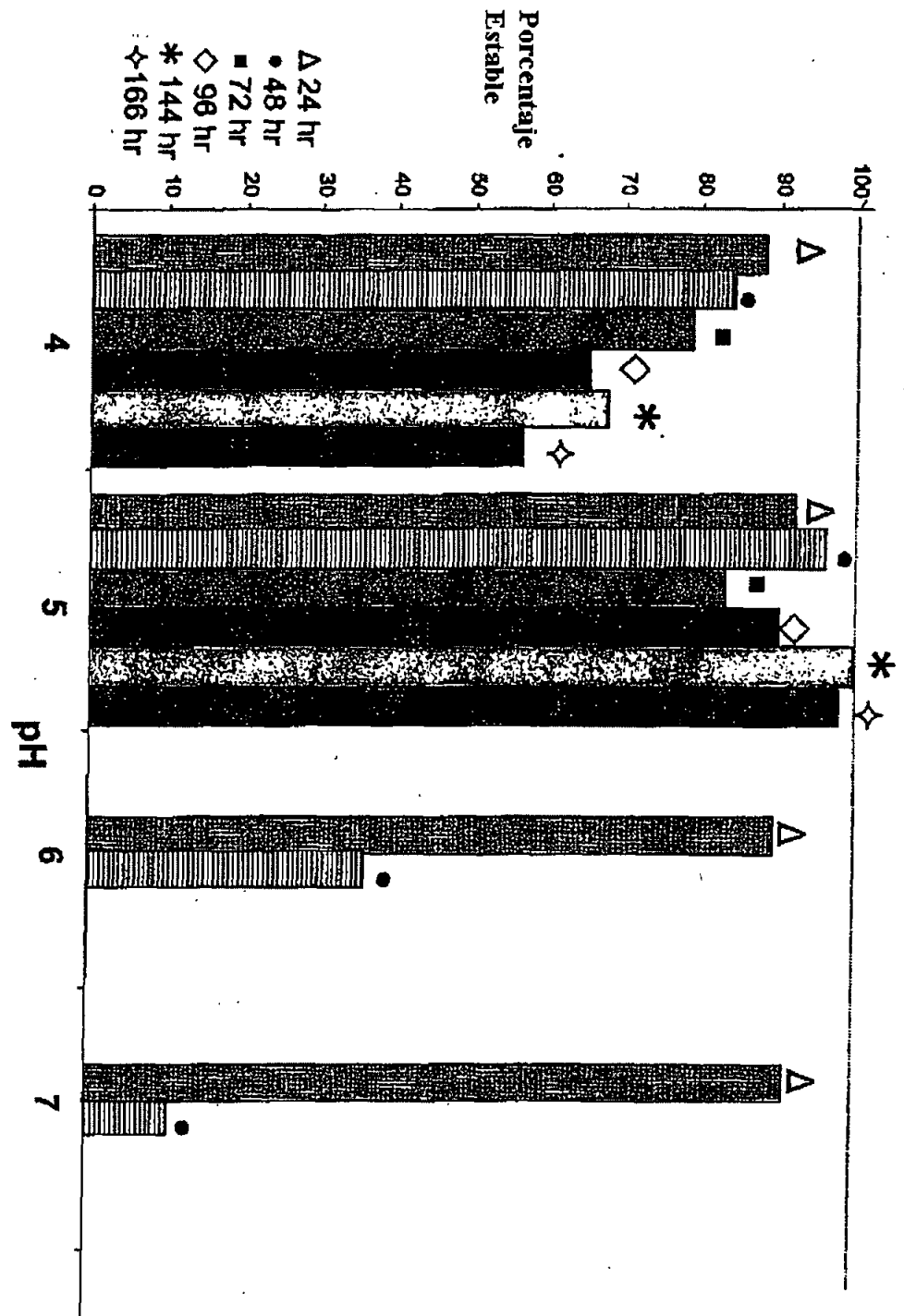


Figura 2: Análisis de HPLC de Glucagón Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub> a pH 5 (37°C)

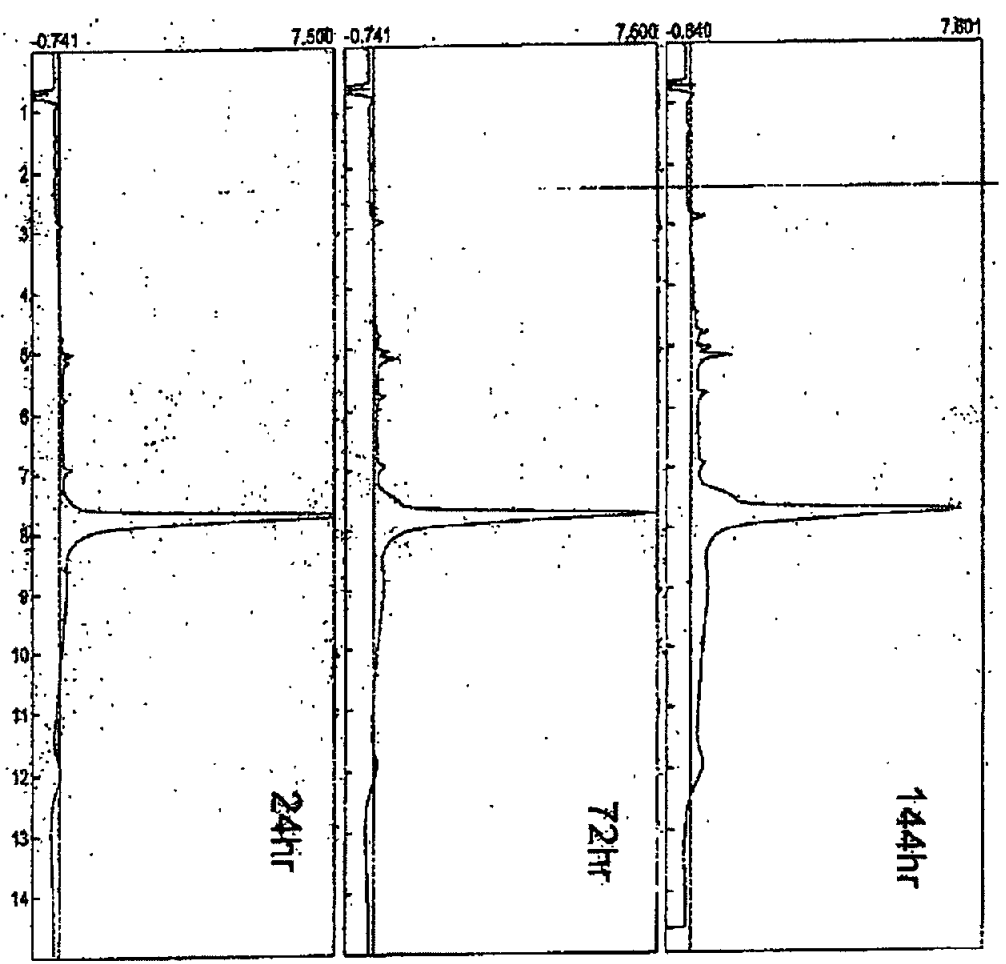


Figura 3. Inducción de cAMP mediada por el Receptor de Glucagón

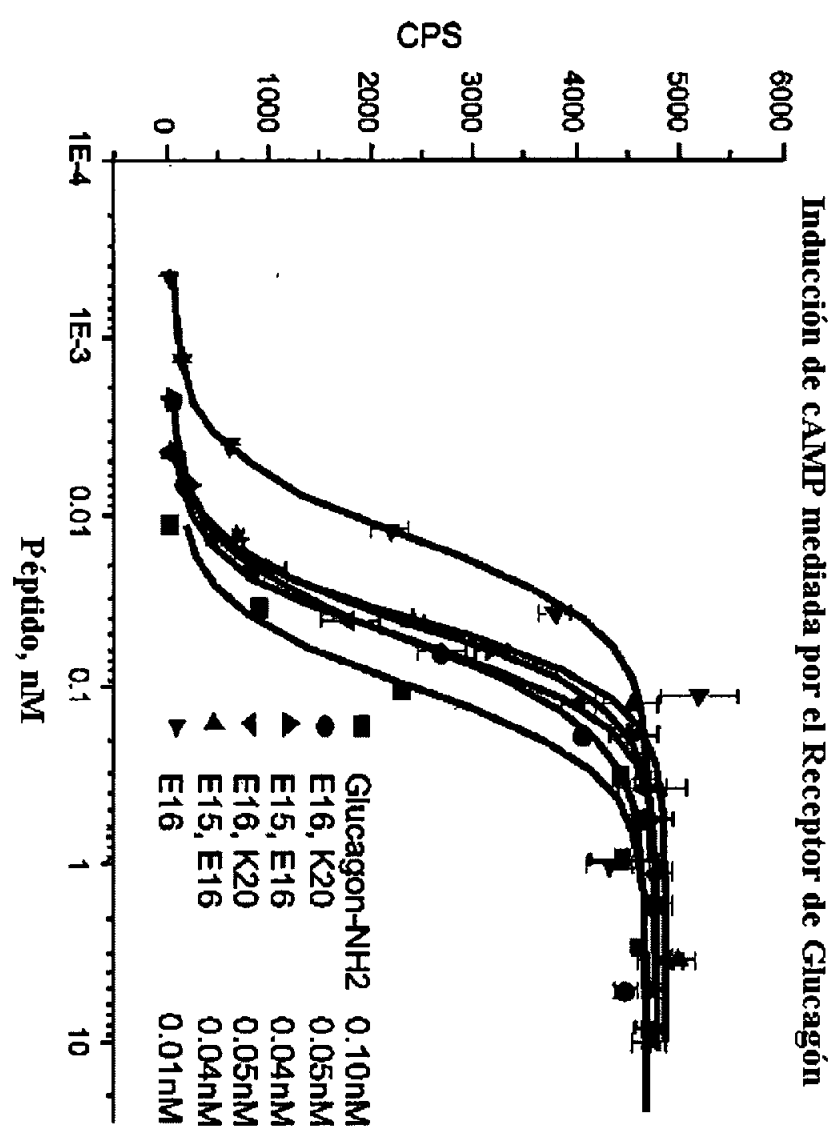


Fig. 4A

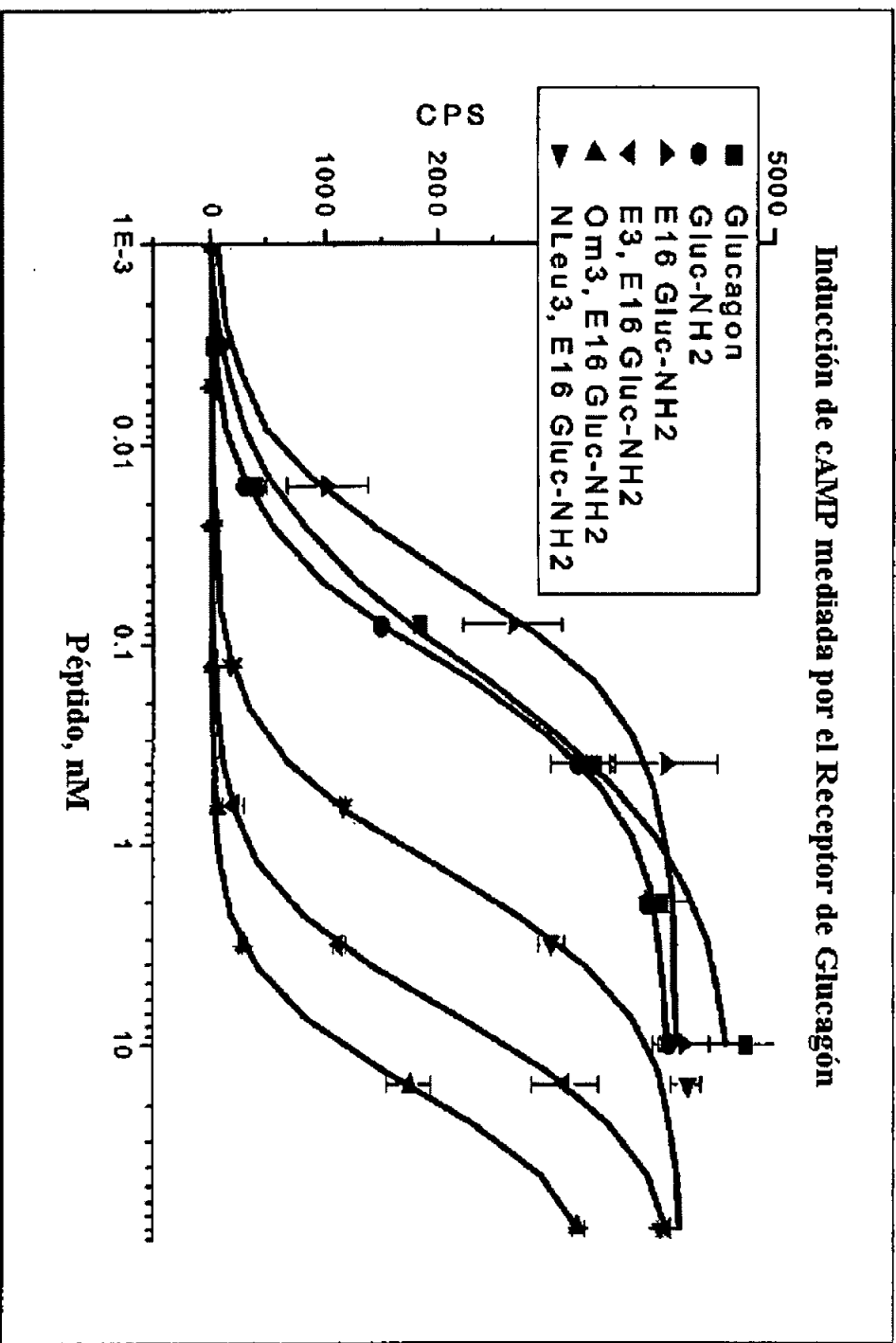




Fig. 4B

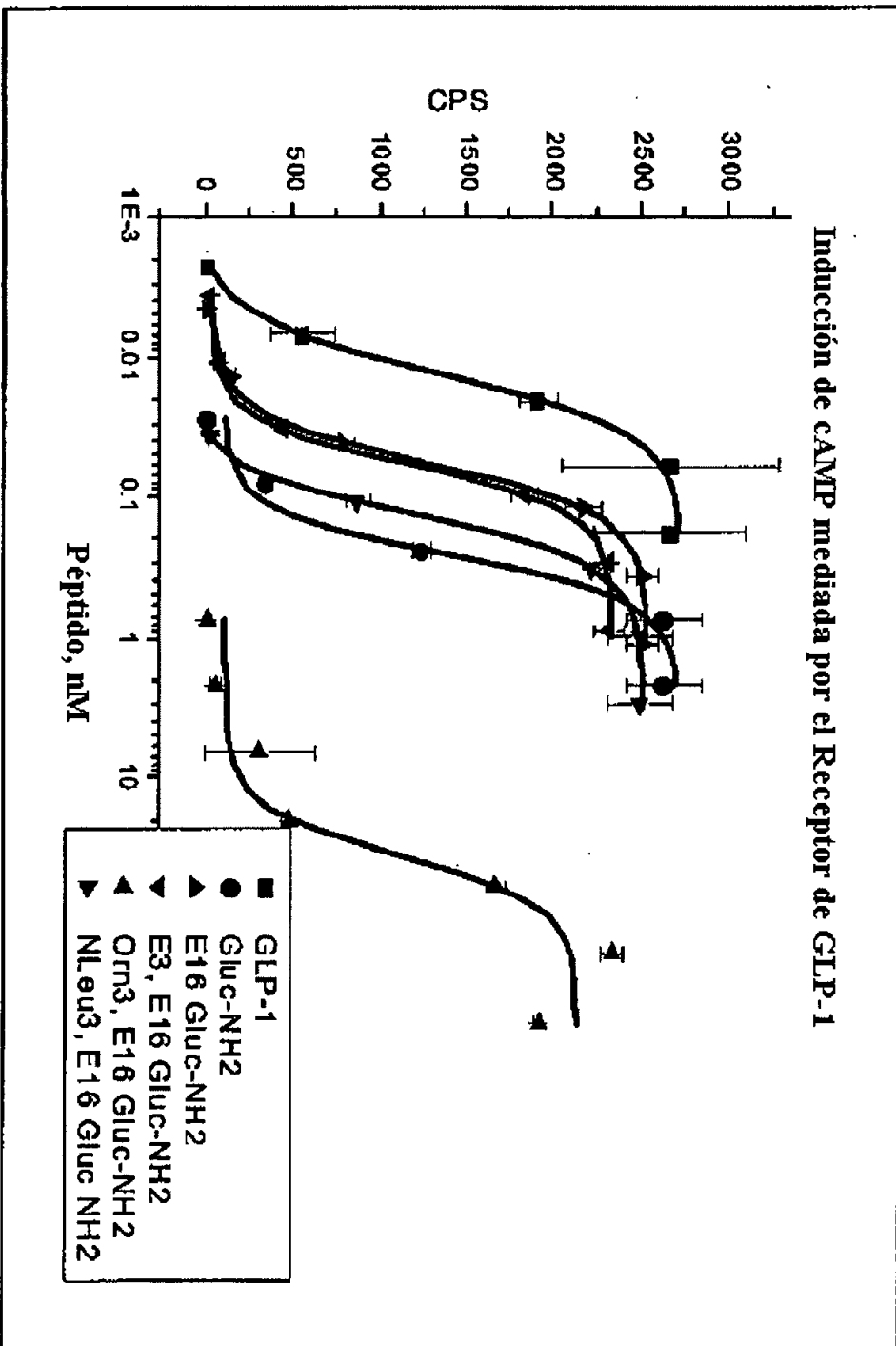


Fig. 5A

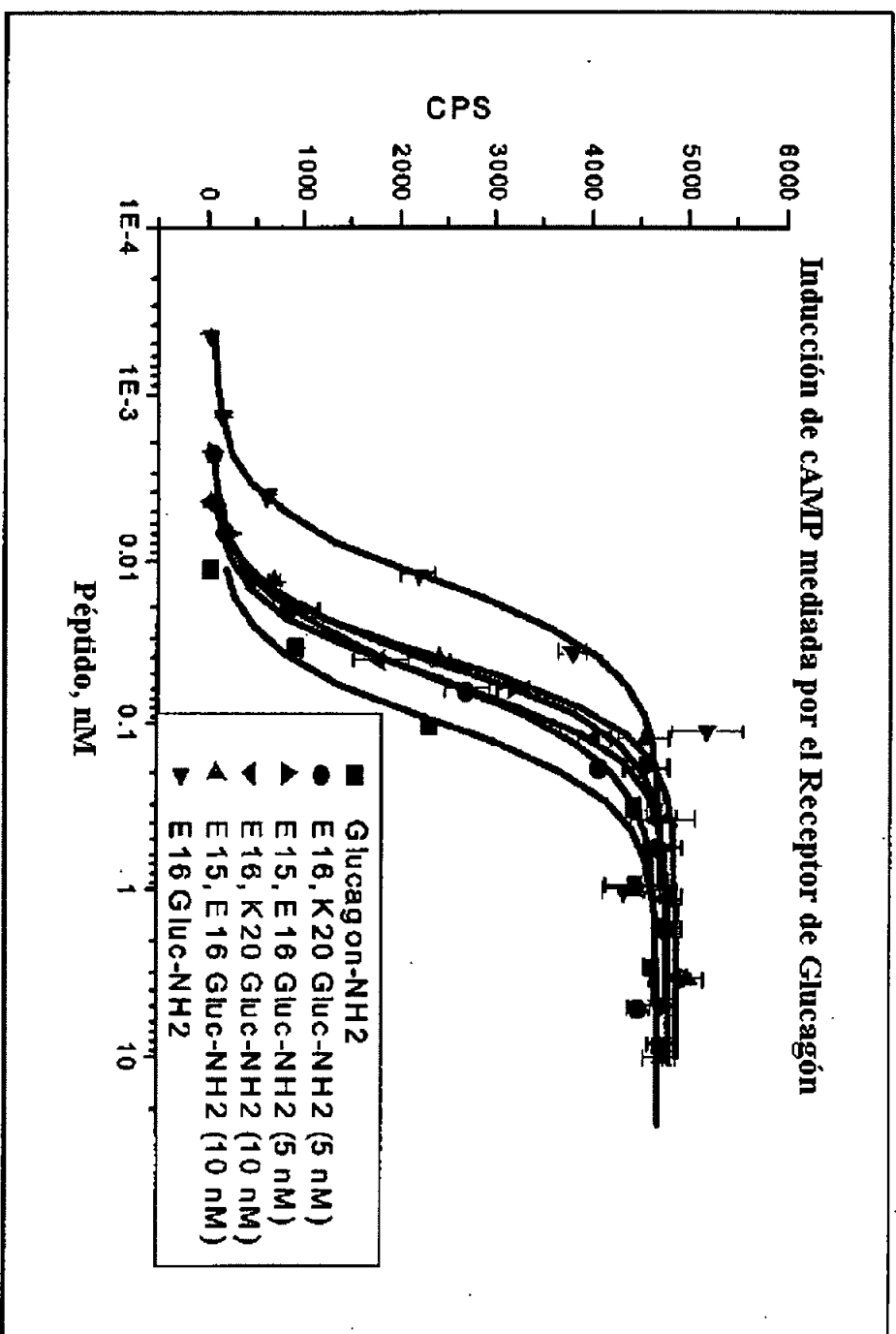


Fig. 5B

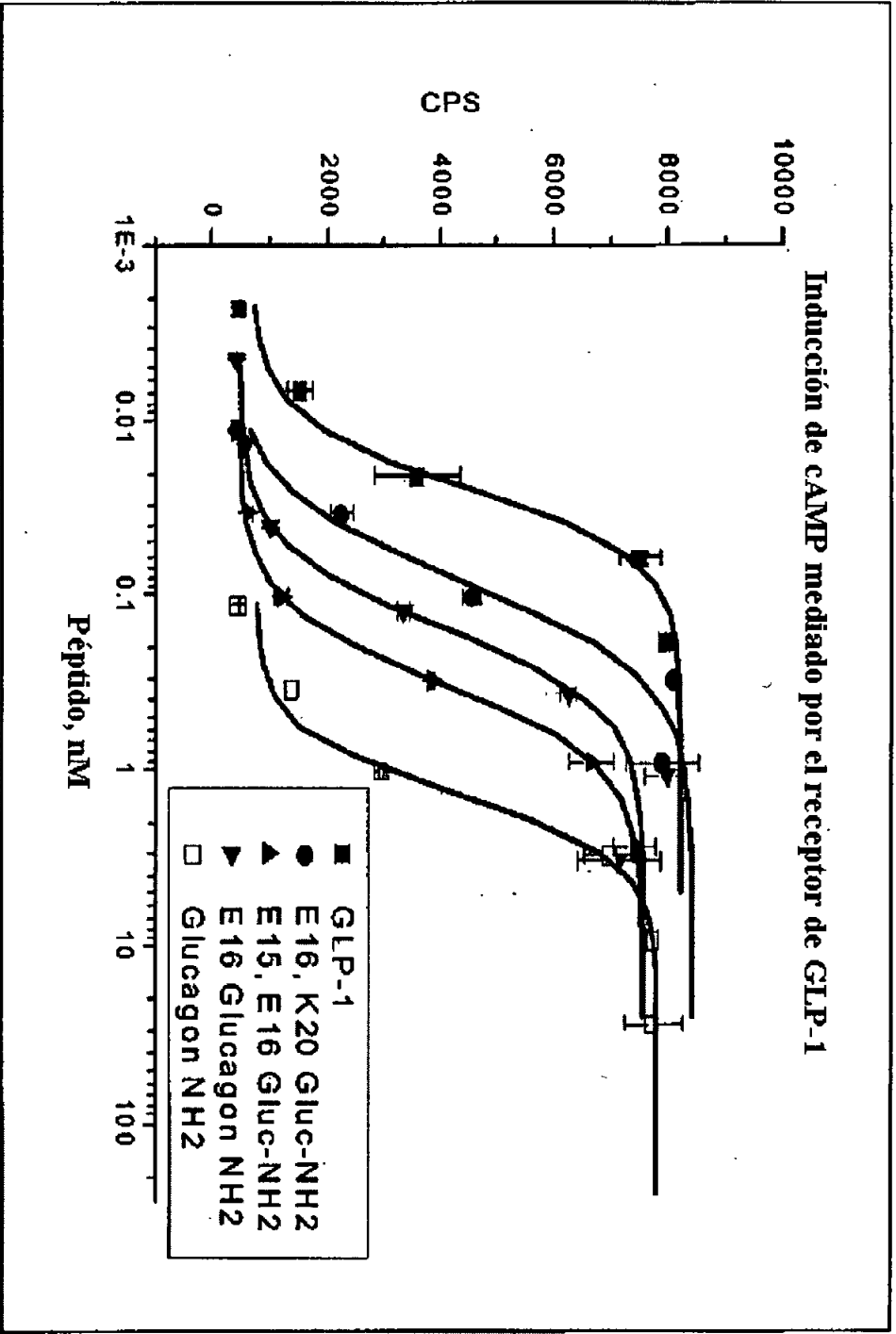


Fig. 6A

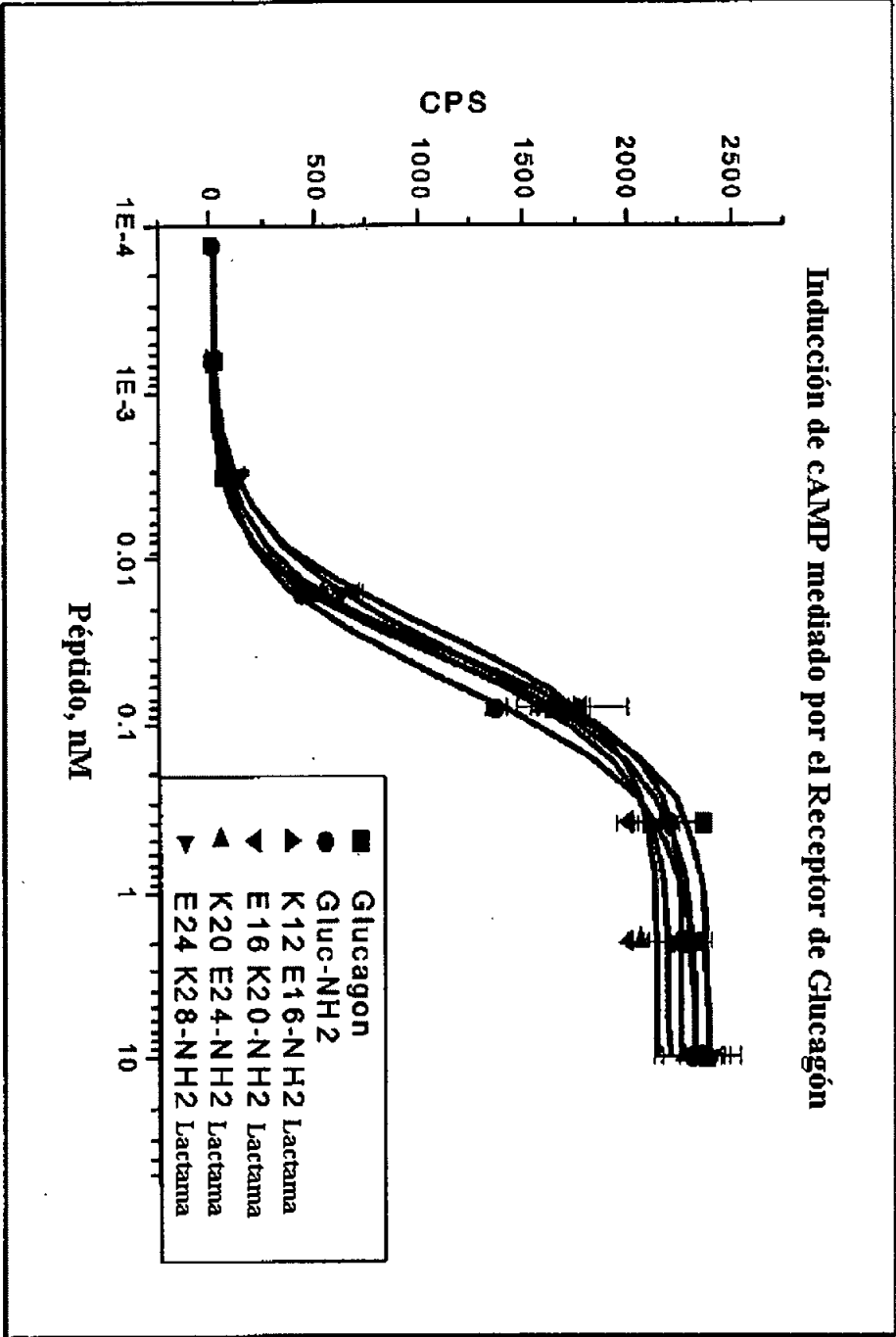


Fig. 6B

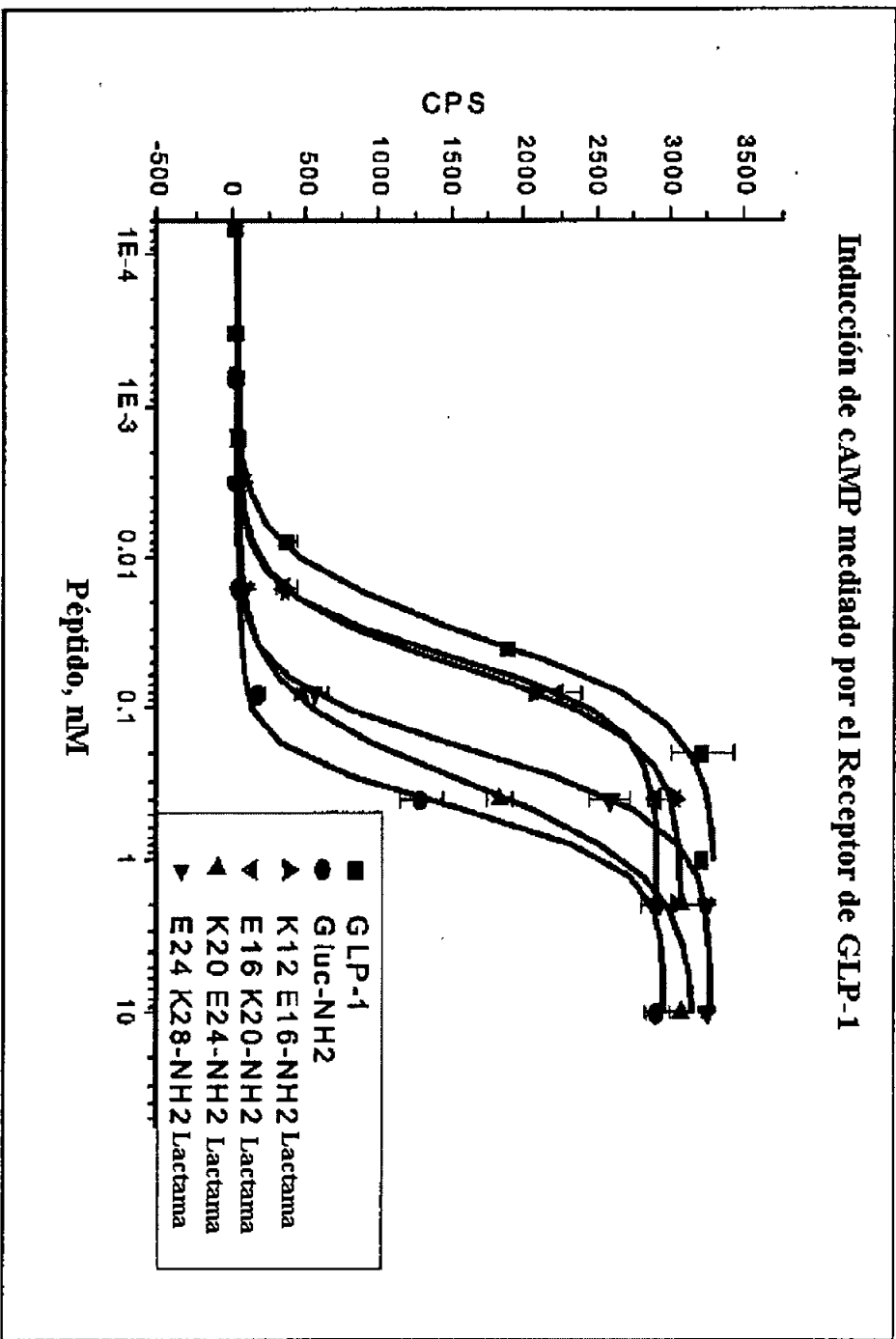


Fig. 7A

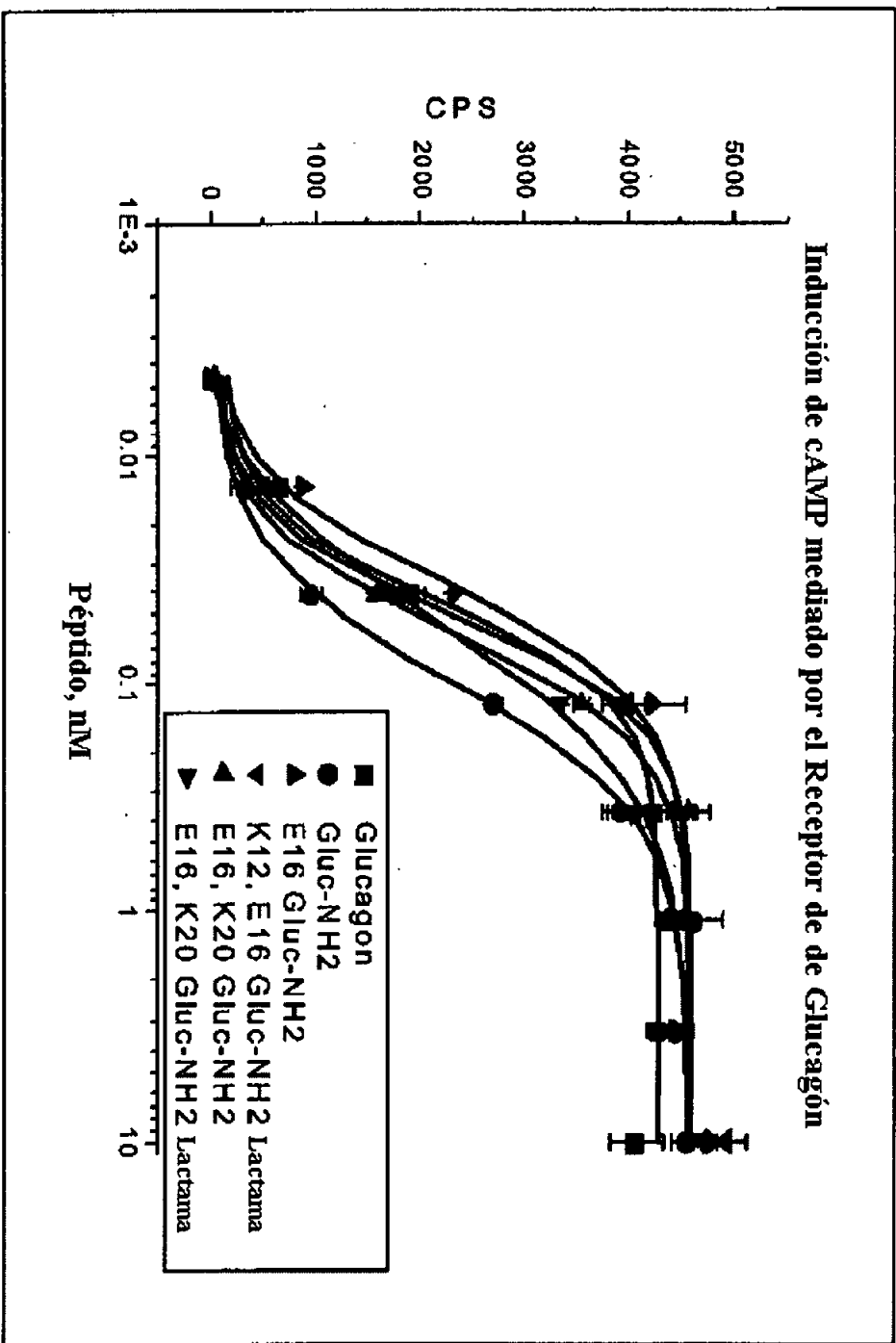


Fig. 7B

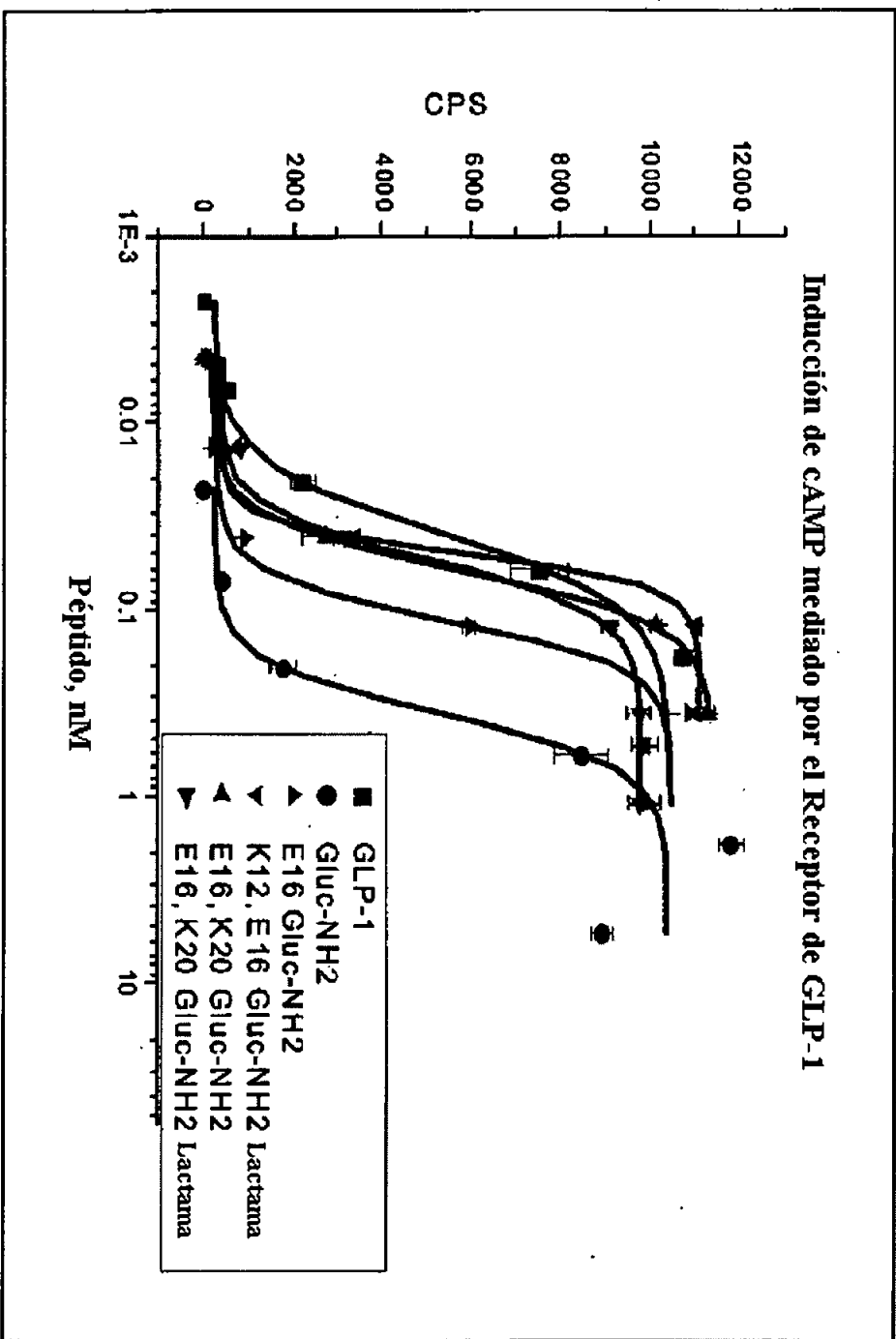


Figura 8A: Modificación de Posición 18 y de extremo de C de Glucagón

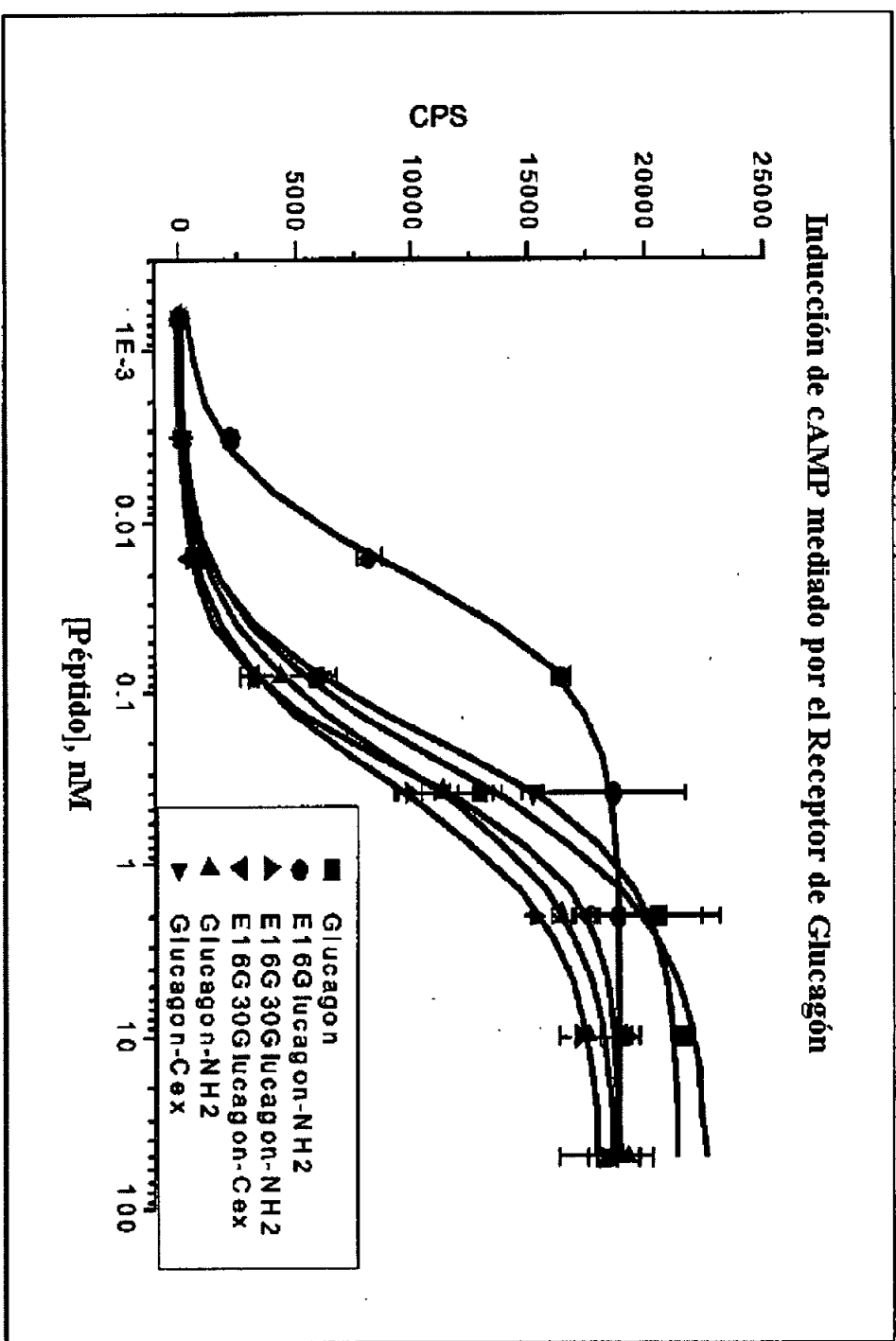






Figura 8C: Sustituciones en Posición 16 de Glucagón

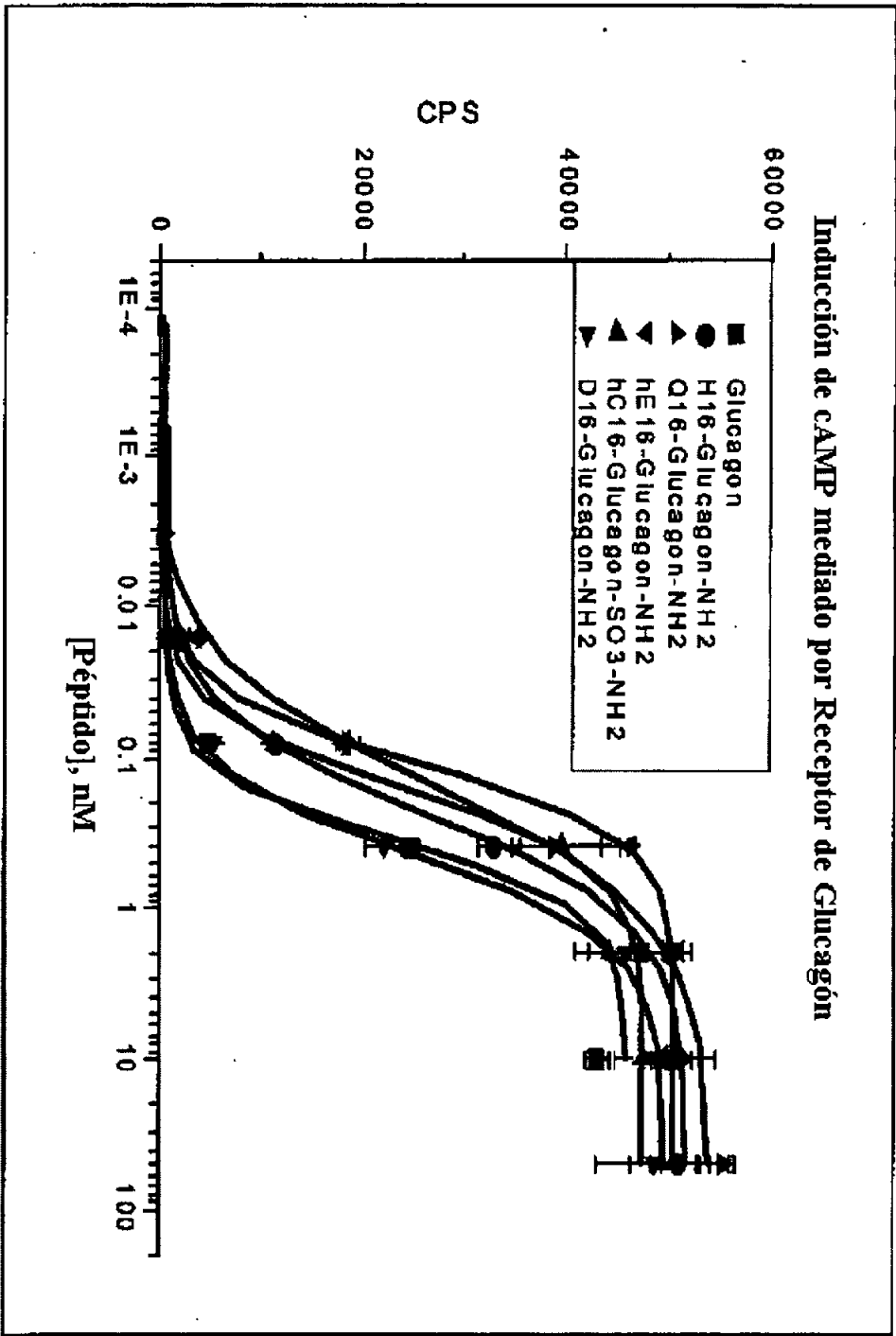


Figura 8D : Sustituciones en Posición 16 de Glucagón

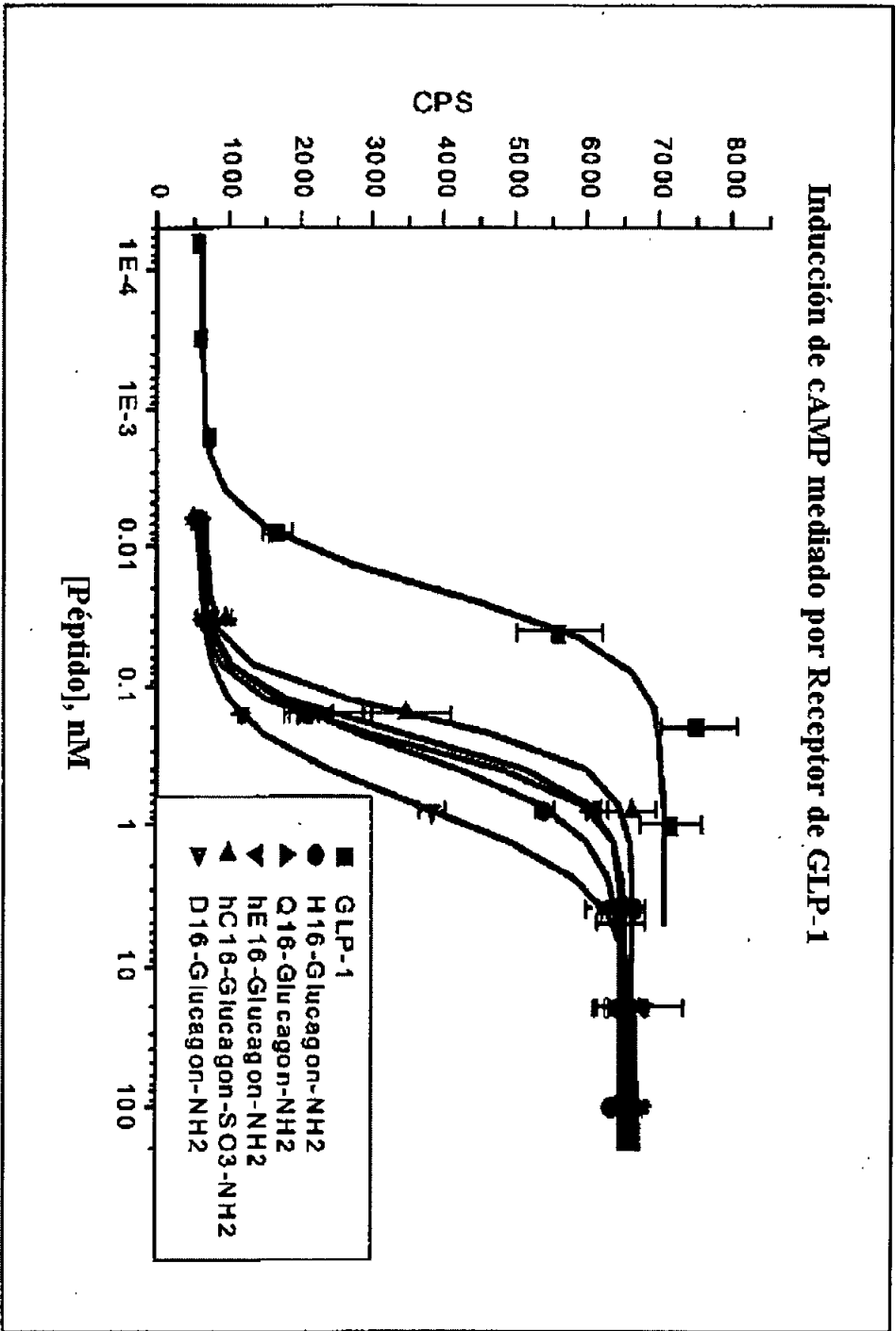


Figura 8E: Sustituciones en Posición 16 de Glucagón

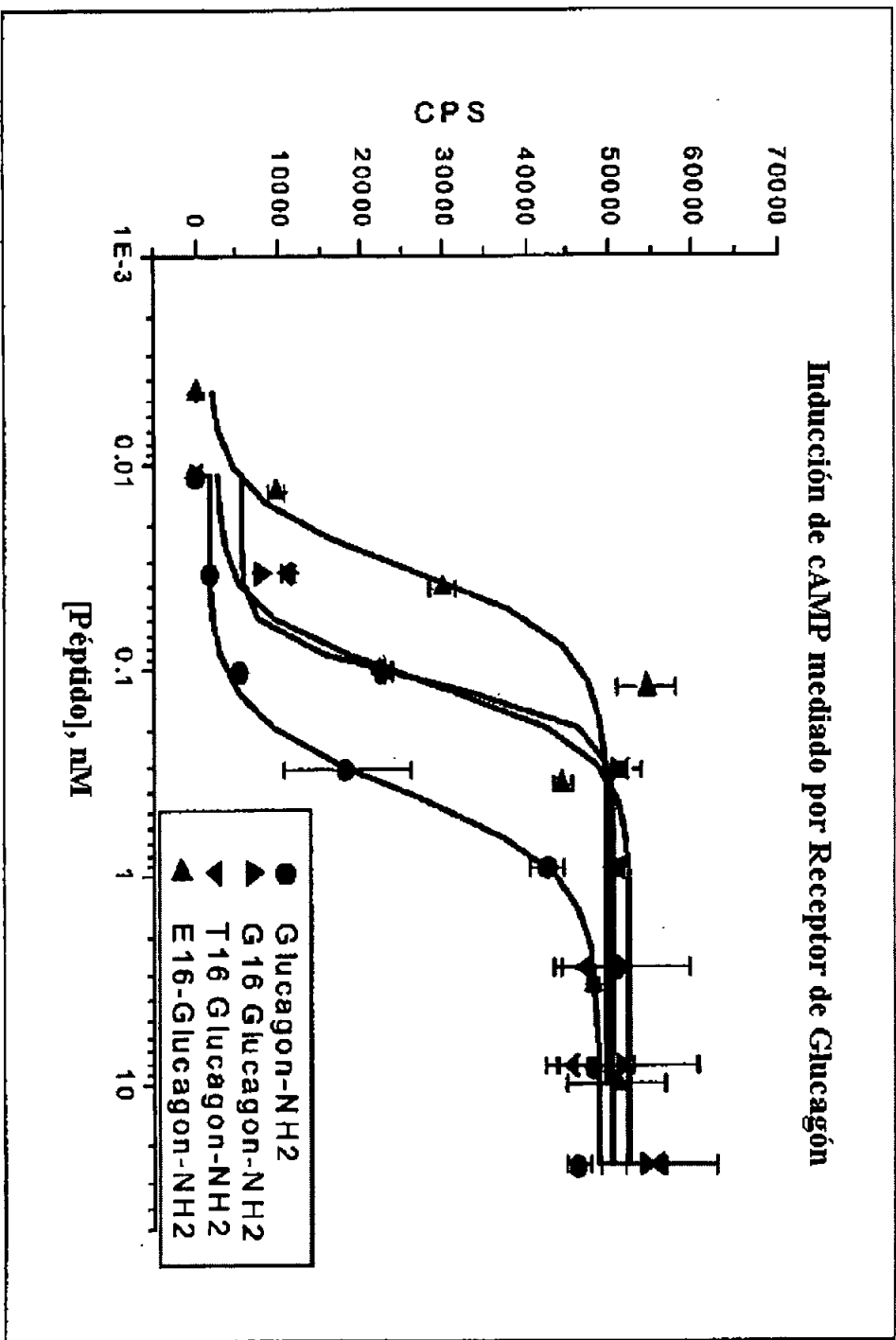


Figura 8F: Sustituciones en Posición 16 de Glucagón

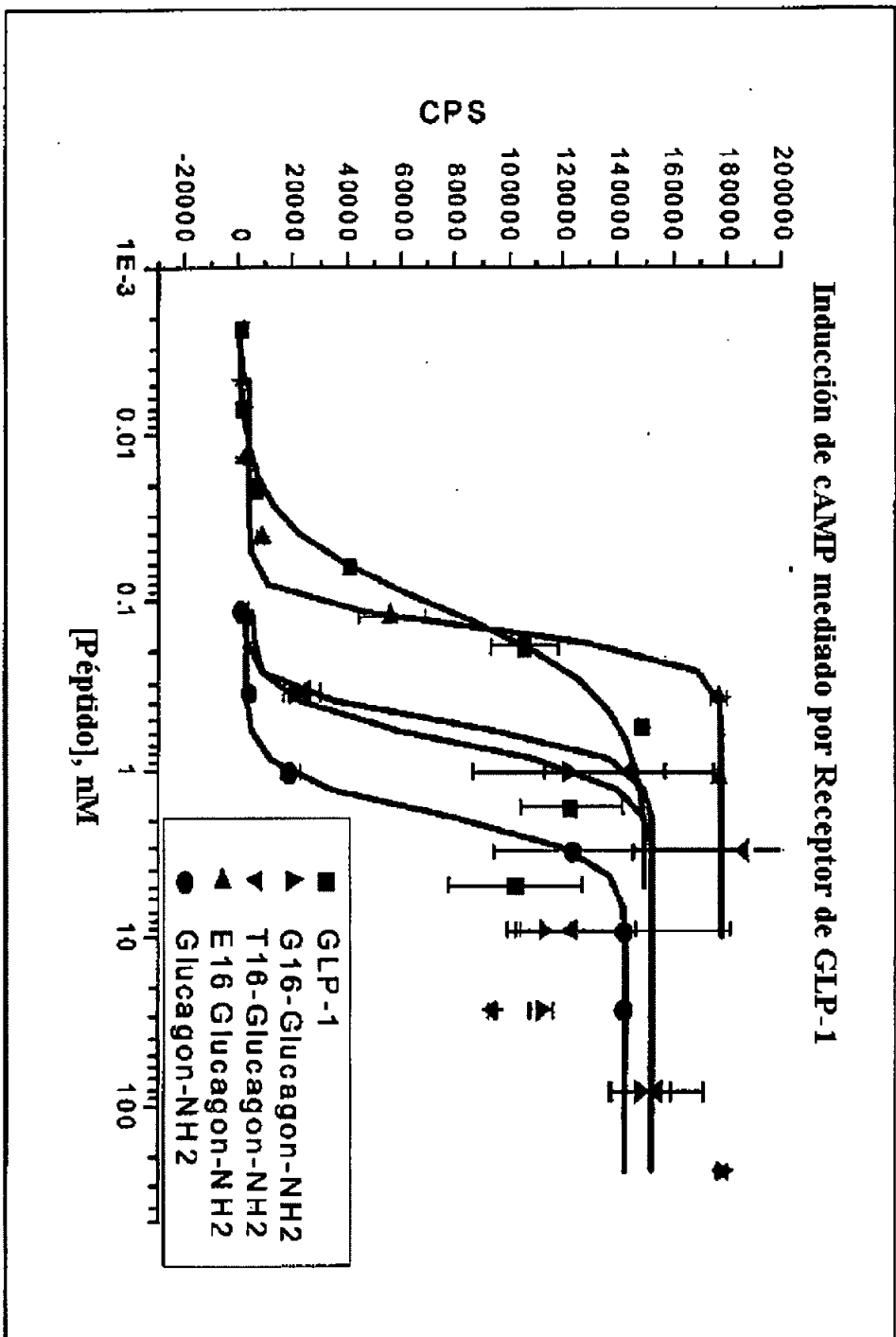


Figura 9A: Inductor de cAMP por Análogos de GLP-1 17-26 Glucagón

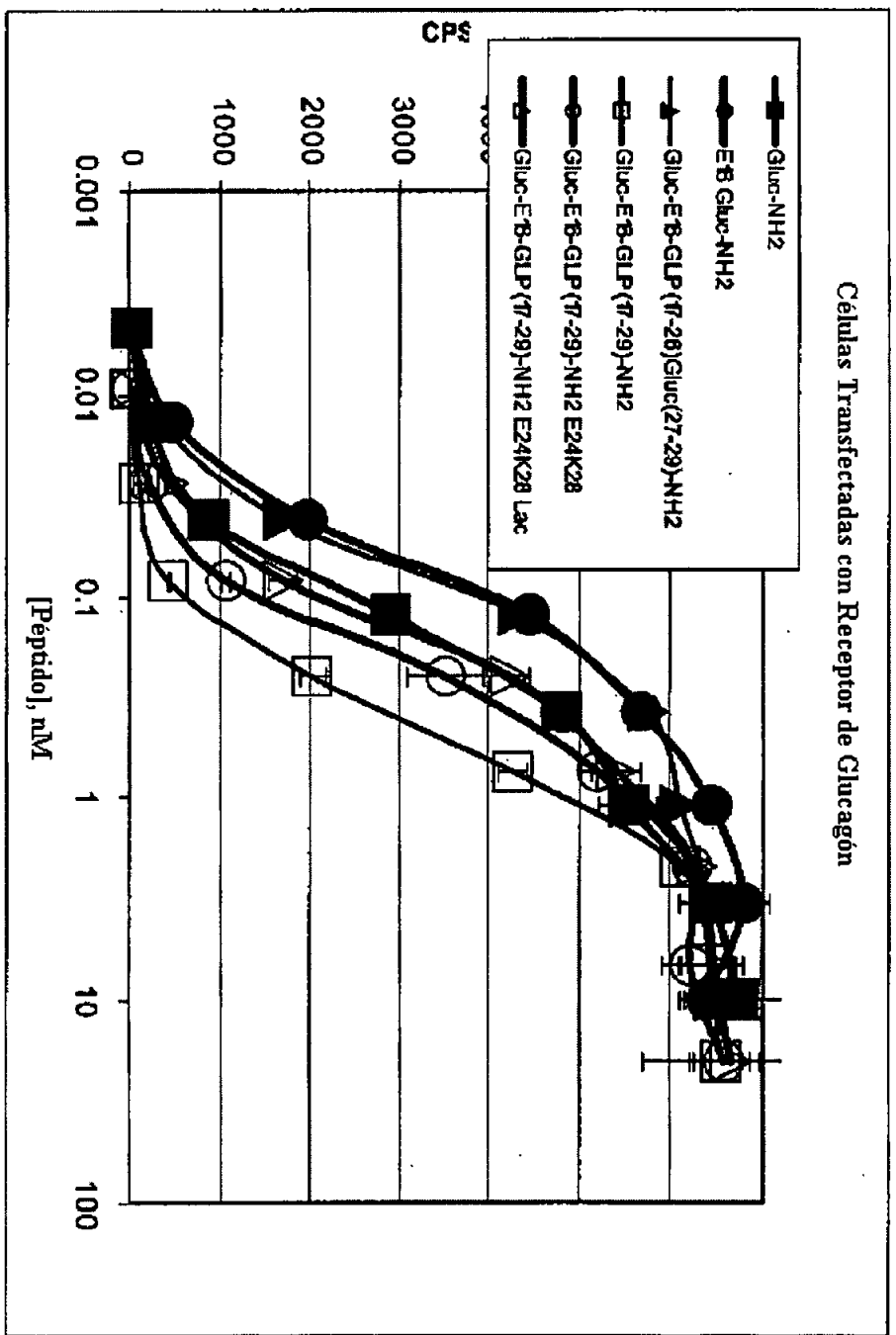
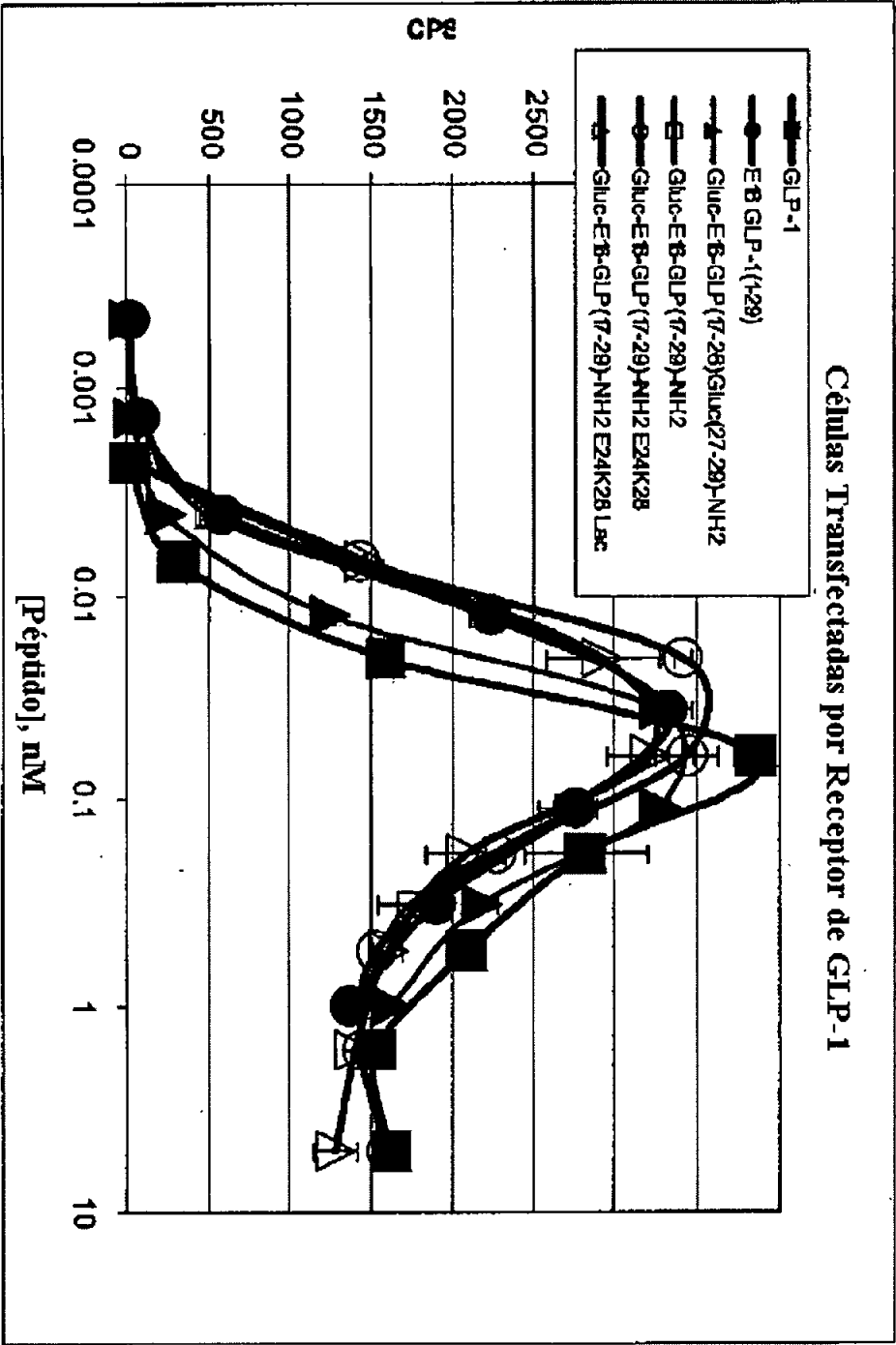


Figura 9B: Inducción de cAMP por Análogos de GLP-1 17-26 Glucagón



Cambio en Peso Corporal

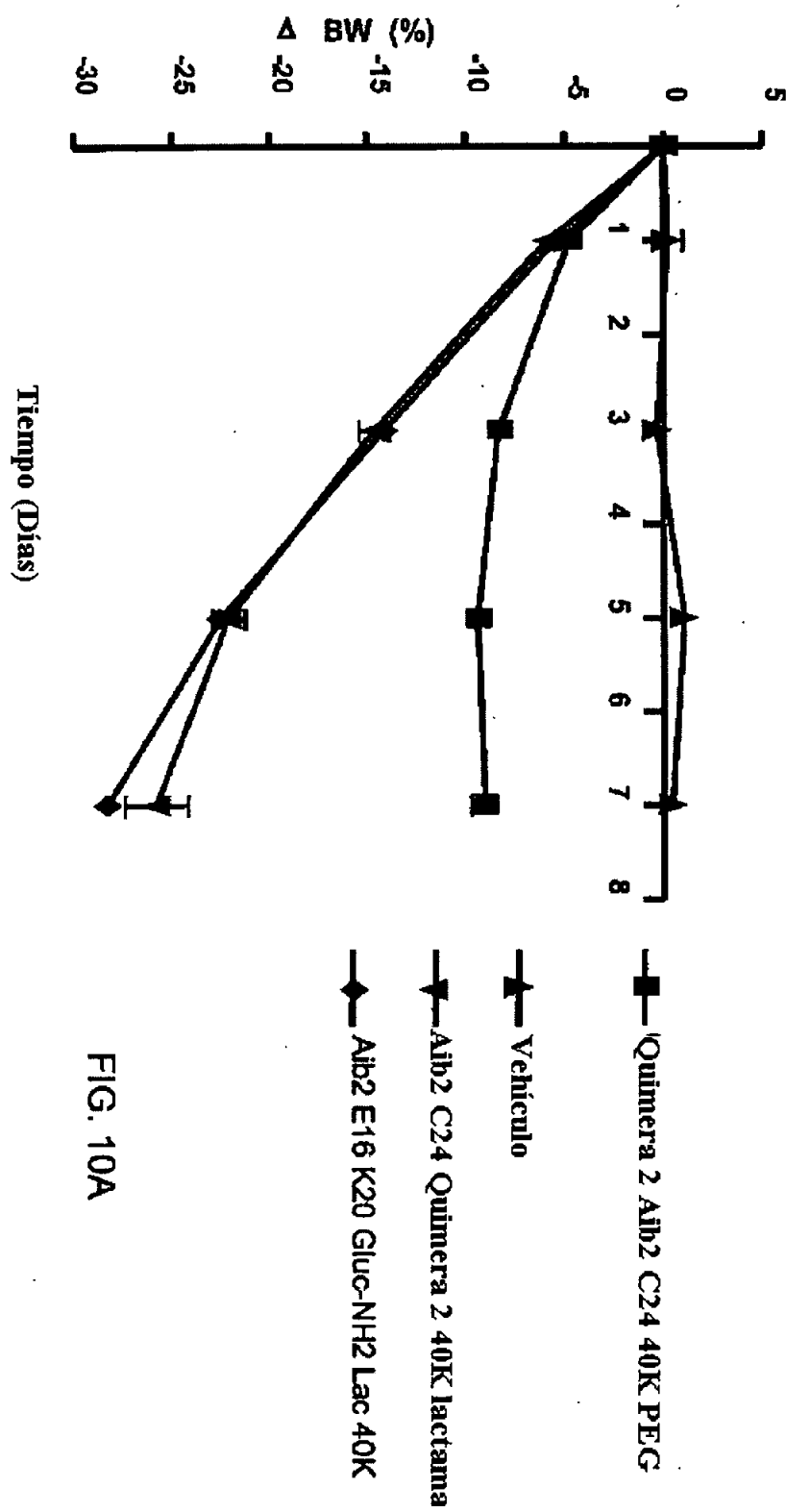


FIG. 10A

- Inyección de QW Subcutánea (325 nmol/kg)
- N= 8 ratones DIO por grupo con peso promedio inicial de 51 g



Cambio en Peso Corporal

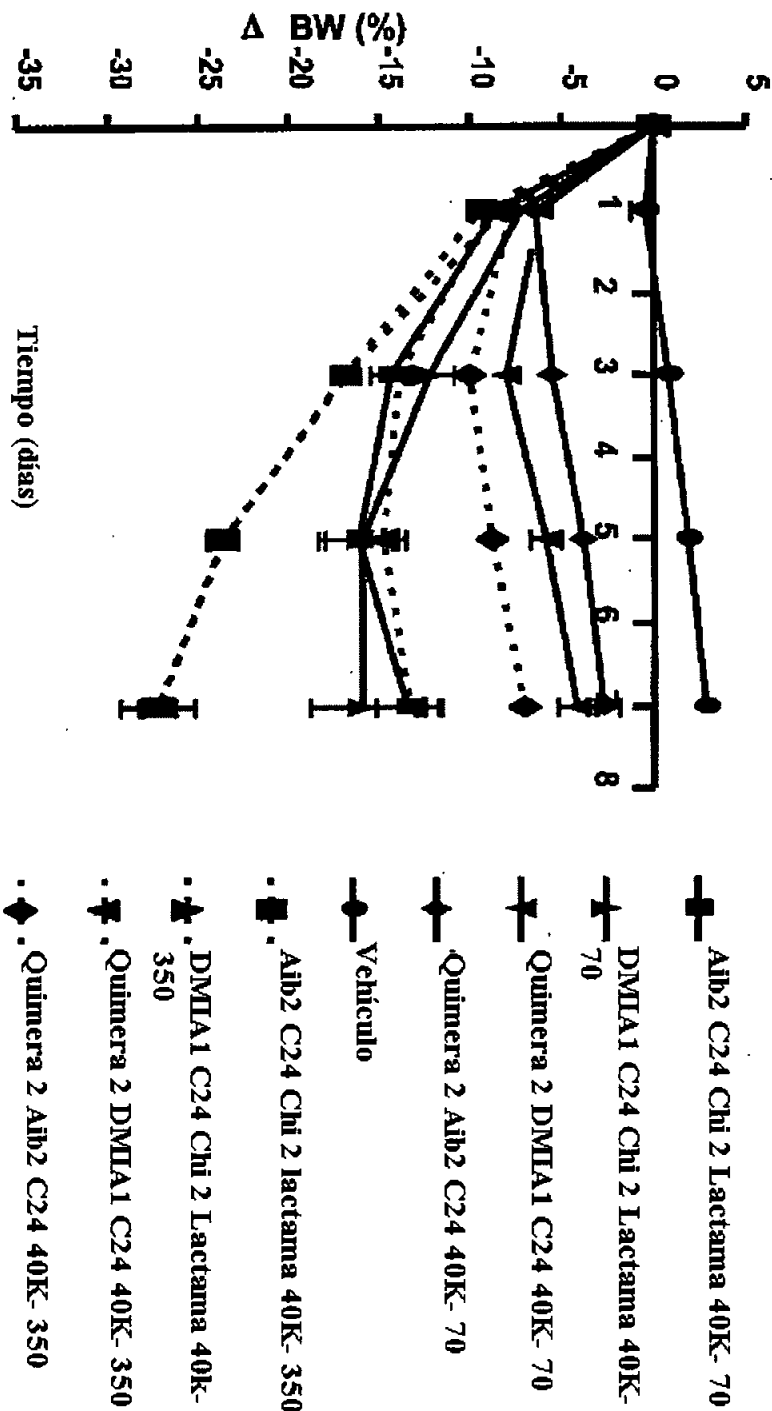


FIG. 10B

- Inyección de QW Subcutánea (70 o 350 nmol/kg)
- N= 8 ratones DIO por grupo con peso promedio inicial de 44 g

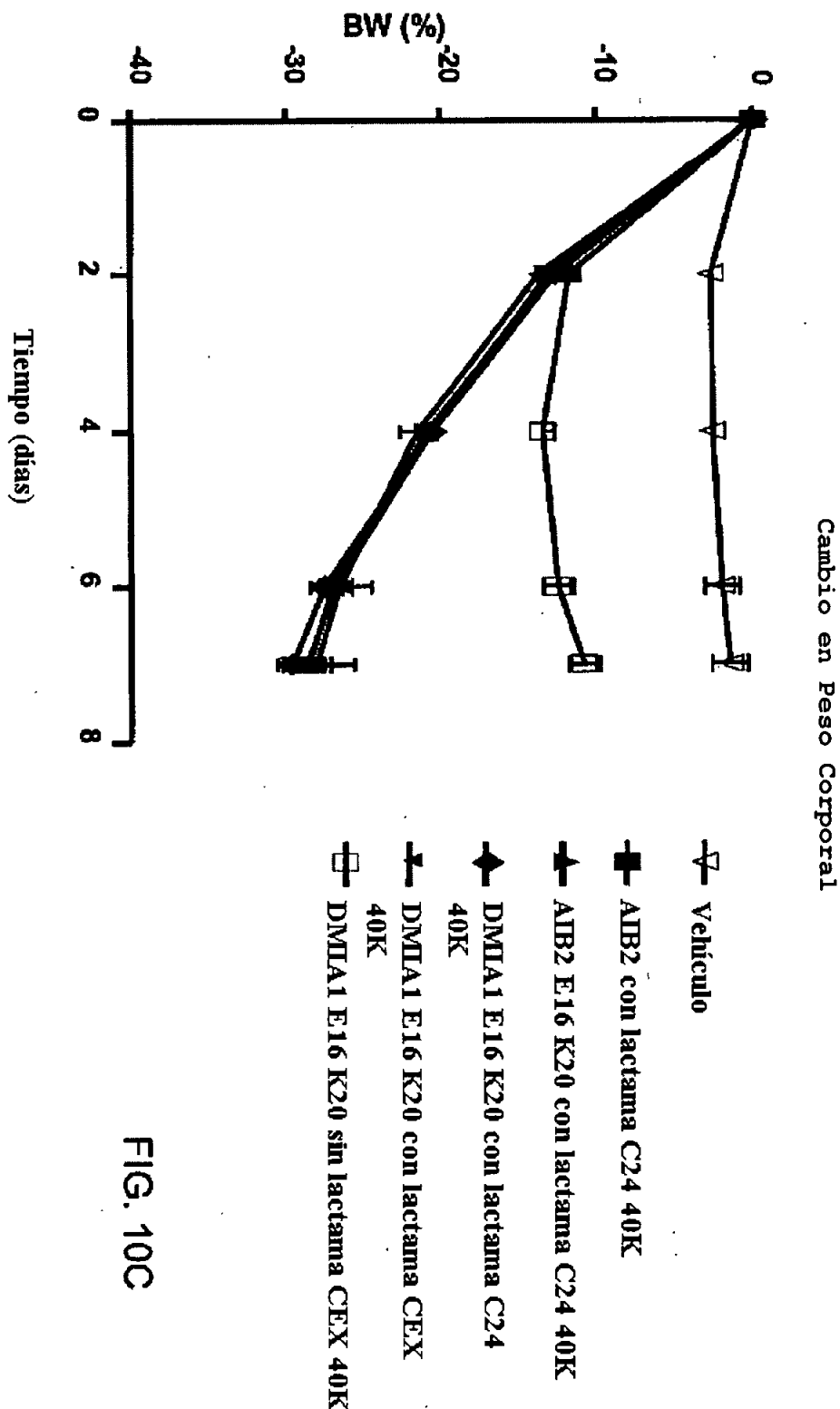


FIG. 10C

- Inyección de QW Subcutánea (QW= 280 nmol/kg)
- N= 8 ratones DIO por grupo con peso promedio inicial de 53 g

Cambio en Peso Corporal

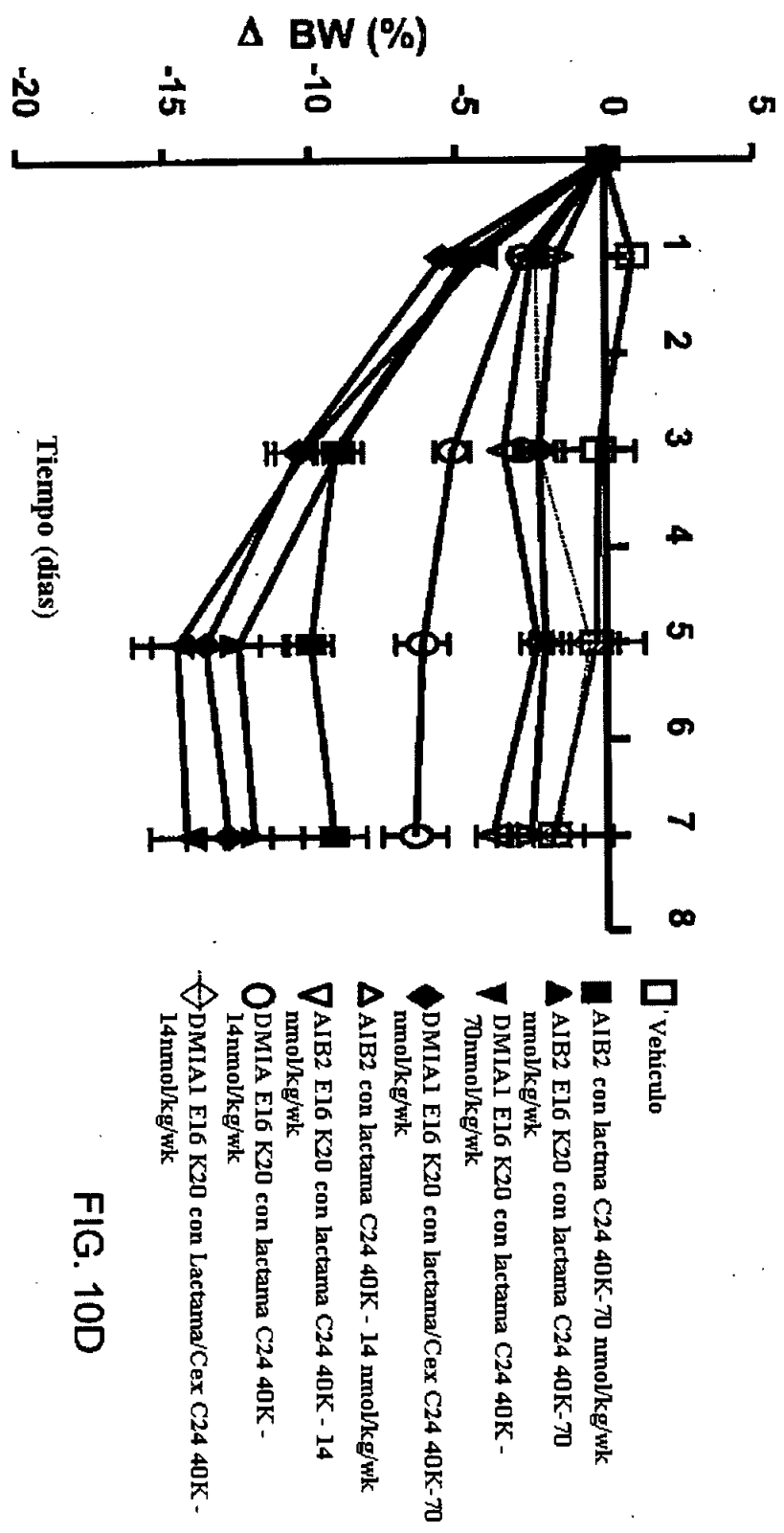


FIG. 10D

- Inyección de QW Subcutánea (QW= 70 nmol/kg/wk o 14 nmol/kg/wk)
- N= 8 ratones DIO por grupo con peso promedio inicial de 44,3 g

Cambio en Peso Corporal

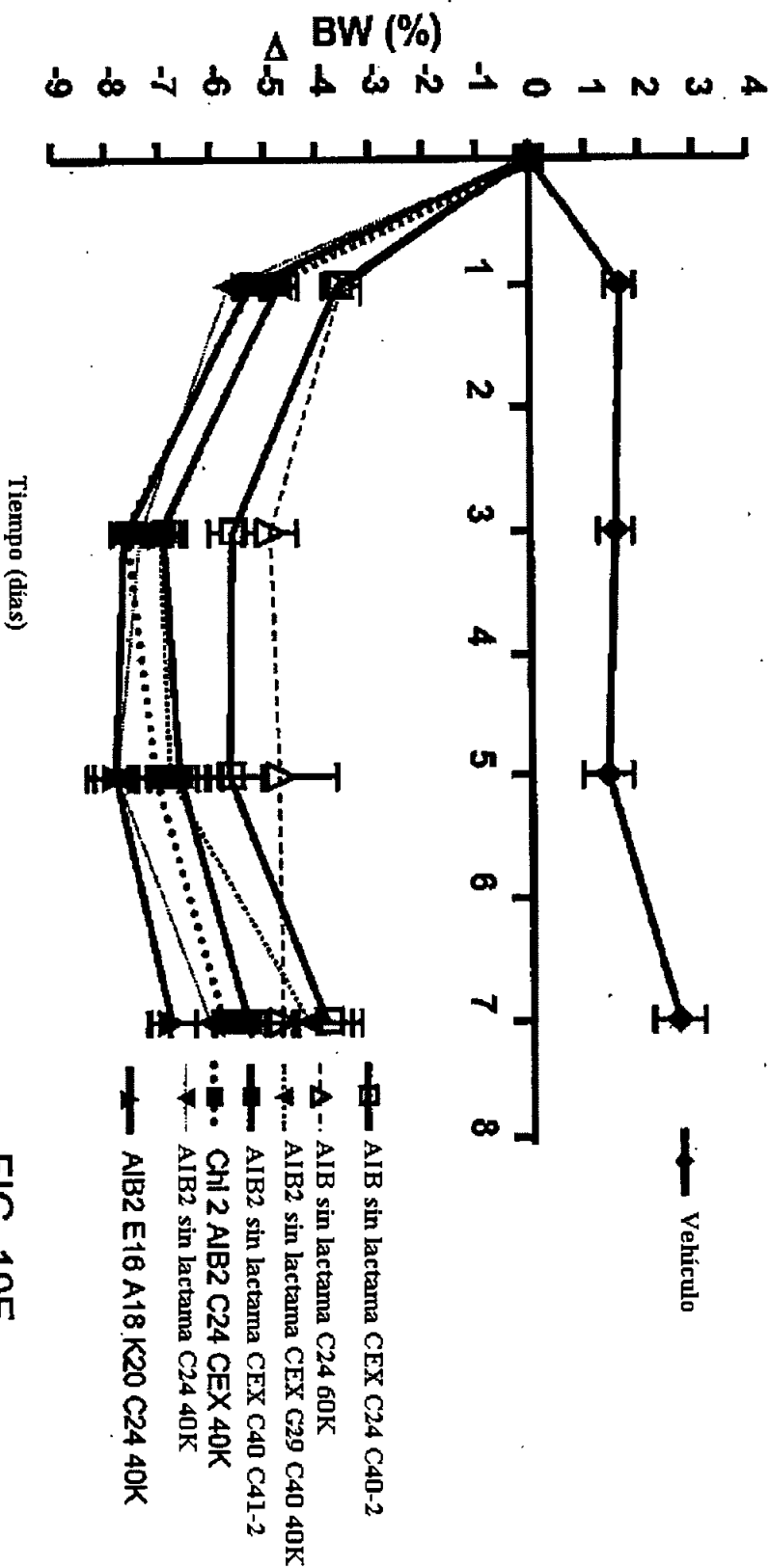


FIG. 10E

- Inyección de QW Subcutánea (QW= 70 nmol/kg/wk)
- N= 8 ratones DIO por grupo con peso promedio inicial de 46,3 g



# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

|                                                                            |              |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------|
| For receiving Office use only                                              |              |
| PCT/US08/53857                                                             |              |
| International Application No.                                              |              |
| 13 FEB 2008 (13.02.08)                                                     |              |
| International Filing Date                                                  |              |
| PCT INTERNATIONAL APPLICATION RO/US                                        |              |
| Name of receiving Office and "PCT International Application"               |              |
| Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) | 29920-204749 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Box No. I TITLE OF INVENTION                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                    |
| GLUCAGON/GLP-1 RECEPTOR CO-AGONISTS                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                    |
| Box No. II APPLICANT <input type="checkbox"/> This person is also inventor                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                    |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)     |                                                    |
| INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION<br>351 West 10th Street<br>Indianapolis, IN 46202<br>US                                                                                                                                                                                                              | Telephone No.<br>317-274-5903                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Facsimile No.<br>317-274-5902                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Applicant's registration No. with the Office       |
| State (that is, country) of nationality:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                                              | State (that is, country) of residence:<br>US       |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box |                                                    |
| Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.                                                                                                                                                                                                    |                                                    |
| Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                    |
| The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative                                                                                   |                                                    |
| Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)                                                                                                                                                            |                                                    |
| ADDISON, Bradford G.<br>BARNES & THORNBURG LLP<br>11 South Meridian Street<br>Indianapolis, IN 46204<br>US                                                                                                                                                                                                                  | Telephone No.<br>317-231-7253                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Facsimile No.<br>317-231-7433                      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Agent's registration No. with the Office<br>41,486 |
| <input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.                                                                            |                                                    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>DAY, Jonathan<br/>1331 South Adams Street, Apt. 11<br/>Bloomington, IN 47402<br/>US</p> | <p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
| State <i>(that is, country)</i> of nationality:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | State <i>(that is, country)</i> of residence:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <p>This person is applicant <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental</p>                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>PATTERSON, James<br/>890 East Columbus Street<br/>Martinsville, IN 46151<br/>US</p>     | <p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
| State <i>(that is, country)</i> of nationality:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | State <i>(that is, country)</i> of residence:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <p>This person is applicant for the <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental</p>                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>CHABENNE, Joseph<br/>13505 East 114th Street<br/>Fishers, IN 46037<br/>US</p>           | <p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
| State <i>(that is, country)</i> of nationality:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | State <i>(that is, country)</i> of residence:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <p>This person is applicant for the <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental</p>                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p>Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i></p> <p>DIMARCHI, Maria<br/>10890 Wilmington Drive<br/>Carmel, IN 46033<br/>US</p>              | <p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i></p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
| State <i>(that is, country)</i> of nationality:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | State <i>(that is, country)</i> of residence:<br>US                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <p>This person is applicant for the <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental</p>                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

| <b>Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)</b><br><i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><small>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</small></p> <p>SMILEY, David<br/>3823 South Laura Way<br/>Bloomington, IN 47401<br/>US</p>     | <p><b>This person is:</b></p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
| <p>State (that is, country) of nationality:<br/>US</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <p>State (that is, country) of residence:<br/>US</p>                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <p>This person is applicant <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental</p>                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p><small>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</small></p> <p>DIMARCHI, Richard D.<br/>10890 Wilmington Drive<br/>Carmel, IN 46033<br/>US</p> | <p><b>This person is:</b></p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
| <p>State (that is, country) of nationality:<br/>US</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <p>State (that is, country) of residence:<br/>US</p>                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <p>This person is applicant for the <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental</p>                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p><small>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</small></p>                                                                                    | <p><b>This person is:</b></p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p>            |
| <p>State (that is, country) of nationality:</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p>State (that is, country) of residence:</p>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <p>This person is applicant for the <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental</p>                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p><small>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</small></p>                                                                                    | <p><b>This person is:</b></p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p>            |
| <p>State (that is, country) of nationality:</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p>State (that is, country) of residence:</p>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <p>This person is applicant for the <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental</p>                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p><input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |



| <b>Box No. V DESIGNATIONS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <p>The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.</p> <p>However,</p> <p><input type="checkbox"/> DE Germany is not designated for any kind of national protection</p> <p><input type="checkbox"/> JP Japan is not designated for any kind of national protection</p> <p><input type="checkbox"/> KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection</p> <p><input type="checkbox"/> RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection</p> <p><i>(The check-boxes above may only be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing or subsequently under Rule 26bis.1, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application.)</i></p> |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| Filing date<br>of earlier application<br>(day/month/year)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Number<br>of earlier application | Where earlier application is:                                                                                                        |                                          |                                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                  | national application:<br>country or Member                                                                                           | regional application:<br>regional Office | international application:<br>receiving Office |
| item (1) (15.02.07)<br>15 February 2007                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 60/890,087                       | US                                                                                                                                   |                                          |                                                |
| item (2) (17.05.07)<br>17 May 2007                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 60/938,565                       | US                                                                                                                                   |                                          |                                                |
| item (3)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <p>Transmit certified copy: the receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> all items    <input type="checkbox"/> item (1)    <input type="checkbox"/> item (2)    <input type="checkbox"/> item (3)    <input type="checkbox"/> other, see Supplemental Box</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <p>Restore the right of priority: the receiving Office is requested to restore the right of priority for the earlier application(s) identified above or in the Supplemental Box as item(s) ( _____ ). (See also the Notes to Box No. VI: further information must be provided to support a request to restore the right of priority.)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <p><b>Incorporation by reference:</b> where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <p><b>Choice of International Searching Authority (ISA)</b> (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</p> <p>ISA/ EP .....</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <p><b>Request to use results of earlier search; reference to that search</b> (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):</p> <p>Date (day/month/year)                      Number                      Country (or regional Office)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <b>Box No. VIII DECLARATIONS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  |                                                                                                                                      |                                          |                                                |
| <p>The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                  |                                                                                                                                      |                                          | Number of<br>declarations                      |
| <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Box No. VIII (i)                 | Declaration as to the identity of the inventor                                                                                       | :                                        |                                                |
| <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Box No. VIII (ii)                | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent             | :                                        |                                                |
| <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Box No. VIII (iii)               | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | :                                        |                                                |
| <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Box No. VIII (iv)                | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)                               | :                                        |                                                |
| <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Box No. VIII (v)                 | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty                                                       | :                                        |                                                |

| Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>This international application contains:</b><br>(a) on paper, the following number of sheets:<br>request (including declaration and supplemental sheets) : 5<br>description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) : 87<br>claims : 10<br>abstract : 1<br>drawings : 24<br><b>Sub-total number of sheets</b> : 127<br>sequence listing : 254<br>tables related thereto :<br><i>(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)</i><br><b>Total number of sheets</b> : 381<br>(b) <input type="checkbox"/> only in electronic form (Section 801(a)(i))<br>(i) <input type="checkbox"/> sequence listing<br>(ii) <input type="checkbox"/> tables related thereto<br>(c) <input checked="" type="checkbox"/> also in electronic form (Section 801(a)(ii))<br>(i) <input checked="" type="checkbox"/> sequence listing<br>(ii) <input type="checkbox"/> tables related thereto<br><b>Type and number of carriers</b><br>(diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the<br><input checked="" type="checkbox"/> sequence listing: .txt file<br><input type="checkbox"/> tables related thereto:<br><i>(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)</i> | <b>This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):</b><br>1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet : 1<br>2. <input type="checkbox"/> original separate power of attorney :<br>3. <input type="checkbox"/> original general power of attorney :<br>4. <input checked="" type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: : 1<br>5. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature :<br>6. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): :<br>7. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): :<br>8. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :<br>9. <input checked="" type="checkbox"/> sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers)<br>(i) <input type="checkbox"/> copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) :<br>(ii) <input checked="" type="checkbox"/> (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter :<br>(iii) <input checked="" type="checkbox"/> together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column :<br>10. <input type="checkbox"/> tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)<br>(i) <input type="checkbox"/> copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) :<br>(ii) <input type="checkbox"/> (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) :<br>(iii) <input type="checkbox"/> together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :<br>11. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): Transmittal Letter : 1 | <b>Number of items</b> |
| <b>Figure of the drawings which should accompany the abstract:</b> 9A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Language of filing of the international application:</b> English                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |
| <b>Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE</b><br><i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                        |
| <div style="text-align: right;">13-02-2008</div> <div style="text-align: center;"><br/>Bradford G. ADDISON - Agent for the Applicant</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                        |

| For receiving Office use only                                                                                                               |                                                                                         | 2. Drawings:<br><input type="checkbox"/> received:<br><br><input type="checkbox"/> not received: |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Date of actual receipt of the purported international application:                                                                       |                                                                                         |                                                                                                  |
| 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: |                                                                                         |                                                                                                  |
| 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):                                                              |                                                                                         |                                                                                                  |
| 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/                                                                   | 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid |                                                                                                  |
| For International Bureau use only                                                                                                           |                                                                                         |                                                                                                  |
| Date of receipt of the record copy by the International Bureau:                                                                             |                                                                                         |                                                                                                  |

PCT.  
PEDIDO

El que suscribe solicita que esta solicitud internacional siga el proceso de acuerdo con el Tratado de Cooperación sobre Patentes.

Para uso exclusivo de la Oficina receptora

Solicitud Internacional N° PCT/US08/53857

Fecha de Presentación Internacional: 13 DE FEBRERO DE 2008 (13-02-2008)

Nombre de la Oficina Receptora y "Solicitud Internacional PCT"  
RO/US DE SOLICITUD DE PATENTE INTERNACIONAL PCT

Referencia de Archivo del Solicitante o Agente 20920-204749  
(Si se desea) (máximo: 12 caracteres)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Casillero N°I: TITULO DE LA INVENCIÓN</b><br>COAGONISTAS DE RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-I                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                           |
| <b>Casillero N°II: SOLICITANTE</b> <input type="checkbox"/> Esta persona es también inventor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                           |
| Nombre y domicilio: (Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)<br>INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION<br>351 West 10th Street<br>Indianapolis, Indiana 46202<br>Estados Unidos | N° telefónico<br>317-274-5903<br>N° de fax:<br>317-274-5902<br>Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina:     |
| Estado (es decir, país) de nacionalidad: US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Estado (es decir, país) de domicilio: US                                                                                  |
| Esta persona es <input type="checkbox"/> todos los Estados <input checked="" type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo <input type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario<br>solicitante para los Estados Unidos de América propósitos de: designados América                                                                           |                                                                                                                           |
| <b>Casillero N°III: OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES):</b><br><input checked="" type="checkbox"/> Se indican otros solicitantes y/o (otros) inventores en una página continuación                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                           |
| <b>Casillero N°IV: AGENTE O REPRESENTANTE; O DOMICILIO PARA CORRESPONDENCIA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                           |
| La persona identificada a continuación ha sido designada/es designada por la presente para que actúe en nombre del(os) solicitante(s) ante las Autoridades Internacionales competentes, como:                                                                                                                                                                                                                                         | <input checked="" type="checkbox"/> agente <input type="checkbox"/> representante                                         |
| Nombre y domicilio: (Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y nombre del país)<br>ADDISON, Bardford G.<br>BARNES & THORNBURG LLP<br>11 South Meridian Street<br>Indianapolis, IN 46204<br>Estados Unidos                                                                                                                                                          | N° telefónico<br>317-231-7253<br>N° de fax<br>317-231-7433<br>Número de Inscripción del Agente ante la Oficina:<br>41.486 |
| <input type="checkbox"/> <b>Domicilio para Correspondencia:</b> Marque este casillero si no se ha designado ningún agente o representante y si el espacio de precedente ha sido usado en cambio para indicar un domicilio especial al cual ha de enviarse correspondencia.                                                                                                                                                            |                                                                                                                           |

| Continuación del Casillero N° III. OTROS SOLICITANTES Y/O (OTROS) INVENTORES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                       |                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Si no se usa ninguno de los siguientes subcasilleros, esta página no deberá incluirse en el pedido.                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                       |                                                                               |
| Nombre y domicilio: <i>(Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)</i><br>DAY, Jonathan<br>1331 South Adams Street, Apt. 11<br>Bloomington, IN 47402<br>Estados Unidos |  | Esta persona:<br><input type="checkbox"/> sólo solicitante<br><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor<br><input type="checkbox"/> sólo inventor. <i>(Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)</i><br>Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina: |                                                                                       |                                                                               |
| Estado <i>(es decir, país)</i> de nacionalidad: US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | Estado <i>(es decir, país)</i> de residencia: US                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input checked="" type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                       | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |
| Nombre y domicilio: <i>(Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)</i><br>PATTERSON, James<br>890 East Columbus Street<br>Martinsville, IN 46151<br>Estados Unidos     |  | Esta persona:<br><input type="checkbox"/> sólo solicitante<br><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor<br><input type="checkbox"/> sólo inventor. <i>(Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)</i><br>Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina: |                                                                                       |                                                                               |
| Estado <i>(es decir, país)</i> de nacionalidad: US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | Estado <i>(es decir, país)</i> de residencia: US                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input checked="" type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                       | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |
| Nombre y domicilio: <i>(Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)</i><br>CHABENNE, Joseph<br>13505 East 114th Street<br>Fishers, IN 46037<br>Estados Unidos           |  | Esta persona:<br><input type="checkbox"/> sólo solicitante<br><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor<br><input type="checkbox"/> sólo inventor. <i>(Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)</i><br>Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina: |                                                                                       |                                                                               |
| Estado <i>(es decir, país)</i> de nacionalidad: US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | Estado <i>(es decir, país)</i> de residencia: US                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input checked="" type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                       | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |
| Nombre y domicilio: <i>(Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)</i><br>DIMARCHI, Maria<br>10890 Wilmington Drive<br>Carmel, IN 46033<br>Estados Unidos              |  | Esta persona:<br><input type="checkbox"/> sólo solicitante<br><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor<br><input type="checkbox"/> sólo inventor. <i>(Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)</i><br>Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina: |                                                                                       |                                                                               |
| Estado <i>(es decir, país)</i> de nacionalidad: US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | Estado <i>(es decir, país)</i> de residencia: US                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input checked="" type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                       | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Continuación del Casillero N° III. OTROS SOLICITANTES Y/O (OTROS) INVENTORES                                                                                                                                                                                                                       |  |  |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Si no se usa ninguno de los siguientes subcasilleros, esta página no deberá incluirse en el pedido                                                                                                                                                                                                 |  |  |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Nombre y domicilio: (Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el tado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo)   |  |  | Esta persona:                                                                                                                                                                                                      |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| SMILEY, David                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |  | <input type="checkbox"/> sólo solicitante                                                                                                                                                                          |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| 3823 South Laura Way                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |  | <input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor                                                                                                                                                         |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Bloomington, IN 47401                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |  | <input type="checkbox"/> sólo inventor. (Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)                                                                                                         |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Estados Unidos                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |  | Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina                                                                                                                                                              |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| :Estado (es decir, país) de nacionalidad: US                                                                                                                                                                                                                                                       |  |  | Estado (es decir, país) de residencia: US                                                                                                                                                                          |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de                                                                                                                                                                                                                                                 |  |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input checked="" type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |
| Nombre y domicilio: (Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo) |  |  | Esta persona:                                                                                                                                                                                                      |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| DIMARCHI, Richard D.                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |  | <input type="checkbox"/> sólo solicitante                                                                                                                                                                          |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| 10890 Wilmington Drive                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |  | <input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor                                                                                                                                                         |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Carmel, IN 46033                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |  | <input type="checkbox"/> sólo inventor. (Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)                                                                                                         |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Estados Unidos                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |  | Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina                                                                                                                                                              |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Estado (es decir, país) de nacionalidad: US                                                                                                                                                                                                                                                        |  |  | Estado (es decir, país) de residencia: US                                                                                                                                                                          |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de                                                                                                                                                                                                                                                 |  |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input checked="" type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |
| Nombre y domicilio: (Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo) |  |  | Esta persona: <input type="checkbox"/> sólo solicitante <input type="checkbox"/> solicitante e inventor <input type="checkbox"/> sólo inventor. (Si marca este casillero, no complete la información de más abajo) |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina                                                                                                                                                              |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Estado (es decir, país) de nacionalidad:                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  | Estado (es decir, país) de residencia:                                                                                                                                                                             |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de                                                                                                                                                                                                                                                 |  |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América            | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |
| Nombre y domicilio: (Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo) |  |  | Esta persona:                                                                                                                                                                                                      |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | <input type="checkbox"/> sólo solicitante                                                                                                                                                                          |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | <input type="checkbox"/> solicitante e inventor                                                                                                                                                                    |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | <input type="checkbox"/> sólo inventor. (Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)                                                                                                         |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina                                                                                                                                                              |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Estado (es decir, país) de nacionalidad:                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  | Estado (es decir, país) de residencia:                                                                                                                                                                             |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de                                                                                                                                                                                                                                                 |  |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América            | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |
| Nombre y domicilio: (Apellido seguido del nombre; para empresas, razón social completa. El domicilio debe incluir código postal y país. El país del domicilio indicado en este Casillero es el Estado del solicitante (es decir el país) de residencia si no se indica Estado de residencia abajo) |  |  | Esta persona:                                                                                                                                                                                                      |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | <input type="checkbox"/> sólo solicitante                                                                                                                                                                          |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | <input type="checkbox"/> solicitante e inventor                                                                                                                                                                    |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | <input type="checkbox"/> sólo inventor. (Si marca este casillero, no complete la información de más abajo)                                                                                                         |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |  | Número de inscripción del Solicitante ante la Oficina                                                                                                                                                              |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Estado (es decir, país) de nacionalidad:                                                                                                                                                                                                                                                           |  |  | Estado (es decir, país) de residencia:                                                                                                                                                                             |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |
| Esta persona es solicitante para los propósitos de                                                                                                                                                                                                                                                 |  |  | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo Estados Unidos de América | <input type="checkbox"/> sólo Estados Unidos de América            | <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el casillero complementario |
| <input type="checkbox"/> Se indican otros solicitantes y/o (otros) inventores en una página continuación                                                                                                                                                                                           |  |  |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                       |                                                                    |                                                                               |

Casillero N° V DESIGNACIONES

La presentación de este pedido constituye conforme a la Norma 4.9(a), la designación de todos los Estados Firmantes obligados por el PCT en la fecha de presentación internacional, para la concesión de todos los tipos de protección y, cuando corresponda, para la concesión de patentes tanto regionales como nacionales.

Sin embargo,

☐ DE Alemania no se designa para ningún tipo de protección nacional

☐ JP Japón no se designa para ningún tipo de protección nacional

☐ KR República de Corea no se designa para ningún tipo de protección nacional

☐ RU Federación Rusa no se designa para ningún tipo de protección nacional

(Los casilleros de verificación precedentes pueden usarse para excluir (irrevocablemente) las designaciones referidas para evitar que deje de estar en vigencia, conforme a la ley nacional, una solicitud de patente nacional anterior de la cual se reivindica prioridad. Véase las Notas al Casillero N°V, en cuanto a las consecuencias de las disposiciones de esa ley nacional en estos y otros Estados).

Casillero N°VI REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Por la presente se reivindica prioridad de la siguiente solicitud(es) anterior:

| Fecha de presentación de la solicitud anterior (día/mes/año) | Número de la solicitud anterior | Cuando la solicitud anterior es:          |                                      |                                            |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------|
|                                                              |                                 | solicitud nacional: país o Miembro de WTO | solicitud regional: Oficina regional | solicitud internacional: Oficina receptora |
| ítem (1) 15 de febrero de 2007 (15-2-2007)                   | 60/890.087                      | Estados Unidos                            |                                      |                                            |
| Ítem (2) 17 de mayo de 2007 (17-05-2007)                     | 60/938.565                      | Estados Unidos                            |                                      |                                            |
| ítem (3)                                                     |                                 |                                           |                                      |                                            |

☐ Se indican otras reivindicaciones de prioridad en el Casillero Complementario

Se solicita a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia autenticada de la solicitud(es) anterior *(solamente si la solicitud anterior se presentó ante la Oficina que parà los propósitos de la presente solicitud internacional es la Oficina receptora)* identificada anteriormente como:

☒ todos los ítems ☐ ítem (1) ☐ ítem (2) ☐ ítem (3) ☐ ítem (4) ☐ ítem (5) ☐ otro, ver Casillero Suplementario

**Restablecer el derecho de prioridad:** se solicita a la Oficina receptora que restablezca el derecho de prioridad para la solicitud de patente anterior identificada anteriormente o en el Casillero Suplementario como ítem(s) ( ). *(Véase también las Notas al Casillero N° VI; se deberá brindar información adicional para respaldar una solicitud de restablecimiento del derecho de prioridad.)*

**Incorporación como Referencia:** cuando un elemento de la solicitud de patente internacional citada en la Cláusula 11(1)(iii)(d) o (e) o una parte de la memoria descriptiva, las reivindicaciones o los dibujos citados en la Norma 20.5(a) no está contenida de otro modo en esta solicitud de patente internacional pero está completamente contenida en una solicitud de patente anterior cuya prioridad se reivindica en la fecha en la cual uno o más elementos citados en la Cláusula 11(1)(iii) fueron recibidos primero por la Oficina receptora, ese elemento o parte, sujeto a confirmación conforme a la Norma 20.6, se incorpora como referencia en esta solicitud de patente internacional para los propósitos de la Norma 20.6.

Casillero N°VII AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Elección de la Autoridad de Búsqueda Internacional (ISA) *(Si dos o más Autoridades de Búsqueda Internacional son competentes para realizar la búsqueda internacional, indique la Autoridad elegida; puede usarse un código de dos letras):*

ISA/EP

Pedido de uso de los resultados de una búsqueda anterior; referencia a esa búsqueda (si se ha realizado una búsqueda anterior o si ésta ha sido solicitada a la Autoridad de Búsqueda Internacional):

|                     |        |                            |
|---------------------|--------|----------------------------|
| Fecha (día/mes/año) | Número | País (u Oficina regional): |
|---------------------|--------|----------------------------|

Casillero N°VIII DECLARACIONES JURADAS

|                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Las siguientes declaraciones juradas están contenidas en los Casilleros VIII(i) a (v) <i>(marcar los casilleros de verificación aplicables siguientes e indicar en la columna de la derecha el número de cada tipo de declaración):</i> | Número de declaraciones                                                                                                                         |
| <input type="checkbox"/> Casillero N°VIII(i)                                                                                                                                                                                            | Declaración sobre la identidad del inventor                                                                                                     |
| <input type="checkbox"/> Casillero N°VIII(ii)                                                                                                                                                                                           | Declaraciones sobre derecho del solicitante, a la fecha de presentación internacional, de presentar solicitudes y que se le conceda una patente |
| <input type="checkbox"/> Casillero N°VIII(iii)                                                                                                                                                                                          | Declaración sobre el derecho del Solicitante, a la fecha de presentación internacional, de reivindicar prioridad de la solicitud anterior       |
| <input type="checkbox"/> Casillero N°VIII (iv)                                                                                                                                                                                          | Declaración de carácter de inventor (solamente para los propósitos de la designación de Estados Unidos)                                         |
| <input type="checkbox"/> Casillero N°VIII (v)                                                                                                                                                                                           | Declaración sobre revelaciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad                                                             |

| Casillero IX. LISTA DE VERIFICACIÓN: IDIOMA DE LA PRESENTACIÓN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| <p>Esta solicitud internacional contiene:</p> <p>(a) <b>en papel</b>, el siguiente número de páginas:<br/> pedido (incluyendo páginas de declaración) 5<br/> memoria descriptiva (excluyendo la parte del listado de secuencias y/o las tablas relacionadas con él): 87<br/> reivindicaciones 10<br/> resumen 1<br/> dibujos 24<br/> <b>Subtotal de número de páginas</b> 127<br/> Listado de secuencias 254<br/> Tablas relacionadas con él<br/> <i>(para ambos, número real de páginas si se presentan en forma de papel, sean o no presentadas también en forma legible por computadora; ver (b) abajo)</i><br/> <b>Número total de páginas</b> 381</p> <p>(b) <input type="checkbox"/> <b>solamente en forma legible por computadora</b><br/> (Artículo 801(a)(i))<br/> (i) <input type="checkbox"/> listado de secuencias<br/> (ii) <input type="checkbox"/> tablas relacionadas con él<br/> (c) <input checked="" type="checkbox"/> <b>también en forma legible por computadora</b><br/> (Artículo 801(a)(ii))<br/> (i) <input checked="" type="checkbox"/> listado de secuencias<br/> (ii) <input type="checkbox"/> tablas relacionadas con él</p> <p><b>Escribir y numerar los portadores</b> (diskette, CD-ROM, CD-R u otro) en los cuales están contenidos<br/> <input checked="" type="checkbox"/> listado de secuencias <u>archivo txt</u><br/> <input type="checkbox"/> tablas relacionadas con él<br/> (las copias adicionales deben indicarse en los ítems 9(ii) y/o 10(ii), en la columna de la derecha)</p> | <p>Esta solicitud internacional está acompañada por el siguiente ítem(s) <i>(marcar los casilleros de verificación e indicar en la columna de la derecha el número de cada ítem)</i>:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li><input checked="" type="checkbox"/> planilla de cálculo de aranceles :</li> <li><input type="checkbox"/> poder original por separado :</li> <li><input type="checkbox"/> poder general original :</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> copia del poder general; número de referencia, si hubiera:</li> <li><input type="checkbox"/> declaración de explicación de falta de firma :</li> <li><input type="checkbox"/> documento(s) de prioridad identificado(s) en el Casillero N°VI como ítem(s):</li> <li><input type="checkbox"/> traducción de la solicitud internacional al (idioma):</li> <li><input type="checkbox"/> indicaciones por separado concernientes a microorganismos u otro material biológico depositado :</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma legible por computadora<br/> <i>(indicar el tipo y número de portadores) :</i><br/> (i) <input type="checkbox"/> copia presentada para los propósitos de la búsqueda internacional conforme a la Norma 13ter solamente (y no como parte de la solicitud internacional) ;<br/> (ii) <input checked="" type="checkbox"/> <i>(solamente cuando se marcó el casillero (b)(i) o (b)(ii) en la columna de la izquierda)</i> copias adicionales que incluyen, cuando corresponde, la copia para los propósitos de la búsqueda internacional conforme a la Norma 13ter. ;<br/> (iii) <input checked="" type="checkbox"/> junto con la declaración relevante en cuanto a la identidad de la copia o copias con la parte de listado de secuencias mencionada en la columna de la izquierda :</li> <li><input type="checkbox"/> tablas en forma legible por computadora relacionadas con los listados de secuencias<br/> <i>(indicar tipo y número de portadores) :</i><br/> (i) <input type="checkbox"/> copia presentada con los propósitos de la búsqueda internacional conforme al Artículo 802(b-cuater) solamente (y no como parte de la solicitud internacional) ;<br/> (ii) <input type="checkbox"/> <i>(solamente cuando se marca el casillero de verificación (b)(ii) o (c)(ii) en la columna de la izquierda)</i> copias adicionales que incluyen, cuando corresponde, la copia para los propósitos de la búsqueda internacional conforme al Artículo 802(b-cuater) ;<br/> (iii) <input type="checkbox"/> junto con la declaración relevante en cuanto a la identidad de la copia o copias con las tablas mencionadas en la columna de la izquierda :</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> otros <i>(especifique)</i>: <u>Carta de Remisión</u></li> </ol> | <p>Número de Ítems</p> <p>1</p> <p>1</p> |
| <p>Figura de los dibujos que deberá acompañar al resumen: 9A</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <p>Idioma de presentación de la solicitud internacional: INGLÉS</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                          |
| <p>Casillero N°X FIRMA DEL SOLICITANTE, AGENTE O REPRESENTANTE</p> <p>Junto a la firma, indique el nombre del firmante y el carácter con el que firma <i>(si el mismo no se deduce de la lectura de la solicitud)</i>:</p> <p>/Michael S. Greenfield/<br/> Edward G. ADDISON – Agente del Solicitante 13-02-2008</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                          |

Para uso exclusivo de la Oficina Receptora

|                                                                                                                                                             |                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Fecha de recepción real de la solicitud internacional:                                                                                                   | 2. Dibujos:<br><input type="checkbox"/> recibidos<br><input type="checkbox"/> no recibidos |
| 3. Corrección de la fecha de recepción real debido a la recepción posterior pero en plazo de documentos o dibujos que completan la solicitud internacional: |                                                                                            |
| 4. Fecha de recepción en plazo de las correcciones solicitadas conforme a la Cláusula II(2) del PCT:                                                        |                                                                                            |
| 5. Autoridad de Búsqueda Internacional <i>(si dos o más son competentes)</i> : ISA/--                                                                       |                                                                                            |
| 6. <input type="checkbox"/> Remisión de copia de búsqueda demorada hasta que se efectúe el pago del arancel de búsqueda                                     |                                                                                            |

Para uso exclusivo de la Oficina Internacional

|                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------|
| Fecha de recepción de la copia del registro por la Oficina Internacional: |
|---------------------------------------------------------------------------|

## PATENT COOPERATION TREATY

IP FILES

OCT 16 2008

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT BARNES &amp; THORNBURG LLP

To:

BARNES & THORNBURG  
Attn: Addison, Bradford G.  
11 South Meridian Street  
INDIANAPOLIS, INDIANA 46204  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

DOCKETED  
FOR A19/Demand  
BY [Signature]  
DATE 10/16/08  
CHECKED BY \_\_\_\_\_  
DATE \_\_\_\_\_

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) 09/10/2008

Applicant's or agent's file reference

29920-204749

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2008/053857

International filing date  
(day/month/year)

13/02/2008

Applicant

INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY

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 Patentaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sandra Sonnenschmidt-Rogge

HB10/23



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                             |                                                                                               |                                                         |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>29920-204749       | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. |                                                         |
| International application No.<br>PCT/US2008/053857          | International filing date (day/month/year)<br>13/02/2008                                      | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br>15/02/2007 |
| Applicant<br><br>INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY |                                                                                               |                                                         |

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 7 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:

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. 9a

☒ 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/US2008/053857

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/US2008/053857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C07K14/605 A61K38/26

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, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No.             |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| X        | GELFANOV VASILY M ET AL: "Discovery and structural optimization of high affinity co-agonists at the Glucagon and GLP-1 receptors"<br>UNDERSTANDING BIOLOGY USING PEPTIDES,<br>SPRINGER, 23 June 2005 (2005-06-23), pages 763-764, XP009105716<br>ISBN: 978-0-387-26569-8<br>the whole document | 1-3,8,<br>10-19,<br>40,56-60      |
| X        | UNSON C G, ET AL.: "POSITIVELY CHARGED RESIDUES AT POSITIONS 12, 17, AND 18 OF GLUCAGON ENSURE MAXIMUM BIOLOGICAL POTENCY"<br>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,<br>vol. 273, no. 17, 1998, pages 10308-10312, XP002495827<br>the whole document                                             | 1-3,<br>10-19,<br>40,50,<br>56-60 |
|          | -----<br>-/--<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                   |

☒ 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.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 2008

Date of mailing of the international search report

09/10/2008

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) 340-3018

Authorized officer

Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/053857

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No.                                 |
| X                                                    | MCKEE R L, ET AL.: "RECEPTOR BINDING AND ADENYLATE CYCLASE ACTIVITIES OF GLUCAGON ANALOGUES MODIFIED IN THE N-TERMINAL REGION"<br>BIOCHEMISTRY,<br>vol. 25, 1986, pages 1650-1656,<br>XP002495828<br>the whole document                                                                                                                             | 1-3,<br>10-12,<br>15-19,<br>23,33,<br>40,56-60        |
| X                                                    | SAPSE ANNE-MARIE ET AL: "The role of salt bridge formation in glucagon: An experimental and theoretical study of glucagon analogs and peptide fragments of glucagon"<br>MOLECULAR MEDICINE, BLACKWELL SCIENCE, CAMBRIDGE, MA, US,<br>vol. 8, no. 5, 1 May 2002 (2002-05-01),<br>pages 251-262, XP009105688<br>ISSN: 1076-1551<br>the whole document | 1-3,6,<br>10-13,<br>15,16,<br>23,33,<br>40,56-60      |
| X                                                    | WO 01/83527 A (AMGEN INC [US])<br>8 November 2001 (2001-11-08)<br><br>abstract<br>page 4, line 19 - page 5, line 4<br>page 27, line 23 - page 28, line 25<br>page 30, lines 14-17<br>page 36, lines 17-23<br>sequences 52, 59, 65                                                                                                                   | 1-3,<br>10-13,<br>15-19,<br>23,34,<br>35,40,<br>56-60 |
| X                                                    | US 2004/002468 A1 (WADSWORTH SAMUEL C [US] ET AL) 1 January 2004 (2004-01-01)<br><br>abstract<br>figures 7,11,18<br>paragraphs [0003], [0006], [0018],<br>[0022], [0025], [0027], [0047],<br>[0053], [0054], [0065], [0066],<br>[0069], [0072], [0074]<br><br>-----<br>-/--                                                                         | 1-3,<br>13-19,<br>22,23,<br>32,40,<br>56-60           |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/053857

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                   |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No.                             |
| X,P                                                  | WO 2007/056362 A (UNIV INDIANA RES. & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; SMILEY DAV) 18 May 2007 (2007-05-18)<br><br>abstract<br>page 1, line 24 - page 5, line 9<br>page 6, line 27 - page 7, line 5<br>page 8, line 19 - page 23, line 18<br>examples 1-14<br><br>-----                                                                                                                        | 1-5,<br>8-23,<br>32-36,<br>40,<br>50-58,<br>60-64 |
| E                                                    | WO 2008/086086 A (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; DIMARCHI M) 17 July 2008 (2008-07-17)<br><br>abstract<br>page 2, line 14 - page 4, line 21<br>page 7, lines 24-29<br>page 9, lines 1-27<br>page 11, lines 1-24<br>page 13, line 1 - page 15, line 33<br>page 18, lines 8-17<br>page 21, lines 11-24<br>page 23, line 17 - page 26, line 19<br>examples 1-14<br><br>----- | 1-5,<br>8-23,<br>32-36,<br>40,50-64               |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2008/053857

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 58-64 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 dependant 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.

365

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2008/053857

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0183527                                | A  | 08-11-2001          | AU 5579801 A               | 12-11-2001          |
|                                           |    |                     | EP 1278772 A2              | 29-01-2003          |
|                                           |    |                     | JP 2003531632 T            | 28-10-2003          |
|                                           |    |                     | US 2003032588 A1           | 13-02-2003          |
| US 2004002468                             | A1 | 01-01-2004          | US 2004143104 A1           | 22-07-2004          |
| WO 2007056362                             | A  | 18-05-2007          | CA 2628241 A1              | 18-05-2007          |
|                                           |    |                     | EP 1959986 A2              | 27-08-2008          |
| WO 2008086086                             | A  | 17-07-2008          | NONE                       |                     |

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

RECEIVED

OCT 16 2008  
PCT  
BARNES & THORNBURG LLP

|                                 |          |                                                                                   |
|---------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| To: .....                       | DOCKETED | WRITTEN OPINION OF THE<br>INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY<br>(PCT Rule 43bis.1) |
| FOR <u>Reponse / Comment On</u> |          |                                                                                   |
| BY <u>Ad</u>                    |          |                                                                                   |
| DATE <u>10/16/08</u>            |          |                                                                                   |
| CHE'D BY _____                  |          |                                                                                   |
| DATE _____                      |          | Date of mailing<br>(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)           |

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

FOR FURTHER ACTION  
See paragraph 2 below

|                                                    |                                                          |                                              |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| International application No.<br>PCT/US2008/053857 | International filing date (day/month/year)<br>13.02.2008 | Priority date (day/month/year)<br>15.02.2007 |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|

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

Applicant  
INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY

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:<br><br>European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | Date of completion of<br>this opinion<br><br>see form<br>PCT/ISA/210 | Authorized Officer<br><br>Chavanne, Franz<br><br>Telephone No. +49 89 2399-8399<br> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.  
PCT/US2008/053857**Box No. I Basis of the opinion**

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

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/US2008/053857

**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. 58-64 (with regard to patentability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 58-64 (with regard to patentability) 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

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/US2008/053857

**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>4,5,7,9,20,21,24-31,36-39,41-55,60-65</u> |
|                               | No: Claims  | <u>1-3,6,8,10-19,22,23,32-35,40,56-59</u>    |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | <u>4,5,7,9,20,21,24-31,36-39,41-55,61-65</u> |
|                               | No: Claims  | <u>1-3,6,8,10-19,22,23,32-35,40,56-60</u>    |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-65</u>                                  |
|                               | No: Claims  |                                              |

2. Citations and explanations

see separate sheet

**Box No. VI Certain documents cited**

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9).

see form 210

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/053857

**Re Item III.**

1. Claims 58-64 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion with regard to the patentability will be formulated on the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

**Re Item V.**

1. Reference is made to the following documents:

- D1 : GELFANOV VASILY M ET AL: "Discovery and structural optimization of high affinity co-agonists at the Glucagon and GLP-1 receptors" UNDERSTANDING BIOLOGY USING PEPTIDES, SPRINGER, 23 June 2005 (2005-06-23), pages 763-764, XP009105716 ISBN: 978-0-387-265698
- D2 : UNSON C G, ET AL.: "POSITIVELY CHARGED RESIDUES AT POSITIONS 12, 17, AND 18 OF GLUCAGON ENSURE MAXIMUM BIOLOGICAL POTENCY" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 17, 1998, pages 10308-10312, XP002495827
- D3 : MCKEE R L, ET AL.: "RECEPTOR BINDING AND ADENYLATE CYCLASE ACTIVITIES OF GLUCAGON ANALOGUES MODIFIED IN THE N-TERMINAL REGION" BIOCHEMISTRY, vol. 25, 1986, pages 1650-1656, XP002495828
- D4 : SAPSE ANNE-MARIE ET AL: "The role of salt bridge formation in glucagon: An experimental and theoretical study of glucagon analogs and peptide fragments of glucagon" MOLECULAR MEDICINE, BLACKWELL SCIENCE, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 8, no. 5, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 251-262, XP009105688 ISSN: 1076-1551
- D5 : WO 01/83527 A (AMGEN INC [US]) 8 November 2001 (2001-11-08)
- D6 : US 2004/002468 A1 (WADSWORTH SAMUEL C [US] ET AL) 1 January 2004 (2004-01-01)
- D7 : WO 2007/056362 A (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; SMILEY DAV) 18 May 2007 (2007-05-18)

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/053857

D8 : WO 2008/086086 A (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; DIMARCHI M) 17 July 2008 (2008-07-17)

2. D1 describes the modification of glucagon at positions 12, 20, 24, 27 and/or 29. The peptides of D1 maintain their activity but improved their physical properties. The peptides are also capable of signalling at the GLP-1 receptor. The peptides of D1 comprise SEQ ID No.55 of the present application.  
Thus, in view of D1, the subject-matter of claims 1-3, 8, 10-19, 40, 56 and 57 is not novel (Article 33(2) PCT).
3. D2 describes glucagon peptides modified at positions 12, 17 and/or 18. The effect of these mutations on binding to the glucagon receptor and on adenylyl cyclase activity has been examined (abstract; page 10309, column 1; Tables I and II).  
D2 does not specifically refer to the percentage of activity of the peptide relative to the activity of the native GLP-1 at the GLP-1 receptor. However, this does not correspond to any technical feature but to a specific propriety of the product. In this context, the Applicant shall be aware that, as a general rule, the elucidation of a novel feature (e.g. the percentage of activity of the peptide relative to the activity of the native GLP-1 at the GLP-1 receptor) of a known product (e.g. a modified glucagon comprising the sequence of SEQ ID No.55) is not adapted to reinstate the novelty of the known product. Moreover, the Applicant is also aware that the activity of a peptide rely on its amino acid sequence. Hence, two peptides having the same amino acid sequence would automatically have the same activity.  
Thus, in view of D2, the subject-matter of claims 1-3, 8, 10-19, 40, 56 and 57 is not novel (Article 33(2) PCT).
4. D3 refers to glucagon peptides modified at positions 1 and 12 (abstract; page 1651, column 2; page 1653; page 1654, column 2).  
Thus, in view of D3, the subject-matter of claims 1-3, 10-12, 15-19, 23, 33, 40, 56 and 57 is not novel (Article 33(2) PCT).
5. D4 describes glucagon analogs with a lactam bridge between positions 20 and 24, 9 and 12, or 2 and 5. These analogs have an amide at their C-terminus. Further

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/053857

modifications such as a modification at position 1 is also mentioned in D4 (abstract; page 252; page 257; page 260, column 2; Table I).

Thus, in view of D4, the subject-matter of claims 1-3, 6, 10-13, 15, 16, 23, 33, 40, 56 and 57 is not novel (Article 33(2) PCT).

6. D5 describes non-native glucagon analogs which comprise SEQ ID No.55. The sequence from these glucagons differ from the native glucagon sequence at positions 2, 5 or 29. D5 mentions that these peptides may also be PEGylated. The peptides of D5 are used for the treatment of diabetes (abstract; pages 4, 5, 27, 28, 30 and 36; sequences 52, 59 and 65).  
Thus, in view of D5, the subject-matter of claims 1-3, 10-13, 15-19, 23, 34, 35, 40, 56, 57 and 59 is not novel (Article 33(2) PCT).
7. D6 describes glucagon peptides of SEQ ID No.55 and glucagon peptides comprising SEQ ID No.55. These glucagon analogs are used for the treatment of hypoglycaemia, diabetes or for their effect on weight loss (abstract; paragraphs 3, 6, 18, 22, 25, 27, 47, 53, 54, 65, 66, 69, 72 and 74; figures 7, 11 and 18).  
Thus, in view of D6, the subject-matter of claims 1-3, 13-19, 22, 23, 32, 40 and 56-59 is not novel (Article 33(2) PCT).
8. The role of glucagon in the regulation of glucose is well known in the art, so is also the connection with temporary paralysis of the intestinal tract. Thus, by applying basic knowledge, the skilled person aware of any of D1-D6 would automatically and in a straightforward manner come to the subject-matter of claim 60. Thus, this subject-matter is not inventive (Article 56 EPC).
9. The present application describes the modified glucagon peptides of SEQ ID No.12, 35, 36 and 39. However, the present application does not specifically describe any of the claimed sequences. Moreover, apart from vague statements and unfounded declarations, the present application does not show any activity related to the claimed peptides. Hence, present claims 1-65 are not supported by the description (Article 6 PCT).

In this context, the Applicant should be aware, that the scope of a claim should reflect

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/053857

the actual technical contribution of the application. **Vague statements or assertions having no technical content provide no basis** (Article 6 PCT; see also PCT Guidelines, 5.44).

Moreover, considering that the presently claimed subject-matter corresponds to an undue generalisation of the peptide of SEQ ID No.12, 35 35 and 19, it raises the question whether all the glucagon peptides falling within the scope of claims 1-65 would be able to solve the posed problem (Article 56 EPC).

Furthermore, it is questionable whether all the peptides of SEQ ID No.55 exhibit at least 20% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor. Hence, the man skilled in the art, faced with the problem of providing a non-native glucagon exhibiting at least 20% of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor would not be able to provide it without the need of applying undue burden of experimentations (Article 5 PCT).

10. The matter for which protection is sought in claims 1, 15-20 and 23 is not clearly defined. The subject-matter of these claims refer to a non-native glucagon and attempts to define the subject-matter in terms of a result to be achieved ("exhibits...", "modified to exhibit..."). Such a definition is only allowable under the conditions elaborated in the Guidelines C-III, 4.7 PCT. In this instance, however, such a formulation is not allowable because it appears possible to define the subject-matter in more concrete terms, viz. in how the effect is to be achieved. Therefore, claims 1, 15-20 and 23 do not meet the requirements of Article 6 PCT.
11. For the assessment of the present claims 58-64 on the question whether they are patentable, 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 patentable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment.

**Re Item VI.**

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING  
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2008/053857

1. Certain published documents (Rule 70.10)

WO 2007/056362

WO 2008/086086



**TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES**

De la AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Para:<br>BARNES & THORNBURG<br>Atn: Addison, Bradford G.<br>11 South Meridian Street<br>Indianapolis, Indiana 46204<br>Estados Unidos de América                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <p align="center"><b>PCT</b><br/> <b>NOTIFICACIÓN DE REMISIÓN DEL</b><br/> <b>INFORME DE BÚSQUEDA</b><br/> <b>INTERNACIONAL Y DE LA OPINIÓN</b><br/> <b>ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE</b><br/> <b>BÚSQUEDA INTERNACIONAL, O LA</b><br/> <b>DECLARACIÓN</b><br/> <b>(Norma 44.1 del PCT)</b></p> <p>Fecha de remisión (día/mes/año)</p> <p>9/10/2008</p> |
| Referencia de archivo del<br><br>Solicitante o Agente<br><br>29920-204749                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <p><b>PARA OTROS TRAMITES</b></p> <p>Véanse los párrafo 1 y 4 a<br/>continuación</p>                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Solicitud de Patente<br><br>Internacional N°<br><br>PCT/US 2008/053857)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <p>Fecha de presentación<br/>internacional (día/mes/año):</p> <p>13-2-2008</p>                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Solicitante: INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <p>1. [x] Por la presente se notifica al solicitante que el informe de búsqueda internacional y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se han establecido y se transmiten con la presente:</p> <p>Presentación de modificaciones y testimonio conforme a la Cláusula 19.</p> <p>El solicitante tiene derecho, si lo desea, de modificar las reivindicaciones de la solicitud internacional (véase la Norma 46):</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

¿Cuándo? El plazo para presentar dichas modificaciones es normalmente de 2 meses desde la fecha de transmisión del Informe de Búsqueda Internacional.

¿Dónde? Directamente a la Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin de Colombettes, 1211 Ginebra 20, Suiza, Fax: (41-22)338-8270

Para obtener instrucciones más detalladas, véanse las notas en la página adjunta.

2. [] Por la presente se notifica al solicitante que no se establecerá informe de búsqueda internacional y que la declaración conforme al Artículo 17(2)(a) a tal efecto y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se transmiten con la presente.

3. [] Con respecto la protesta contra el pago de (un) arancel(es) adicionales conforme a la Norma 40.2, se notifica al solicitante que:

[] la protesta así como la resolución sobre ella ha sido transmitida a la Oficina Internacional junto con el pedido del solicitante de remitir los textos de la protesta y de la resolución sobre ella a las Oficinas designadas.

[] aún no ha habido resolución sobre la protesta; el solicitante será notificado en cuanto haya una resolución.

#### 4. Recordatorios:

Poco después de los **18 meses** desde la fecha de prioridad, la Oficina Internacional publicará la solicitud internacional. Si el solicitante desea impedir o postergar la publicación, un escrito de retiro de la solicitud internacional, o de la reivindicación de prioridad, deberán ser presentados ante la Oficina Internacional según lo previsto en las Normas 90bis.1 y 90bis.3, respectivamente, antes de la finalización de los preparativos técnicos para la publicación internacional.

El solicitante podrá presentar ante la Oficina Internacional observaciones en forma informal acerca de la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional. La Oficina Internacional remitirá una copia de esas observaciones a todas las oficinas designadas a menos que se haya establecido o se deba establecer un informe del examen preliminar internacional. Estas observaciones también estarían disponibles para el público pero no con anterioridad al vencimiento del plazo de 30 meses des de la fecha de prioridad.

Dentro de los **19 meses** desde la fecha de prioridad, deberá presentarse un pedido de examen preliminar internacional si el solicitante desea postergar el ingreso en la fase nacional hasta los 30 meses desde la fecha de prioridad (en algunas Oficinas más); de lo contrario el solicitante deberá, dentro

de los 20 meses, realizar los trámites previstos para el ingreso en la fase nacional ante aquellas Oficinas designadas. Con respecto a las demás Oficinas designadas, el plazo de 30 meses (o con posterioridad) será aplicable aún cuando no se presente ningún pedido dentro de los 19 meses.

Véase el Anexo al Formulario PCT/IB/301 y, para detalles acerca de los plazos aplicables, Oficina por Oficina, véase la Guía del Solicitante de PCT, Volumen II, Sedes Nacionales y el sitio de Internet de la WIPO.

|                                                                                                                                                                                                            |                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Nombre y domicilio para correspondencia de la ISA/<br>Oficina de Patentes Europea,<br>P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040<br>Tx 31 651 epo nl<br>Fax (+31-70) 340-3016 | Funcionario Autorizado:<br><br>Sandra Sonnenschmidt-Rogge |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|

Formulario PCT/ISA/220 (octubre de 2005)

(Véanse notas en la página adjunta)

## TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

## PCT

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Cláusula 18 y Normas 43 y 44 del PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                              |                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Referencia de<br>Archivo del<br>Solicitante o<br>agente: 29920-<br>204749                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>PARA REALIZAR</b><br><br><b>OTROS</b><br><br><b>TRAMITES</b>              | Véase Notificación de<br>Transmisión de Informe de<br>Búsqueda Internacional<br>(Formulario PCT/ISA/220) y,<br>si fuere aplicable, del<br>punto 5 más abajo. |
| Solicitud<br>Internacional No:<br>PCT/US2008/053857                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Fecha<br>de<br>Presentación<br>Internacional<br>(día/mes/año): 13-2-<br>2008 | Fecha de Prioridad<br>(Más antigua)<br>(día/mes/año): 15-2-<br>2007                                                                                          |
| Solicitante: INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                              |                                                                                                                                                              |
| <p>Este informe de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante conforme a la Cláusula 18. Se transmite una copia del mismo a la Oficina Internacional.</p> <p>Este informe de búsqueda internacional consta de <u>7</u> páginas.</p> <p>[X] Está acompañado asimismo de una copia de cada documento de arte previo citado en el informe</p> |                                                                              |                                                                                                                                                              |

1. Fundamento de Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional se llevó a cabo basada en:

☒ la solicitud internacional en el idioma en que ésta se presentó.

☐ una traducción de la solicitud internacional al \_\_\_\_\_, que es el idioma de la traducción provista para los fines de la búsqueda internacional (Normas 12.3(a) y 23.1(b)).

b. El informe de búsqueda internacional se ha establecido tomando en cuenta la rectificación de un error obvio autorizada o notificada por a esta Autoridad conforme a la Norma 91 (Norma 43.6bis(a)).

c. ☒ Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional, véase el Casillero N° I

2. ☒ Ciertas reivindicaciones se consideraron no buscables (Véase Casillero N° II)

3. ☐ Falta Unidad de Invención (Véase Casillero N° III).

4. Con respecto al título:

☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante

☐ el texto ha sido establecido por esta Autoridad como sigue:

5. Con respecto al resumen:

☒ el texto es aprobado como lo presentó el solicitante

☐ el texto ha sido establecido, conforme a la Norma

38.2(b), por esta Autoridad como aparece en el Casillero N°

IV. El Solicitante puede, dentro de un mes desde la fecha de remisión de este informe de búsqueda internacional, presentar comentarios ante esta Autoridad.

6. Con respecto a los dibujos,

a. La Lámina de dibujos que se publicará con el resumen es:

Figura No. 9a.

☒ sugerida por el Solicitante

☐ seleccionada por esta Autoridad, debido a que el Solicitante no sugirió una Figura.

☐ seleccionada por esta Autoridad, debido a que ésta es la figura que mejor caracteriza a la invención

b. ☐ No se debe publicar ninguna de las figuras con el resumen.

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2008/053857

Casillero N° I. Secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos

(Continuación del punto 1.b de la página 1)

1. Con respecto a todas las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos que se describen en la solicitud internacional y que son necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido basada en:

a. tipo de material:

☒ un listado de secuencias☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencias

b. formato del material

☒ en papel☒ en forma electrónica

c. fecha de presentación/provisión

☒ contenida en la solicitud de patente internacional presentada☒ presentada junto con la solicitud de patente internacional en forma electrónica



[ ] presentada con posterioridad ante esta Autoridad con propósitos de búsqueda.

2. [ ] Además, en caso de que se haya presentado o provisto más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o una tabla relacionada con él, se presentaron las declaraciones requeridas de que la información de las copias posteriores o adicionales es idéntica a aquella de la solicitud de patente presentada o no va más allá de la solicitud presentada, según corresponda.

3. Declaraciones adicionales

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la página 1) (abril de 2005)

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

|                                                                                                                                                                                                                          |                                                                      |                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Solicitud Internacional N°<br>PCT/US2008/053857                                                                                                                                                                          |                                                                      |                                     |
| A. Clasificación de la Materia:<br><br>INV. C07K14/605 A61K38/26<br><br>De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o con la clasificación nacional e IPC.                                           |                                                                      |                                     |
| B. CAMPOS DE BÚSQUEDA                                                                                                                                                                                                    |                                                                      |                                     |
| Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por símbolos de clasificación)<br><br>C07K A61K                                                                                                           |                                                                      |                                     |
| Documentación buscada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos están incluidos en los campos de búsqueda:                                                                                  |                                                                      |                                     |
| Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda usados):<br><br>EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Búsqueda de Secuencias |                                                                      |                                     |
| C. Documentos Considerados Relevantes                                                                                                                                                                                    |                                                                      |                                     |
| Categoría*                                                                                                                                                                                                               | Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes | Relevante para la reivindicación N° |

|                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| X                                                                                                                             | <p>GELFANOV VASILY M ET AL:</p> <p>"Descubrimiento y optimización estructural de coagonistas con alta afinidad en los receptores de Glucagón y GLP-1"</p> <p>UNDERSTANDING BIOLOGY USING PEPTIDES, SPRINGER, 23 de junio de 2005 (23-06-2005), páginas 763-764, XP009105716</p> <p>ISBN: 978-0-387-26569-8</p> <p>El documento completo</p> | <p>1-3, 8, 10-19, 40, 56-60</p>  |
| X                                                                                                                             | <p>UNSON C G, ET AL: "RESIDUOS CON CARGA POSITIVA EN LAS POSICIONES 12, 17, Y 18 DE GLUCAGÓN ASEGURAN LA POTENCIA BIOLÓGICA MÁXIMA"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, volumen 273, N° 17, 1998, páginas 10308-10312, XP002495827</p> <p>El documento completo</p>                                                                 | <p>1-3, 10-19, 40, 50, 56-60</p> |
| <p>[x] Se mencionan otros documentos en la continuación del Casillero C.</p> <p>[x] Véase el anexo de familia de patentes</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                  |

\* Categorías especiales de "T": documento posterior documentos citados: publicado con posterioridad a "A": documento que define el la fecha de presentación estado general del arte que no internacional o a la fecha de se considera de particular prioridad y que no está en relevancia conflicto con la solicitud "E": documento anterior pero pero citado para comprender un publicado en la fecha de principio o teoría que presentación internacional o sustenta la invención. con posterioridad a ella. "X": documento de particular "L": documento que puede relevancia: la invención arrojar dudas sobre la reivindicada no puede reivindicación de prioridad o considerarse nueva o no puede que se cita para establecer la considerarse que implica un fecha de publicación de otra paso inventivo cuando el cita o por otra razón especial documento se toma solo. (especificada). "Y": documento de particular "O": documento que refiere a relevancia: la invención una revelación oral, uso, reivindicada no puede exhibición u otro medio. considerarse que implica un "P": documento publicado antes paso inventivo cuando el de la fecha de presentación documento se combina con otro internacional pero con u otros documentos, siendo posterioridad a la fecha de dicha combinación obvia para

|                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| prioridad reivindicada.                                                                                                                                                                                                                           | un experto en el arte.                                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                   | "&": documento miembro de la misma familia de patentes. |
| Fecha de la finalización efectiva de la búsqueda internacional                                                                                                                                                                                    | Fecha de envío del informe de búsqueda internacional    |
| 16 de septiembre de 2008<br>(18-03-2008)                                                                                                                                                                                                          | 9/10/2008                                               |
| Nombre y domicilio para Funcionario Autorizado correspondencia de la ISA/<br>Oficina de Patentes Europea, Chavanne, Franz<br>P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040<br>Tx 31 651 epo nl<br>Fax (+31-70) 340-3016 |                                                         |

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

|                                       |                                                                                                                                                                                                                                              | Solicitud Internacional N°<br>PCT/US2008/053857 |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| C. Documentos Considerados Relevantes |                                                                                                                                                                                                                                              |                                                 |
| Categoría*                            | Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes                                                                                                                                                                         | Relevante para la reivindicación N°             |
| X                                     | MCKEE R L, ET AL: "UNIÓN AL RECEPTOR Y ACTIVIDADES DE ADENILATO CICLASA DE ANÁLOGOS DE GLUCAGÓN MODIFICADOS EN LA REGIÓN DEL EXTREMO DE N"<br>BIOCHEMISTRY, volumen 25, 1986, páginas 1650-1656, XP002495828<br>El documento completo        | 1-3, 10-12, 15-19, 23, 33, 40, 56-60            |
| X                                     | SAPSE ANNE-MARIE ET AL: "El papel de la formación de puente de sal en el glucagón: Un estudio experimental y teórico de análogos de glucagón y fragmentos de péptido de glucagón"<br>MOLCULAR MEDICINE, BACKWELL SCIENCE, CAMBRIDGE, MA, US, | 1-3, 6, 10-13, 15, 16, 23, 33, 40, 56-60        |

|   |                                                                                                                                                                                                                                                          |                                          |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|   | volumen 8, N° 5, 1 de mayo de 2002 (1-05-2002), páginas 251-252, XP009105688 ISBN: 1076-1551 el documento completo                                                                                                                                       |                                          |
| X | WO 01/83527 A (AMGEN INC [US])<br>8 de noviembre de 2001 (8-11-2001)<br><br>Resumen<br><br>Página 4, línea 19 - página 5, línea 4 página 27, línea 23 - página 28, línea 25 página 30, líneas 14-17 página 36, líneas 17-23<br><br>secuencias 52, 59, 65 | 1-3, 10-13, 15-19, 23, 34, 35, 60, 56-60 |
| X | US 2004/002468 A1 (WADSWORTH SAMUEL C [US] ET AL) 1 de enero de 2004 (1-01-2004)<br><br>Resumen<br><br>Figuras 7, 11, 18<br><br>Párrafos [0003], [0006], [0009], [0022], [0025], [0027], [0047], [0053], [0054], [0065], [0066], [0069], [0072], [0074]  | 1-3, 13-19, 22, 23, 32, 40, 56-60        |

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/US2008/053857

## C. Documentos Considerados Relevantes

| Categoría* | Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                 | Relevante para la reivindicación N° |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| X, P       | <p>WO 2007/056362 A (UNIV INDIANA RES &amp; TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; SMILEY DAV) 18 de mayo de 2007 (18-05-2007)</p> <p>Resumen</p> <p>Página 1, línea 24 - página 5, línea 9</p> <p>Página 6, línea 27 - página 7, línea 5</p> <p>Página 8, línea 19 - página 23, línea 18</p> <p>Ejemplos 1-14</p> | 1-5, 8-23, 32-36, 40, 50-58, 60-64  |



|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| E | WO 2008/086086 A (UNIV INDIANA<br>RES % TECH CORP [US]; DIMARCHI<br>RICHARD DE [US]; DIMARCHI M) 17<br>de julio de 2008 (17-07-2008)<br>Resumen<br>Página 2, línea 24 - página 4,<br>línea 21<br>Página 7, líneas 24-29<br>Página 9, líneas 1-27<br>Página 11, líneas 1-24<br>Página 13, línea 1 - página 15,<br>línea 32<br>Página 18, línea 8-17<br>Página 21, línea 11-24<br>Página 23, línea 27 - página<br>28, línea 19<br>Ejemplos 1-14 | 1-5, 8-23, 32-36,<br>40, 50-64 |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |          |                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----------|-----------------------------------------------------|
| INFORME<br><br>INTERNACIONAL                                                                                                                                                                                                                                          | DE | BÚSQUEDA | Solicitud Internacional N°<br><br>PCT/US2008/053857 |
| Casillero N° II. Observaciones cuando ciertas reivindicaciones se consideraron no buscables (Continuación del punto 2 de la página 1).                                                                                                                                |    |          |                                                     |
| Este informe de búsqueda internacional no se ha establecido con respecto a ciertas reivindicaciones conforme a la Cláusula 17(2)(a) por los siguientes motivos:                                                                                                       |    |          |                                                     |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Reivindicaciones N°:<br><br>porque se relacionan con un objeto que no se requiere que busque esta Autoridad, a saber:                                                                                                          |    |          |                                                     |
| Aunque las reivindicaciones 58-64 se refieren a un método de tratamiento del cuerpo humano/de animal, la búsqueda se ha realizado y basado en los efectos supuestos del compuesto/composición.                                                                        |    |          |                                                     |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> Reivindicaciones N°:<br><br>porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos en tal magnitud que no se puede realizar una búsqueda significativa, específicamente: |    |          |                                                     |
| 3. <input type="checkbox"/> Reivindicaciones N°:<br><br>porque son reivindicaciones dependientes y no están redactadas                                                                                                                                                |    |          |                                                     |

de acuerdo con la segunda y tercera oraciones de la Norma 6.4(a).

Casillero N° III. Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la página 1)

La Autoridad de Búsqueda Internacional encontró varias invenciones en esta solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Como todos los aranceles de búsqueda adicionales se pagaron oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones buscables.

2. ☐ Como las reivindicaciones buscables pudieron buscarse sin esfuerzo que justifique un arancel adicional, esta Autoridad no intima al pago de ningún arancel adicional.

3. ☐ Como ninguno de los aranceles de búsqueda adicionales requeridos se pagaron oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca solamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron aranceles, específicamente las reivindicaciones N°:

4. ☐ El solicitante no pagó ninguno de los aranceles de búsqueda adicionales. En consecuencia, este informe de

búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; está abarcada por las reivindicaciones N°:

Observación Bajo Protesta:

☐ Los aranceles de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por el protesto del solicitante y cuando correspondía, el pago del arancel del protesto

☐ Los aranceles de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por el protesto del solicitante pero el arancel de protesto aplicable no se abonó dentro del plazo especificado en la invitación.

☐ Ningún protesto acompañó el pago de los aranceles de búsqueda adicionales.

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la página 1 (2)) (abril de 2005)

|                                                    |                      |                                                 |                      |
|----------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------|----------------------|
| INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL                  |                      | Solicitud Internacional N°<br>PCT/US2008/053857 |                      |
| Documento de patente citado en informe de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de familia de patentes               | Fecha de publicación |
| WO 0183527 A                                       | 8-11-2001            | AU 5579801 A                                    | 12-11-2001           |

|                |            |                |            |
|----------------|------------|----------------|------------|
|                |            | EP 1278772 A2  | 29-01-2003 |
|                |            | JP2003531632 T | 29-10-2003 |
|                |            | US2003032588A1 | 13-02-2003 |
| US2004002468A1 | 1-01-2004  | US2004143104A1 | 22-01-2004 |
| WO2007056362A  | 18-05-2007 | CA 2628241A1   | 18-05-2007 |
|                |            | EP 1959986A2   | 27-08-2008 |
| WO 2008086086A | 17-07-2008 | NINGUNA        |            |

Formulario PCT/ISA/210 (anexo de familia de patentes) (abril  
de 2005)

## TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la

AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

|                                                                                                                      |                                                                           |                                                                                                                                      |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>Para:</b><br>Véase el formulario<br>PCT/IA/220                                                                    |                                                                           | <b>PCT</b><br><b>OPINIÓN ESCRITA DE LA</b><br><b>AUTORIDAD DE BÚSQUEDA</b><br><b>INTERNACIONAL</b><br><b>(Norma 43bis.1 del PCT)</b> |  |
|                                                                                                                      |                                                                           | Fecha de remisión (día/mes/año)<br>Véase el formulario<br>PCT/ISA/210 (página 2)                                                     |  |
| Referencia de archivo del<br>Solicitante o Agente<br>Véase el formulario<br>PCT/ISA/220                              |                                                                           | <b>PARA OTROS TRAMITES</b><br>ver párrafo 2 más abajo                                                                                |  |
| Solicitud<br>Internacional No.<br>PCT/US2008/053857                                                                  | Fecha de<br>Presentación<br>internacional<br>(día, mes, año)<br>13-2-2008 | Fecha de prioridad<br>(día/mes/año)<br>15-2-2007                                                                                     |  |
| Clasificación Internacional de Patente (IPC) o tanto<br>clasificación nacional como IPC<br>INV. C07K14/605 A61K38/26 |                                                                           |                                                                                                                                      |  |
| Solicitante<br>INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY                                                            |                                                                           |                                                                                                                                      |  |

1. Esta opinión escrita contiene indicaciones relacionadas con los siguientes puntos:

☒ Casillero N° I. Fundamento del informe

☐ Casillero N° II. Prioridad

☒ Casillero N° III. No establecimiento de opinión sobre la novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial

☐ Casillero N° IV. Falta de unidad de invención

☒ Casillero N° V. Declaración fundamentada conforme a la Cláusula 35(2) sobre la novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que fundamentan dicha declaración.

☒ Casillero N° VI. Ciertos documentos citados

☐ Casillero N° VII. Ciertos defectos en la solicitud internacional

☐ Casillero N° VIII. Ciertas Observaciones sobre la solicitud internacional

## 2. OTRAS MEDIDAS

Si se presenta un pedido de informe preliminar internacional, esta opinión se considerará como la opinión escrita de la Autoridad de Examen de Búsqueda Internacional ("IPEA") excepto que ésta no corresponda cuando el solicitante elige una Autoridad diferente de ésta para que sea la IPEA y la IPEA elegida ha notificado a la Oficina Internacional conforme a la Norma 66.1bis(b) que la opinión escrita de esta Autoridad de

Búsqueda Internacional no se considerará así.

Si esta opinión, proporcionada anteriormente, se considera la opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una contestación escrita junto con, cuando corresponda, enmiendas, con anterioridad al vencimiento de tres meses desde la fecha de la remisión del Formulario PCT/ISA/220 o con anterioridad al vencimiento de 22 meses desde la fecha de la prioridad, la que sea posterior.

Para más opciones, véase el Formulario PCT/ISA/220.

3. Para más detalles, véase las notas al Formulario PCT/ISA/220

|                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                         |                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Nombre y domicilio para<br>correspondencia de la ISA/<br>Oficina de Patentes<br>Europea,<br>P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040<br>Tx 31 651 epo nl<br>Fax (+31-70) 340-3016 | Fecha de<br>finalización<br>de esta<br>opinión<br>Véase el<br>formulario<br>PCT/ISA/210 | Funcionario<br>autorizado<br>Chavanne, Franz<br>Teléfono N° +49 89<br>2399-8399 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|

Formulario (PCT/ISA/237) (Carátula) (abril de 2007)



OPINIÓN ESCRITA DE LA      Solicitud de Patente Internacional N°  
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA      PCT/US2008/053857  
INTERNACIONAL

Casillero N° I. Fundamento de esta opinión.

1. Con respecto al idioma, esta opinión se ha establecido basada en:

☒ la solicitud de patente internacional en el idioma en que se presentó.

☐ una traducción de la solicitud de patente internacional al \_\_\_\_\_, que es el idioma de la traducción provista para los propósitos de la búsqueda internacional (Normas 12.3 y 23.1(b)).

2. Esta opinión se ha establecido tomando en cuenta la **rectificación de un error evidente** autorizada o notificada por esta autoridad conforme a la Norma 91 (Norma 43bis.1(a)).

3. Con respecto a todas las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos que se describen en la solicitud de patente internacional y que son necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido basada en:

a. tipo de material:

☐ un listado de secuencias

☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencias

b. formato del material

☐ en papel

☐ en forma electrónica

c. fecha de presentación/provisión

☐ contenida en la solicitud de patente internacional presentada

☐ presentada junto con la solicitud de patente internacional en forma electrónica

☐ presentada con posterioridad ante esta Autoridad con propósitos de búsqueda.

4. ☐ Además, en caso de que se haya presentado o provisto más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o una tabla relacionada con él, se presentaron las declaraciones requeridas de que la información de las copias posteriores o adicionales es idéntica a aquella de la solicitud presentada o no va más allá de la solicitud presentada, según corresponda.

5. Declaraciones adicionales

Formulario PCT/ISA/237 (Casillero N° I) (abril de 2007)

## OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N° PCT/US2008/053857

Casillero N° III. No establecimiento de opinión sobre la novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas sobre si la invención reivindicada parece novedosa, involucra un paso inventivo (no es obvia) o es aplicable industrialmente no se han examinado con respecto a:

☐ la solicitud de patente internacional completa

☒ las reivindicaciones N° 58-64 (con respecto a la patentabilidad)

porque:

☐ la solicitud de patente mencionada, o las reivindicaciones mencionadas N° 58-64 (con respecto a la patentabilidad) se relacionan con la siguiente materia que no requiere un examen preliminar internacional (especifique):

véase la página aparte

☐ la descripción, las reivindicaciones o los dibujos (indique los elementos particulares a continuación) o las reivindicaciones mencionadas N° \_\_\_\_ son tan poco claras que no se puede formar una opinión sensata (especifique):

[ ] las reivindicaciones, o las reivindicaciones mencionadas N° \_\_\_\_ están tan insuficientemente sostenidas por la descripción que no se pudo formar ninguna opinión sensata.

[ ] no se ha establecido ningún informe de búsqueda internacional para las reivindicaciones mencionadas N° \_\_\_\_

[ ] no se pudo formar una opinión sensata sin el listado de secuencias; el solicitante, dentro del plazo establecido, no:

[ ] proporcionó un listado de secuencias en papel que cumpla con la norma establecida en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estaba disponible para la Autoridad de Búsqueda Internacional en una forma aceptable para ella.

[ ] proporcionó un listado de secuencias en forma electrónica que cumpla con la norma establecida en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad de Búsqueda Internacional en una forma aceptable para ella.

[ ] pagó el arancel por provisión tardía establecido para la provisión de un listado de secuencias en respuesta a una invitación conforme a la Norma 13ter.1(a) o (b).

[ ] no se pudo formar una opinión sensata sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante no presentó, dentro del plazo establecido, dichas tablas en forma

electrónica que cumplan con los requisitos técnicos establecidos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas, y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad de Búsqueda Internacional en una forma aceptable para ella.

[] las tablas relacionadas con el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, si está solamente en forma electrónica, no cumplen con los requisitos técnicos establecidos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

[] Véase el Casillero Suplementario para más detalles.

Formulario PCT/IPEA/237 (enero de 2004)

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N° PCT/US2008/053857

Casillero N° V. Declaración fundamentada conforme a la Cláusula 35(2) sobre la novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que fundamentan dicha declaración.

1. Declaración

Novedad (N) Sí: Reivindicaciones 4, 5, 7, 9, 20, 21, 24-31, 41-55, 60-65

No: Reivindicaciones 1-3, 6, 8, 10-19, 22, 23, 32-35, 40, 56-59

Paso Inventivo (IS) Sí: Reivindicaciones 4, 5, 7, 9, 20, 21, 24-31, 41-55, 60-65

No: Reivindicaciones 1-3, 6, 8, 10-19, 22, 23, 32-35, 40, 56-59

Aplicabilidad industrial (IA) Sí: Reivindicaciones 1-65

No: Reivindicaciones

## 2. Citas y Explicaciones:

Véase la página por separado

Casillero N° VI. Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Normas 43bis.1 y 70.10)

y/o

2. Documentos no escritos (Normas 43bis.1 y 70.9)

Véase el formulario 210

Solicitud de Patente

Internacional N°

PCT/US2008/053857

lacionan con el objeto que  
está cubierto por las  
del PCT. En consecuencia,  
ón con respecto a la  
de estas reivindicaciones

es documentos:

cubrimiento y optimización  
 afinidad en los receptores  
 G BIOLOGY USING PEPTIDES,  
 (2006-2005), páginas 763-764,

CON CARGA POSITIVA EN LAS  
AGÓN ASEGURAN LA POTENCIA  
OLOGICAL CHEMISTRY, volumen  
2, XP002495827

D3: MCKEE R L, ET AL: "UNIÓN AL RECEPTOR Y ACTIVIDADES DE ADENILATO CICLASA DE ANÁLOGOS DE GLUCAGÓN MODIFICADOS EN LA REGIÓN DEL EXTREMO DE N" BIOCHEMISTRY, volumen 25, 1986, páginas 1650-1656, XP002495828

D4: SAPSE ANNE-MARIE ET AL: "El papel de la formación de puente de sal en el glucagón: Un estudio experimental y teórico de análogos de glucagón y fragmentos de péptido de glucagón" MOLECULAR MEDICINE, BACKWELL SCIENCE, CAMBRIDGE, MA, US, volumen 8, N° 5, 1 de mayo de 2002 (1-05-2002), páginas 251-252, XP009105688 ISBN: 1076-1551

D5: WO 01/83527 A (AMGEN INC [US]) 8 de noviembre de 2001 (8-11-2001)

D6: US 2004/002468 A1 (WADSWORTH SAMUEL C [US] ET AL) 1 de enero de 2004 (1-01-2004)

D7: WO 2007/056362 A (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; SMILEY DAV) 18 de mayo de 2007 (18-05-2007)

D8: WO 2008/086086 A (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD DE [US]; DIMARCHI M) 17 de julio de 2008 (17-07-2008)



2. D1 describe la modificación de glucagón en las posiciones 12, 20, 24, 27 y/o 29. Los péptidos de D1 mantienen su actividad pero mejoran sus propiedades físicas. Los péptidos también son capaces de señalar en el receptor de GLP-1. Los péptidos de D1 comprenden SEQ ID N° 55 de la presente solicitud de patente.

Por lo tanto, en vista de D1, el objeto de las reivindicaciones 1-3, 8, 10-19, 40, 56 y 57 no es novedoso (Cláusula 33(2) del PCT).

3. D2 describe péptidos de glucagón modificados en las posiciones 12, 17 y/o 18. El efecto de estas mutaciones sobre la unión al receptor de glucagón y sobre la actividad de adenil ciclasa se ha examinado (resumen, página 10309, columna 1; Tablas I y II).

D2 no se refiere específicamente al porcentaje de actividad del péptido en relación con la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1. Sin embargo, esto no corresponde a ninguna característica técnica sino a una propiedad específica del producto. En este contexto, el Solicitante sabrá que, como norma general, la dilucidación de una característica novedosa (por ejemplo, el porcentaje de la actividad del péptido en relación con la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1 nativo) de un producto conocido (por ejemplo, un glucagón modificado que comprende la secuencia de SEQ ID N°

55) no está adaptado para reinstalar la novedad del producto conocido. Además, el solicitante también sabe que la actividad de un péptido depende de su secuencia de aminoácido. Por lo tanto, dos péptidos que tienen la misma secuencia de aminoácido automáticamente tendrían la misma actividad.

Por lo tanto, en vista de D2, el objeto de las reivindicaciones 1-3, 8, 10-19, 40, 56 y 57 no es novedoso.

4. D3 se refiere a péptidos de glucagón modificados en las posiciones 1 y 12 (resumen, página 1651, columna 2; página 1653; página 1654, columna 2).

Por lo tanto, en vista de D3, el objeto de las reivindicaciones 1-3, 10-12, 15-19, 23, 33, 40, 56 y 57 no es novedoso (Cláusula 33(2) del PCT).

5. D4 describe análogos de glucagón con un puente de lactama entre las posiciones 20 y 24, 9 y 12 o 2 y 5. Estos análogos tienen una amida en su extremo de C. Otras modificaciones tales como una modificación en la posición 1 también se mencionan en D4 (resumen; página 252; página 257; página 260, columna 2; Tabla I).

Por lo tanto, en vista de D4, el objeto de las reivindicaciones 1-3, 6, 10-13, 15, 16, 23, 33, 40, 56 y 57 no es novedoso (Cláusula 33(2) del PCT).

6. D5 describe análogos de glucagón no nativos que comprenden SEQ ID N° 5. La secuencia de estos glucagones difiere de la secuencia de glucagón nativo en las posiciones 2, 5 o 29. D5 menciona que estos péptidos también pueden ser PEGilados. Los péptidos de D5 se usan en el tratamiento de la diabetes (resumen, páginas 4, 5, 27, 28, 30 y 36; secuencias 52, 59 y 65).

Por lo tanto, en vista de D5, el objeto de las reivindicaciones 1-3, 10-13, 15-19, 23, 34, 35, 40, 56, 57 y 59 no es novedoso (Cláusula 33(2) del PCT).

7. D6 describe péptidos de glucagón de SEQ ID N° 55 y los péptidos de glucagón que comprenden SEQ ID N° 55. Estos análogos de glucagón se usan para el tratamiento de hipoglucemia, diabetes o para su efecto sobre la pérdida de peso (resumen, párrafos 3, 6, 18, 22, 25, 27, 47, 53, 54, 55, 65, 66, 69, 72 y 74; figuras 7, 11 y 18).

Por lo tanto, en vista de D6, el objeto de las reivindicaciones 1-3, 13-19, 22, 23, 32, 50 y 56-59 no es novedoso (Cláusula 33(2) del PCT).

8. La función de glucagón en la regulación de la glucosa también es conocida en el arte, así como lo es también la conexión con la parálisis temporaria del tracto intestinal. Por lo tanto, aplicando conocimientos básicos, el experto que

conoce cualquiera de D1-D6 automáticamente y en forma directa llegaría al objeto de la reivindicación 60. Por lo tanto, este objeto no es inventivo (Cláusula 56 del EPC).

9. La presente solicitud de patente describe péptidos de glucagón modificados de SEQ ID N° 12, 35, 36 y 39. Sin embargo, la presente solicitud de patente no describe específicamente ninguna de las secuencias reivindicadas. Además, fuera de declaraciones vagas e infundadas, la presente solicitud de patente no muestra ninguna actividad relacionada con los péptidos reivindicados. Por lo tanto, las presentes reivindicaciones 1-65 no están respaldadas po la descripción (Cláusula 6 del PCT).

En este contexto, el solicitante deberá saber que el alcance de una reivindicación debe reflejar el **aporte técnico real** de la solicitud de patente. **Las declaraciones vagas o afirmaciones infundadas que no tienen ningún contexto técnico no ofrecen ninguna base** (Cláusula 6 del PCT; véase también las Pautas del PCT, 5.44).

Además, considerando que el objeto reivindicado actualmente corresponde a una generación indebida del péptido de SEQ ID N° 12, 35 y 19, plantea la pregunta de si todos los péptidos de glucagón que están dentro del alcance de las reivindicaciones

1-65 podrían resolver el problema planteado (Cláusula 56 del EPC).

Además es cuestionable si todos los péptidos de SEQ ID N° 55 presentan por lo menos un 20% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1. Por lo tanto, el experto en el arte, enfrentado con el problema de proporcionar un glucagón no nativo que presente por lo menos un 20% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor del GLP-1 nativo no podría proporcionara sin la necesidad de aplicar una carga indebida de experimentaciones (Cláusula 5 del PCT).

10. El objeto para el cual se solicita protección en las reivindicaciones 1, 15-20 y 23 no se define claramente. El objeto de estas reivindicaciones se refiere a un glucagón no nativo e intenta definir el objeto en términos de un resultado que se debe alcanzar ("presenta...", "modificado para presentar..."). Dicha definición solamente es admisible en las condiciones elaboradas en las Pautas C-III, 4.7 del PCT. En esta instancia, sin embargo, dicha formulación no es admisible porque parece posible definir el objeto en términos más concretos, por ejemplo en cómo se ha de conseguir el efecto. En consecuencia, las reivindicaciones 1, 15-20 y 22 no cumplen con los requisitos de la Cláusula 6 del PCT.

11. Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 58-64 sobre la cuestión de si son patentables, no existe ningún criterio unificado en los Estados Firmantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como patentable el objeto de las reivindicaciones del uso de un compuesto en un tratamiento médico.

Con referencia al punto VI

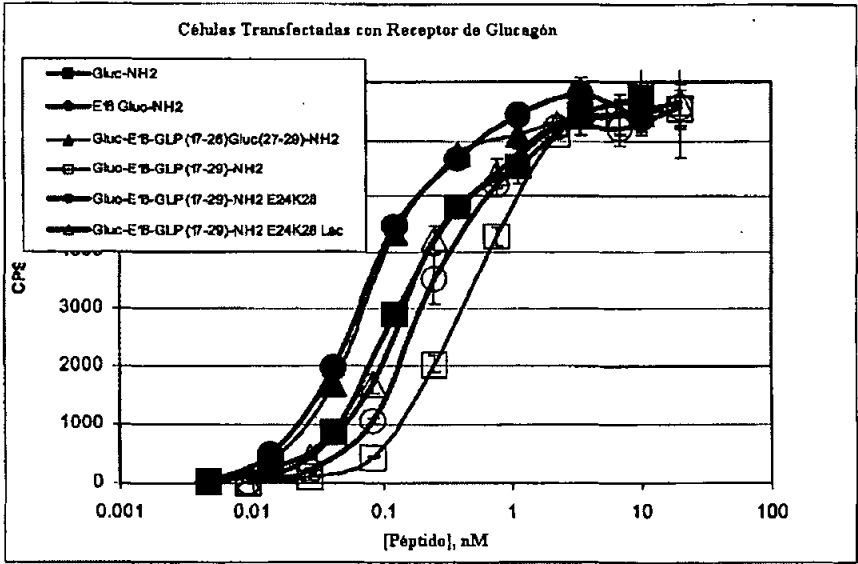
1. Ciertos documentos publicados (Norma 70.10)

WO 2007/056362

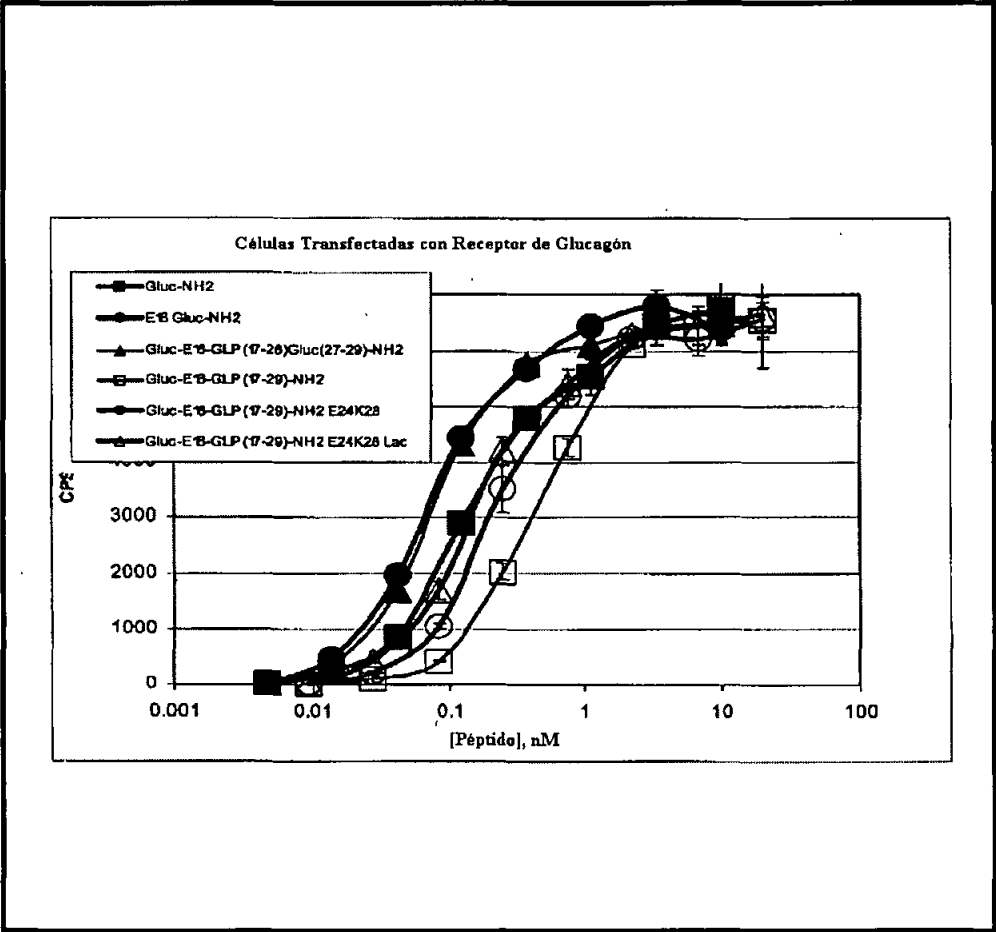
WO 2008/086086

|                                                                                                                                                                                                                |  |                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <div><div>Industria y Comercio<br/>SUPERINTENDENCIA</div></div>                                                               |  | <div>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO<br/>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES<br/>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN<br/>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</div>                                                                     |  |
| <div>(21) N° de solicitud:<br/><br/>(22) Fecha de solicitud: 11-09-2009</div>                                                                                                                                  |  | <div>(51) Int Cl:<br/><br/>(71) Solicitante(s) INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION.</div>                                                                                                                      |  |
| <div>(30) Prioridad SI<br/>(31) No. Priodidad 60/890,087<br/>60/938,565<br/>(32) Fecha 15/02/2007<br/>17/05/2007<br/>(33) País US<br/>US</div>                                                                 |  | <div>(72) Inventor(es) 1.- Jonathan Day;<br/>2.- James Patterson;<br/>3.- Joseph Chabenne;<br/>4.- Maria Dimarchi;<br/>5- David Smiley;<br/>6.- Richard D. DiMarchi;<br/><br/>(74) Apoderado: CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ</div> |  |
| <div>(85) Fecha limite inicio fase nacional:<br/>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br/>Fecha de presentación de la solicitud: 13-02-2008<br/>No. de solicitud PCT/US2008/053857</div> |  | <div>(87) Publicación internacional<br/>Fecha: 21-08-2008<br/>N° publicación: WO 2008/101017 A2</div>                                                                                                                             |  |
| <div>(54) Titulo: COAGONISTAS DE RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1</div>                                                                                                                                              |  |                                                                                                                                                                                                                                   |  |

Reivindicación(es):



1. Un péptido de glucagón no nativo que comprende la secuencia de SEQ ID N° 55 o un análogo de SEQ ID N° 55, en donde dicho análogo no es un péptido natural y dicho análogo difiere de SEQ ID N° 55 en 1 a 3 modificaciones de aminoácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28 y 29, en donde dicho péptido de glucagón presenta por lo menos un 20% de la actividad del receptor de GLP-1 en el receptor de GLP-1.







**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Folio 416

2020  
Bogotá D.C.,

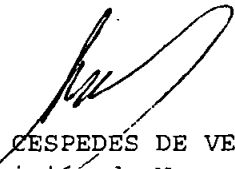
Doctor(a)  
MAYA RODRIGUEZ CARLOS ORLANDO  
Apoderado(a) y/o Representante de  
INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 9 97899           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2008/053857 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 15/09/2009        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 416               |
|            | Oficio No.                 | 8899              |
|            | Folios                     | 1                 |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase  
Dado en Bogotá DC,

**30 SET. 2009**

  
ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

adpall