

ROYAUME DU MAROC  
-----  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
-----



المملكة المغربية  
-----  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية  
-----

## (12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 39109 A1** (51) Cl. internationale : **C07K 14/605**

(43) Date de publication :  
**29.09.2017**

---

(21) N° Dépôt :  
**39109**

(22) Date de Dépôt :  
**11.12.2014**

(30) Données de Priorité :  
**18.12.2013 US 61/917,597**

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:  
**PCT/US2014/069643 11.12.2014**

(71) Demandeur(s) :  
**ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center Indianapolis, Indiana 46285 (US)**

(72) Inventeur(s) :  
**ALSINA-FERNANDEZ, Jorge ; CUMMINS, Robert Chadwick ; GUO, Lili**

(74) Mandataire :  
**H & H CONSULTING LAW FIRM**

---

(54) Titre : **NOUVEAU COMPOSÉ POUR LE TRAITEMENT DE L'HYPOGLYCÉMIE GRAVE**

(57) Abrégé : La présente invention concerne un nouveau composé utile dans le traitement de l'hypoglycémie.

**ABRÉGÉ**

La présente invention concerne un nouveau composé utile dans le traitement de l'hypoglycémie.

## NOUVEAU COMPOSÉ POUR LE TRAITEMENT DE L'HYPOGLYCÉMIE GRAVE

5 La présente invention concerne un composé présentant une solubilité et des stabilités chimique et physique améliorées par rapport au glucagon humain pour une utilisation dans le traitement du diabète et/ou de l'obésité.

Le glucagon humain, qui a la séquence d'acides aminés suivante : His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-  
10 Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1), est une hormone peptidique de 29 acides aminés produite dans le pancréas. Lorsque la glycémie commence à chuter, le glucagon donne au foie le signal pour décomposer le glycogène stocké en glucose pour une libération dans la circulation sanguine, ce qui provoque l'élévation du taux de glucose dans le sang.

15 Chez un sujet souffrant de diabète, une hypoglycémie peut survenir en tant qu'effet secondaire du traitement du diabète. En outre, la réponse du glucagon naturel à l'hypoglycémie chez les diabétiques peut être altérée, ce qui rend plus difficile le retour à la normale des taux de glucose. Si elle reste non traitée, une hypoglycémie grave ou aiguë peut causer des problèmes graves  
20 tels que des convulsions, une perte de conscience, des lésions cérébrales ou même la mort.

L'administration de glucagon est une thérapie établie pour le traitement de l'hypoglycémie aiguë. L'administration de glucagon en urgence permet de rétablir les taux normaux de glucose dans les minutes qui suivent  
25 l'administration. Le glucagon préparé pour une administration présente, cependant, plusieurs problèmes. Dans les tampons aqueux à pH physiologique ou pratiquement physiologique, le glucagon a une faible solubilité. Lorsqu'il est formulé à pH faible ou élevé, le glucagon présente également une stabilité chimique médiocre et une stabilité physique médiocre telle qu'une gélification et  
30 la formation d'agrégats solubles. Pour réduire au minimum ces problèmes, les produits actuels de glucagon du commerce sont fournis sous la forme d'une poudre lyophilisée avec des instructions pour la reconstitution au moment de

l'administration. Dans une situation d'urgence, la reconstitution d'une poudre lyophilisée est lourde et peu pratique. Par conséquent, il est souhaitable de procurer un composé à usage thérapeutique qui conserve la performance biologique du glucagon humain dans les conditions physiologiques tout en

5. présentant également une solubilité aqueuse, une stabilité chimique et une stabilité physique suffisantes dans des conditions non physiologiques.

Des analogues du glucagon avec des substitutions d'acides aminés pour améliorer la solubilité et la stabilité dans des tampons de pH acide et physiologiques sont décrits dans le document WO2008086086. Il persiste un

10. besoin d'un composé qui conserve la performance biologique du glucagon humain dans les conditions physiologiques, tout en présentant une solubilité et des stabilités chimique et physiques suffisantes dans des conditions non physiologiques.

En conséquence, la présente invention fournit un composé qui conserve

15. l'activité du glucagon de type sauvage, mais présente aussi une solubilité ainsi qu'une stabilité chimique et physique suffisantes. La présente invention procure également un composé qui est approprié pour une administration par l'intermédiaire d'une pompe et/ou une administration d'urgence. En outre, la présente invention fournit un composé qui peut être administré en association

20. avec un analogue de l'insuline à action rapide dans une pompe à chambre double pour fournir un contrôle glycémique en boucle fermée.

La présente invention fournit un composé comprenant la séquence d'acides aminés

His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-

25. Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2). La présente invention fournit également un composé constitué de la séquence d'acides aminés

His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-

30. Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2). Contre toute attente, il a été découvert que le composé de la présente invention présente une solubilité aqueuse accrue, une stabilité chimique accrue et une fibrillation réduite par

rapport au glucagon humain en solution aqueuse. En outre, le composé de la présente invention présente une solubilité améliorée à un pH dans la plage de 5 à 7. Le composé de la présente invention fournit également une activité similaire au glucagon humain - par exemple, la puissance, la durée d'action et la sélectivité au niveau du récepteur du glucagon par rapport au glucagon humain. Ainsi, le composé de la présente invention est approprié pour traiter une hypoglycémie, y compris une hypoglycémie grave ou aiguë. Les propriétés améliorées du composé de la présente invention permettent également la préparation de glucagon dans des solutions aqueuses pour une administration par l'intermédiaire d'une pompe et le traitement d'une hypoglycémie grave.

La présente invention fournit en outre une méthode de traitement de l'hypoglycémie chez un sujet comprenant l'administration d'un composé comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2. La présente invention fournit également une méthode de traitement de l'hypoglycémie chez un sujet comprenant l'administration d'un composé constitué de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2. La présente invention fournit en outre un composé comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 pour une utilisation en thérapie. La présente invention fournit également un composé constitué de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 pour une utilisation en thérapie. La présente invention fournit également un composé comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 pour une utilisation dans le traitement de l'hypoglycémie. La présente invention fournit également un composé constitué de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 pour une utilisation dans le traitement de l'hypoglycémie. La présente invention fournit un composé comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 pour une utilisation dans la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hypoglycémie. La présente invention fournit également un composé constitué de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 pour une utilisation dans la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hypoglycémie.

La présente invention fournit une composition pharmaceutique comprenant un composé comprenant une séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 et un tampon pharmaceutiquement acceptable. La présente

invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant un composé constitué de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 et un tampon pharmaceutiquement acceptable. La présente invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant un composé

5 comprenant une séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 et un tampon histidine. La présente invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant un composé constitué d'une séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 et un tampon histidine. La présente invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant un composé

10 comprenant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 et de l'histidine. La présente invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant un composé constitué de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 et de l'histidine. La présente invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant un composé comprenant une

15 séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 et une solution saline tamponnée à l'histidine. La présente invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant un composé constitué de la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO: 2 et une solution saline tamponnée à l'histidine. La composition pharmaceutique est de préférence une solution aqueuse. Tel qu'il

20 est utilisé ici, le terme « tampon pharmaceutiquement acceptable », est censé englober tous les tampons pharmaceutiques classiques connus de l'homme du métier. Un tampon pharmaceutiquement acceptable pour une administration parentérale comprend, par exemple, le sérum physiologique, une solution saline tamponnée au phosphate, une solution saline tamponnée au citrate et

25 une solution saline tamponnée à l'histidine. Des techniques de formulation pharmaceutique standards peuvent être utilisées telles que celles décrites dans Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Le composé de la présente invention peut être administré au moyen de n'importe quelle voie d'administration classique, telle que la voie parentérale,

30 intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire ou transdermique. Selon un mode de réalisation, le composé de la présente invention est administré par voie sous-cutanée ou intramusculaire.

La composition pharmaceutique peut avoir un pH qui est physiologiquement acceptable. Selon un mode de réalisation, la composition pharmaceutique peut avoir un pH compris entre environ 4 et environ 8. Plus  
5 préférablement, la composition pharmaceutique peut avoir un pH d'environ 5 à environ 6.

Une dose pour le composé de la présente invention peut être comprise entre environ 0,01 mg et environ 100 mg. La dose peut être comprise entre environ 0,01 mg et environ 10 mg. La dose peut également être comprise entre environ 0,1 mg et environ 3 mg. De plus, la dose peut être comprise entre  
10 environ 0,01 mg et environ 0,03 mg.

Le composé de la présente invention peut être fourni sous la forme d'un kit. Selon un mode de réalisation, le kit est muni d'un dispositif pour l'administration du composé à un sujet humain. Plus préférablement, le kit comprend une seringue et une aiguille pour l'administration du composé. De  
15 manière préférée entre toutes, le composé est pré-formulé en solution aqueuse dans la seringue.

Le composé de la présente invention peut également être utilisé dans un système de pompe, tel qu'une pompe à insuline ou un système de pompe bi-hormonale (par exemple, insuline-glucagon).

20 Tel qu'il est utilisé ici, le terme « quantité efficace », est censé désigner une quantité qui produit un effet thérapeutique souhaité sans provoquer d'effets secondaires inacceptables lorsqu'elle est administrée à un sujet. Par exemple, une « quantité efficace » d'un composé de la présente invention est la quantité qui se traduirait par un meilleur contrôle de la concentration de glucose dans le  
25 sang qu'en l'absence de traitement. Une « quantité efficace » d'un composé de la présente invention administrée à un sujet peut dépendre du type et de la gravité de la maladie et des caractéristiques du sujet, y compris, mais sans s'y limiter, l'état général de santé, l'âge, le sexe, le poids corporel, la tolérance aux  
les médicaments et la gravité de l'incapacité à réguler la glycémie.

30 Tel qu'il est utilisé ici, le terme « traiter », est censé désigner une amélioration des symptômes associés à un trouble ou un état spécifique, tel que l'hypoglycémie.

Les séquences d'acides aminés de la présente invention contiennent les codes standards à une lettre ou à trois lettres pour les vingt acides aminés naturels. En outre, « Aib » est un acide alpha-amino isobutyrique.

5 Tel qu'il est utilisé ici, « fibrillation » fait référence à la gélification et la formation d'agrégats solubles observées lorsque le glucagon est formulé à un pH faible ou élevé.

### Exemple 1 : Synthèse peptidique

10 Le composé de SEQ ID NO: 2 est généré par une synthèse peptidique en phase solide sur un Protein Technologies Inc. Symphony. La synthèse (échelle 0,125 mmole) est effectuée sur une résine de polystyrène amide Fmoc-Rink (Rapp Polymere Tubingen, Allemagne) avec une substitution d'approximativement 0,68 mmole/g. La synthèse est réalisée au moyen de la stratégie de groupe de protection de la chaîne principale Fmoc. Les dérivés de  
15 chaînes latérales d'acides aminés utilisés sont les suivants : Asp(O-tert-butyle, OtBu), Gln(Trityle, Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(tert-butoxy-carbonyl, Boc), Ser(OtBu), Thr(OtBu), Trp(Boc) et Tyr(OtBu). Un couplage est réalisé avec environ 10 équivalents d'acide aminé activé par du diisopropylcarbodiimide (DIC) et de l'hydroxybenzotriazole (HOBt) (rapport molaire 1:1:1) dans du  
20 diméthylformamide (DMF). Le couplage est effectué pendant 90 minutes à 4 heures à la température ambiante.

Un clivage concomitant de la résine et une élimination des groupes protecteurs de chaînes latérales est effectué dans une solution contenant un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA):triisopropylsilane:1,2-  
25 éthanedithiol:eau:thioanisole 90:4:2:2:2 (v/v) pendant 2 h à température ambiante. La solution est filtrée et le peptide est précipité avec de l'éther diéthylique froid et centrifugé à 4 000 tpm pendant 3 minutes (lavage à l'éther froid répété trois fois). Le peptide brut est dissous de nouveau dans 40 ml d'eau contenant 10 % d'acide acétique et purifié sur une colonne de chromatographie  
30 liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse en C<sub>18</sub> (Waters Symmetry Prep 7 µm, 19 x 300 mm) à un débit de 18 ml/min. L'échantillon est élué avec un gradient linéaire AB de 15 à 55 % de B sur 100 minutes, où A =



0,05 % de TFA/H<sub>2</sub>O et B = 0,04 % de TFA/acétonitrile. Le produit s'élué généralement à environ 26 à 28 % d'acétonitrile. La pureté du peptide et le poids moléculaire sont confirmés sur un système de chromatographie liquide-spectrométrie de masse (CL-SM) Agilent Série 1100 avec un détecteur SM  
5 quadripôle simple. Une séparation par CLHP analytique est effectuée sur une colonne Waters SymmetryShield RP18, 3,5 µm, colonne de 4,6 mm x 100 mm avec un gradient AB linéaire de 10 à 100 % de B sur 15 minutes dans lequel A = 0,05 % de TFA/H<sub>2</sub>O et B = 0,04 % de TFA/40 % d'H<sub>2</sub>O/60 % d'acétonitrile et le débit est de 0,7 ml/min (longueur d'onde de 220 nm). Le composé est purifié  
10 à > 95 % de pureté et on confirme qu'il a un poids moléculaire correspondant à la valeur calculée dans 1 unité de masse atomique (uma).

Le sel de TFA est converti en sel acétate à l'aide d'une résine AG 1-X8 (Bio-Rad, forme acétate, 100 à 200 mesh, 3,2 mEq/g sec, teneur en humidité de 39 à 48 % en poids) (résine échangeuse d'anions). Par exemple, 422 mg de  
15 peptide sont dissous dans 120 ml d'acétonitrile à 30 %/H<sub>2</sub>O. 40 g de résine (rapport molaire d'un facteur d'environ 100 par rapport aux charges positives du peptide) sont ajoutés. La solution de mélange est mélangée par agitation rotative à température ambiante pendant 1 heure. La solution de mélange est filtrée et la résine est lavée 5 fois avec de l'ACN à 30 %/H<sub>2</sub>O. La solution  
20 d'origine et la solution lavée sont réunies et lyophilisées.

### Solubilité et stabilité chimique

Le composé de SEQ ID NO: 2 est dissous dans de l'H<sub>2</sub>O à une concentration de 10 mg/ml (teneur en peptide), filtré à travers un filtre de  
25 0,22 µm (Millex, SLGV004SL), puis dilué à raison de 1 mg/ml dans du tampon P-5 (10 mM d'histidine, 150 mM de NaCl dans de l'H<sub>2</sub>O, pH 5,0) ou du tampon P6 (10 mM d'histidine, 150 mM de NaCl dans de l'H<sub>2</sub>O, pH 6,0). Chaque solution est transférée dans trois flacons et autoclavée. Les échantillons sont ensuite conservés à 4 °C, 30 °C et 40 °C. Les échantillons sont évalués  
30 visuellement à des moments différents pour la turbidité et la séparation des phases. La stabilité du composé est évaluée par une CLHP analytique en phase inverse (RP-HPLC) sur une colonne Phenomenex Aeris Widepore,

3,6  $\mu\text{m}$ , XB-C18 4,6 x 100 mm (P/NO 00D-4482-E0) chauffée à 60 °C avec un gradient AB (A = 0,05 % de TFA/H<sub>2</sub>O ; B = 0,04 % de TFA/acétonitrile) de 5 % de B isocratique sur 5 min, 5 à 25 % de B sur 20 minutes, 25 à 30 % de B sur 30 min, et 30 à 45% de B sur 10 min, avec un débit de 1,2 ml/min (longueur d'onde de 220 nm).

Le composé de SEQ ID NO: 2 conserve une bonne solubilité à 4 °C, 30 °C et 40 °C à pH 5 (tampon P5) et à pH 6 (tampon P6) sur 4 semaines à la fois par évaluation visuelle et par RP-HPLC. L'aspect physique est limpide à incolore, sans opalescence et sans particules. La récupération par RP-HPLC est quantitative comme cela est démontré dans le tableau 1.

**TABLEAU 1**

Tampon	Surface totale de pic Jour 0	4°C Surface totale de pic 4 sem	30°C Surface totale de pic 4 sem	40°C Surface totale de pic 4 sem	30°C vs 4°C Récupération 4 sem	40°C vs 4°C Récupération 4 sem
P5	4 903	4 933	4 932	4 932	100 %	100 %
P6	4 885	4 918	4 911	4 960	100 %	101 %

Le composé de SEQ ID NO: 2 conserve également une stabilité chimique à pH 5 (tampon P5) et à pH 6 (tampon P6) lorsqu'il est maintenu à 4 °C, 30 °C et 40 °C pendant 4 semaines. Comme cela est démontré dans le tableau 2, l'évaluation des échantillons par RP-HPLC indique des changements du pic principal de moins de 1 % pour les deux, à pH 5 (tampon P5) et à pH 6 (tampon P6) après 4 semaines à 30 °C par rapport à 4 °C, moins de 6 % à pH 5 (tampon P5) après 4 semaines à 40 °C par rapport à 4 °C, et moins de 4 % à pH 6 (tampon P6) après 4 semaines à 40 °C par rapport à 4 °C.

TABLEAU 2

Tampon	% du pic principal Jour 0	4°C % du pic principal	30°C % du pic principal	40°C % du pic principal
P5	99,55	98,01	97,07	92,64
P6	99,02	98,60	97,71	95,00

### Test de stabilité physique à l'aide d'un essai de liaison de thioflavine T

La fibrillation est un problème courant lorsque le glucagon est formulé en solution aqueuse. Afin d'évaluer le degré de fibrillation du composé de la présente invention, un essai de liaison à la thioflavine T est réalisé.

Le composé de SEQ ID NO: 2 est dissous dans différents tampons d'essai à raison de 1 mg/ml dans des flacons de Fisher de 2,5 ml à fond plat (Fisher FS60965D) contenant un barreau d'agitation de très petite taille (n° de catalogue Fishers 1451364). Des tampons d'essai sont préparés dans de l'H<sub>2</sub>O et sont tous ajustés à pH 6,0 :

Tampon 1 = 20 mM d'histidine

Tampon 2 = 10 mM d'histidine, 150 nM de NaCl

Tampon 3 = 10 mM d'histidine, 300 mM de sorbitol

Tampon 4 = 10 mM d'histidine, 0,02 % de Tween 80

Tampon 5 = 10 mM d'histidine, 300 mM d'arginine

Tampon 6 = 10 mM d'histidine, 300 mM de saccharose

En outre, du glucagon humain (SEQ ID NO: 1) est dissous dans une solution de glycérol à 12 mg/ml à pH 2,8 jusqu'à une concentration finale de glucagon de 1 mg/ml. Tous les échantillons sont soumis à un stress mécanique à 25 °C dans une plaque d'agitation magnétique réglée à 300 tpm. Des aliquotes des différents échantillons (aliquote de 100 µl chacune et effectuée en triple exemplaire) sont prélevées aux points dans le temps 0, 40 et 120 heures, et sont ajoutées à une plaque, suivies de 10 µl de thioflavine T 1 mM (T35516-25G, Sigma Aldrich) (solution mère 1 mM dans de l'H<sub>2</sub>O, pH 2,8). Les échantillons sont incubés pendant 30 min. La fluorescence est mesurée à l'aide d'un Spectramax M5 (Molecular Devices) en utilisant 440 nm comme longueur

- d'onde d'excitation, et la longueur d'onde d'émission est fixée à 480 nm avec un seuil de coupure de 475 nm et un réglage automatique de la sensibilité. Les données brutes sont collectées à l'aide d'un Softmax Pro 5.4.1 (Molecular Devices) et importées dans Excel. La moyenne des 3 puits pour chaque point
- 5 dans le temps devient les unités de fluorescence rapportées, indiquées dans le tableau 3 ci-dessous :

TABLEAU 3

Échantillon	t = 0 h	t = 40 h	t = 120 h
SEQ ID NO: 2 dans le tampon 1	74,6	76,9	89,2
SEQ ID NO: 2 dans le tampon 2	130,1	137,3	137,0
SEQ ID NO: 2 dans le tampon 3	68,1	71,4	72,4
SEQ ID NO: 2 dans le tampon 4	51,9	56,2	57,4
SEQ ID NO: 2 dans le tampon 5	113,9	120,0	123,2
SEQ ID NO: 2 dans le tampon 6	78,0	74,1	88,9
Glucagon humain (SEQ ID NO: 1) dans du glycérol à 12 mg/ml, pH 2,8	37,9	620,4	1 416,3
Tampon 1	33,4	36,4	34,2
Tampon 2	30,8	32,7	31,7
Tampon 3	34,5	36,5	36,2
Tampon 4	27,0	28,8	26,8
Tampon 5	43,8	46,1	44,7
Tampon 6	51,0	52,8	55,0
Glycérol à 12 mg/ml, pH 2,8	28,2	31,4	29,4

- 10 Comme indiqué dans le tableau 3, le composé de SEQ ID NO: 2 conserve une stabilité physique à 25 °C et pH 6, en présence d'un stress mécanique, tel qu'évalué à la fois par une évaluation visuelle et les essais de liaison à la thioflavine T. Le composé de SEQ ID NO: 2 n'a pas présenté de fibrillation telle que mesurée par l'essai de liaison à la thioflavine T.

15

#### **Effets du composé sur les taux de glucose sanguin chez des souris mâles C57/BL6**

- Afin de déterminer les effets du composé de SEQ ID NO: 2 sur les taux de glucose dans le sang, le composé est administré à des souris C57/B16. Des
- 20 souris C57BL6 mâles âgées de trois mois (Harlan Laboratories) sont utilisées.

Les animaux sont logés individuellement dans une animalerie à température contrôlée (24 °C) avec un cycle de 12 heures de lumière/obscurité, et ont accès libre à la nourriture et à l'eau. Après 1 semaine d'acclimatation à l'animalerie, les souris sont randomisées en groupes de traitement (n = 4/groupe). Le composé d'essai est formulé dans du tampon 2 (voir test de stabilité physique à l'aide d'un essai de liaison de thioflavine T). Le matin du test, la nourriture est enlevée à 08h00. Deux heures après le retrait de la nourriture, le composé d'essai est administré par voie sous cutanée aux doses de 0, 1, 3 ou 10 µg/kg. La glycémie est mesurée aux temps 0, 15, 30, 60 et 120 minutes après l'administration du composé d'essai à l'aide d'un glucomètre ACCU-CHECK® (Roche Diagnostics). Le tableau 4 montre les valeurs du glucose aux différents points dans le temps. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur-type (SEM) de 4 souris par groupe.

La DE<sub>50</sub> est calculée sur les 30 minutes de mesures du glucose. Le taux de glucose sanguin à 10 µg/kg de composé de SEQ ID NO: 2 est pris comme étant la valeur maximale. Pour le composé de SEQ ID NO: 2, la DE<sub>50</sub> est de 3,28 µg/kg (intervalle de confiance à 95 %). Les résultats démontrent que le composé de SEQ ID NO: 2 est apte à augmenter la glycémie.

20 **TABLEAU 4**

Temps (minutes)	Taux de glucose sanguin (mg/dl) après administration du composé de SEQ ID NO: 2			
	0 µg/kg	1 µg/kg	3 µg/kg	10 µg/kg
0	141,0 ± 2,0	165,3 ± 16,7	148,0 ± 4,6	155,4 ± 10,1
15	185,1 ± 11,5	212,0 ± 12,6	234,1 ± 9,8	270,0 ± 12,7
30	193,5 ± 14,6	203,1 ± 13,1	242,1 ± 8,3	308,5 ± 2,6
60	170,8 ± 6,2	169,9 ± 10,1	169,4 ± 7,3	212,4 ± 8,3
120	140,2 ± 3,0	141,0 ± 4,2	148,2 ± 10,9	152,4 ± 1,5

### Essai de liaison au récepteur du glucagon humain

La liaison du composé de SEQ ID NO: 2 est déterminée au moyen d'une lignée cellulaire 293HEK surexprimant le récepteur du glucagon humain (hGR) (Lok S. et al. Gene 140 (2), 203-209 (1994) ; GenBank : L20316).

- 5 Des membranes plasmiques brutes sont préparées au moyen de cellules provenant d'une culture en suspension ou d'une culture adhérente. Les culots cellulaires sont lysés sur de la glace dans un tampon d'homogénéisation hypotonique (25 mM de Tris HCl, pH 7,5, 1 mM de  $\text{mgCl}_2$ , et inhibiteurs Complete™ Inhibitors Roche sans EDTA (Roche, 11873580001)) avec une
- 10 DNase à 20  $\mu\text{g/ml}$  (Invitrogen, 18047-019). La suspension cellulaire est homogénéisée au moyen d'un homogénéiseur Dounce en verre à l'aide d'un pilon en téflon en 25 coups. L'homogénat est centrifugé à 1 800 X g à 4 °C pendant 15 min. Le surnageant est recueilli et le culot est remis en suspension dans un tampon d'homogénéisation hypotonique (sans DNase) et ré-
- 15 homogénéisé. Le mélange est centrifugé à 1 800 X g pendant 15 min. Le deuxième surnageant est combiné au premier surnageant et centrifugé à 1 800 X g pendant 15 min pour le clarifier. Ce surnageant clarifié est encore centrifugé à 25 000 X g pendant 30 min à 4 °C. Le culot membranaire est remis en suspension dans du tampon d'homogénéisation hypotonique (sans DNase)
- 20 et stocké sous forme d'aliquotes congelées à -80 °C jusqu'à utilisation.

- Le glucagon humain est radioiodé par une procédure à la  $^{125}\text{I}$ -lactoperoxydase et purifié par CLHP en phase inverse à Perkin-Elmer/NEN (NEX207). L'activité spécifique est d'environ 2 200 Ci/mmmole. La détermination du  $K_D$  est réalisée par une compétition homologe au lieu d'une liaison à
- 25 saturation en raison de la teneur élevée en propanol dans le matériau de glucagon marqué au  $^{125}\text{I}$ . Le  $K_D$  est estimé être de 1,24  $\eta\text{M}$  et est utilisé pour calculer les valeurs de  $K_i$  pour tous les composés testés.

- L'essai de liaison de récepteur est réalisé à l'aide d'un dosage de scintillation par proximité (SPA pour « Scintillation Proximity Assay ») (Sun, S.,
- 30 Almaden, J. Carlson, T. J., Barker, J. et Gehring, M. R. Assay development and data analysis of receptor-ligand binding based on scintillation proximity assay. *Metab Eng.* 7 : 38-44 (2005)) avec des billes d'agglutinine de germes de blé

(WGA pour « wheat germ agglutinin ») (Perkin-Elmer) préalablement bloquées avec de la sérumalbumine bovine (SAB) sans acides gras à 1 % (Gibco, 7,5 % de SAB). Le glucagon (SEQ ID NO: 1) et le composé (SEQ ID NO: 2) sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 2 mM et stockés congelés à -20 °C.

Le glucagon et le composé de SEQ ID NO: 2 sont dilués en série dans du DMSO. 10 µl d'échantillons dilués sont transférés dans des plaques d'essai à fond clair Corning 3632 contenant 40 µl de tampon d'essai de liaison (25 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique (HEPES), pH 7,4, 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % de SAB sans acide gras, 0,003 % de Tween20, et inhibiteurs Complete Inhibitors Roche sans EDTA) ou de glucagon froid (liaison non spécifique (NSB) à 1 µM final). 90 µl de membranes (3 µg/puits), 50 µl de glucagon marqué au <sup>125</sup>I (concentration finale de 0,15 nM dans la réaction), et 50 µl de billes de WGA (150 µg/puits) sont ajoutés. La concentration de DMSO ne dépasse pas 4,2 %. Les plaques sont scellées, mélangées par retournement, et lues à l'aide d'un compteur à scintillation MicroBeta® après 12 heures de temps de décantation à la température ambiante.

Les résultats sont calculés en pourcentage de la liaison spécifique de glucagon marqué au <sup>125</sup>I en présence de composé. La concentration CI<sub>50</sub> absolue du composé est obtenue par régression non linéaire du pourcentage de liaison spécifique du glucagon marqué au <sup>125</sup>I par rapport à la concentration d'échantillon ajouté ( $8,5 \times 10^{-12}$  à  $0,5 \times 10^{-7}$  mole/l). La dose de CI<sub>50</sub> est convertie en Ki à l'aide de l'équation de Cheng-Prusoff (Cheng Y., Prusoff W. H., Biochem. Pharmacol. 22 : 3099-3108 (1973)). Le Ki du composé de SEQ ID NO: 2 était de  $0,397 \pm 0,062$  nM (n = 7) pour la liaison de hGR (le Ki pour le glucagon humain était de  $1,66 \pm 0,09$  nM (n = 47) pour la liaison de hGR). Ces données démontrent que le composé de SEQ ID NO: 2 se lie à hGR avec une affinité accrue par rapport au glucagon humain et peut activer ce récepteur déclenchant, à son tour, des réponses physiologiques dépendantes du glucagon.

**Essai de liaison au récepteur du glucagon de souris**

Afin de déterminer si le composé de SEQ ID NO: 2 se lie au récepteur du glucagon de souris (mGR), un essai de liaison essentiellement comme décrit dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain est effectué. Des membranes plasmiques brutes sont préparées à partir de cellules 293HEK dans une culture en suspension exprimant un mGR cloné. ((Burcelin R, Li J, Charron M. J. Gene 164 (2), 305-10 (1995) GenBank : L38613). Des culots membranaires sont préparés comme décrit dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain, remis en suspension dans du tampon d'homogénéisation et stockés sous forme d'aliquotes congelées à -80 °C jusqu'à utilisation.

Le glucagon humain est radioiodé par une procédure à la <sup>125</sup>I-lactoperoxydase et purifié par CLHP en phase inverse à Perkin-Elmer/NEN (NEX207). L'activité spécifique est d'environ 2 200 Ci/mmmole. La détermination du  $K_D$  est réalisée par une compétition homologue au lieu d'une liaison à saturation en raison de la teneur élevée en propanol dans le matériau de glucagon marqué au <sup>125</sup>I. Le  $K_D$  est estimé être de 2,05 nM et est utilisé pour calculer les valeurs de  $K_i$  pour tous les composés testés.

L'essai de liaison de récepteur SPA et le calcul des résultats sont effectués comme décrit dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain. Le  $K_i$  du composé de SEQ ID NO: 2 était de  $0,494 \pm 0,054$  nM ( $n = 7$ ) pour la liaison de mGR (le  $K_i$  pour le glucagon humain était de  $1,37 \pm 0,07$  nM ( $n = 33$ ) pour la liaison de mGR). Ces données démontrent que le composé de SEQ ID NO: 2 se lie au mGR avec une affinité accrue par rapport au glucagon humain et peut activer ce récepteur déclenchant, à son tour, des réponses physiologiques dépendantes du glucagon.

**Essai de liaison au récepteur du peptide de type glucagon 1**

Afin de déterminer si le composé de SEQ ID NO: 2 se lie au récepteur du peptide de type glucagon 1 humain (hGLP-1R), un essai de liaison essentiellement comme décrit dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain est effectué. Des membranes plasmiques brutes sont préparées à partir de cellules 293HEK en suspension exprimant un récepteur du peptide de type



glucagon 1 humain cloné (hGLP-1R) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun 196 (1) : 141-6 (1993) GenBank : NM\_002062) isolé à partir des membranes 293HEK. Des culots membranaires sont préparés comme décrit dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain, remis en suspension dans du tampon d'homogénéisation et stockés sous forme d'aliquotes congelées à -80 °C jusqu'à utilisation.

Un amide de peptide de type glucagon 1 (amide GLP-1) (SEQ ID NO: 3) est radioiodé par la procédure à la  $^{125}\text{I}$ -lactoperoxydase et purifié par CLHP en phase inverse à Perkin-Elmer/NEN (NEX207). L'activité spécifique est d'environ 2 200 Ci/m mole. La détermination du  $K_D$  est réalisée par une compétition homologue au lieu d'une liaison à saturation en raison de la teneur élevée en propanol dans le matériau GLP-1 marqué au  $^{125}\text{I}$ . Le  $K_D$  est estimé être de 0,329 nM et est utilisé pour calculer les valeurs de  $K_i$  pour tous les composés testés.

L'essai de liaison de récepteur SPA et le calcul des résultats sont effectués comme décrit dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain à l'exception du fait que l'amide de GLP-1 radioiodé est utilisé à la place du glucagon radioiodé de l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain.

Le  $K_i$  du composé de SEQ ID NO: 2 était de  $1\,221 \pm 78$  nM ( $n = 6$ ) pour la liaison du hGLP-1R et le  $K_i$  du glucagon (SEQ ID NO: 1) était de  $2\,098 \pm 91$  nM ( $n = 17$ ) (le  $K_i$  pour l'amide 7-36 du GLP-1 humain était de  $0,427 \pm 0,169$  nM ( $n = 64$ ) pour la liaison de hGLP-1R). Ces données démontrent que le composé de SEQ ID NO: 2 se lie à hGLP-1R avec une affinité faible, et par conséquent, n'initie pas de réponses physiologiques médiées par GLP-1R.

#### **Essai de liaison au récepteur du peptide insulino-trope dépendant du glucose**

Afin de déterminer si le composé de SEQ ID NO: 2 se lie au récepteur du peptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP-R), un essai de liaison essentiellement comme décrit dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain est effectué. Des membranes plasmiques brutes sont préparés à partir

d'une suspension de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO-S) exprimant GIP-R humain (R (Usdin, T. B., Gruber, C., Modi, W. et Bonner, T. I., GenBank : AAA84418.1) à l'aide de cellules provenant d'une culture en suspension. Des culots membranaires sont préparés comme décrit dans le  
5 l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain, remis en suspension dans du tampon d'homogénéisation et stockés sous forme d'aliquotes congelées à -80 °C jusqu'à utilisation.

Le GIP (SEQ ID NO: 4) est radioiodé par la procédure à la <sup>125</sup>I-lactoperoxydase (Markalonis, J. J., *Biochem. J.* 113 : 299. (1969)) et purifié par  
10 CLHP en phase inverse à Perkin-Elmer/NEN (NEX-402). L'activité spécifique est de 2 200 Ci/mme. La détermination du  $K_D$  est réalisée par une compétition homologue en utilisant du GIP humain froid au lieu d'une liaison à saturation. Le  $K_D$  est estimé être de 0,174 nM et est utilisé pour calculer les valeurs de  $K_i$  pour tous les composés testés.

15 L'essai de liaison de récepteur SPA et le calcul des résultats sont effectués comme décrit dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain à l'exception du fait que le GIP radioiodé est utilisé à la place du glucagon radioiodé de l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain.

Le  $K_i$  du composé de SEQ ID NO: 2 était de  $1\ 054 \pm 167$  nM ( $n = 7$ ) pour  
20 la liaison de GIP-R humain et le  $K_i$  du glucagon (SEQ ID NO: 1) était  $> 3\ 010$  ( $n = 1$ ) (le  $K_i$  pour le GIP 1-42 humain était de  $0,279 \pm 0,021$  nM,  $n = 2$ ). Ces données démontrent que le composé de SEQ ID NO: 2 se lie à hGIP-R avec une affinité faible, et par conséquent, n'initie pas de réponses physiologiques médiées par hGIP-R.

25

#### **Essai fonctionnel de l'AMPc stimulé par le récepteur du glucagon humain.**

L'essai fonctionnel de l'AMPc stimulé par l'HGR utilise la même lignée de cellules clonées exprimant hGR que celle utilisée pour l'essai de liaison de l'hGR décrit ci-dessus dans l'essai de liaison au récepteur du glucagon humain.  
30 Les cellules sont stimulées avec le glucagon, des témoins tampons, ou des échantillons d'essai, et l'AMPc généré au sein de la cellule est quantifié à l'aide du kit de dosage CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF Assay Kit (62AM4PEC). En

résumé, les taux d'AMPC dans la cellule sont détectés par liaison à l'anticorps de capture d'AMPC-d2 en présence d'un tampon de lyse cellulaire. Un deuxième anticorps de détection fourni dans le kit, anti-cryptate d'AMPC, est ajouté pour créer un dosage compétitif en sandwich. Lorsque le complexe  
5 d'anticorps de détection est formé il y a une augmentation du signal qui est mesuré sur un instrument Perkin-Elmer Envision®.

Les cellules hGR-HEK293 sont récoltées à partir de boîtes de culture tissulaire sous-confluentes avec de la solution de dissociation de cellules sans enzyme (Specialty Media 5-004-B). Les cellules sont sédimentées à 100 X g à  
10 température ambiante pendant 5 minutes, puis lavées deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Le culot cellulaire lavé est remis en suspension à raison de  $1 \times 10^7$  cellules/ml dans du milieu Recovery™ Freeze Media (Gibco 2044) et congelé dans de l'azote liquide. Le jour du traitement, une aliquote congelée de cellules est transférée dans du milieu de  
15 remise en suspension cellulaire préchauffé (DMEM, Gibco (31053P) contenant 0,5 % de SVF défini (Hyclone SH30070) ; 20 mM d'HEPES, pH 7,4, et 2 mM de glutamine). Les cellules sont ensuite sédimentées à 100 X g à température ambiante pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu cellulaire (DMEM, Gibco (31053P) avec  
20 0,1 % de sérumalbumine bovine sans acide gras, SAB, 7,5 % (Gibco 15620) ; 20 mM d'HEPES, pH 7,4, et 2 mM de glutamine) à raison de  $1,25 \times 10^5$  cellules/ml. Les échantillons d'essai sont préparés sous la forme de solutions mères à 2 mM dans du DMSO et congelés à -20 °C jusqu'à leur utilisation. Le glucagon, les témoins tampon et le composé de SEQ ID NO: 2,  
25 sont dilués en série dans du DMSO suivi d'une dilution de décroissance dans du milieu de dilution de composé (Assay Media (DMEM, Gibco 31053P avec 0,1 % de sérumalbumine bovine sans acide gras, SAB, 7,5 % (Gibco 15620) ; 20 mM d'HEPES, pH 7,4, et 2 mM de glutamine) qui contient 500 µM d'IBMX). La réaction est réalisée sous 40 µl, par l'ajout de 20 µl de cellules  
30 (2 500 cellules/puits) ou d'échantillons de la courbe d'étalonnage d'AMPC à des plaques de 96 puits demi-zone noires (Costar 3694), suivi par l'ajout de 20 µl de glucagon concentré 2X, de témoins tampon ou de composé de SEQ ID NO: 2

dans le milieu de dilution de composé. La concentration finale de DMSO ne dépasse pas 1,1 %, et la concentration finale d'IBMX est de 250  $\mu$ M. La réaction est arrêtée par l'ajout de 20  $\mu$ l de l'anticorps de capture d'AMPC-d2 (CisBio) dilué dans le tampon de lyse CisBio, puis mélangé doucement dans un

5 agitateur TITERTEK. Après 5 minutes de lyse, 20  $\mu$ l de l'anticorps de détection, anti-cryptate d'AMPC (CisBio), sont ajoutés et mélangés à 600 tpm pendant 1 minute, puis agités à 300 tpm. Les mélanges d'anticorps et de cellules lysées sont lus après 1 heure à la température ambiante au moyen du Perkin-Elmer Envision®. Les unités Envision® ont été converties en pmole/l d'AMPC/puits à

10 l'aide de la courbe d'étalonnage d'AMPC. Les picomoles d'AMPC produit dans chaque puits sont converties en un pourcentage de la réponse maximale observée avec le témoin glucagon. Une valeur de  $CE_{50}$  relative est dérivée par analyse de régression non linéaire en utilisant le pourcentage de la réponse maximale par rapport à la concentration ( $0,17 \times 10^{-12}$  à  $1 \times 10^{-8}$  M) de peptide

15 ajouté.

Le composé de SEQ ID NO: 2 se lie à hGR avec une  $CE_{50}$  de  $0,0356 \pm 0,0071$  nM (n = 8) (la  $CE_{50}$  pour le glucagon humain était de  $0,0142 \pm 0,0018$  nM, n = 6). Ces données démontrent que le composé de SEQ ID NO: 2 se lie et active hGR et peut ainsi initier des réponses physiologiques médiées

20 par le récepteur du glucagon.

**Listage des séquences**

Glucagon humain :

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**)

5

Exemple 1

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

10

GLP-1 humain :

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-  
Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH<sub>2</sub> (**SEQ ID NO: 3**)

15

GIP humain :

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-  
Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-  
His-Asn-Ile-Thr-Gln (**SEQ ID NO: 4**)

<110> Eli Lilly and Company

<120> NOUVEAU COMPOSÉ POUR LE TRAITEMENT DE L'HYPOGLYCÉMIE GRAVE

5

<130> X19933

<150> 61/917597

<151> 18-12-2013

10

<160> 4

<170>PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

HisSerGlnGlyThrPheThrSerAsp Tyr Ser Lys Tyr Leu AspSer

1 5 10 15

25

ArgArgAlaGlnAspPhe Val GlnTrp Leu Met AsnThr

20 25

<210> 2

<211> 40

30

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Construction synthétique

35

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223>Xaa en position 16 est l'acide 2-aminoisobutyrique

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (40)..(40)

<223> AMIDATION

<400> 2

10 HisAlaGlnGlyThrPhe Leu SerAsp Tyr Ser Lys Tyr Leu AspXaa

1 5 10 15

Lys LysAlaGln Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Lys ThrGly Pro Ser

20 25 30

15

SerGly Ala Pro Pro Lys Ser Lys

35 40

20 <210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDATION

30

<400> 3

His Ala GluGlyThrPheThrSer Asp Val SerSer Tyr LeuGluGly

1 5 10 15

35

GlnAlaAla Lys Glu Phe Ile AlaTrp Leu Val Lys GlyArg

20 25 30

<210> 4  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 4

Tyr Ala Glu GlyThrPhe Ile SerAsp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
1                                    5                                    10                                    15

10

Ile HisGlnGlnAspPhe Val AsnTrp Leu Leu AlaGln Lys Gly Lys  
20                                    25                                    30

Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile ThrGln  
15                    35                                    40



## REVENDEICATIONS

1. Composé comprenant la séquence d'acides aminés de His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-  
5 Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2).
2. Composé selon la revendication 1, dans lequel le composé est constitué de la séquence d'acides aminés de His-Ala-Gln-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Asp-Tyr-  
10 Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-(Aib)-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Lys-Thr-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Lys-Ser-Lys-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2).
3. Composition pharmaceutique comprenant le composé selon la revendication 1 ou la revendication 2 et un tampon pharmaceutiquement  
15 acceptable.
4. Composition pharmaceutique selon la revendication 3, dans laquelle le tampon pharmaceutiquement acceptable est une solution saline tamponnée par  
20 de l'histidine.
5. Méthode de traitement de l'hypoglycémie chez un sujet comprenant l'administration d'une quantité efficace d'un composé selon la revendication 1.
6. Composé selon la revendication 1, pour une utilisation dans une  
25 thérapie.
7. Composé selon la revendication 1, pour une utilisation dans le traitement de l'hypoglycémie.
- 30 8. Composé selon la revendication 1, pour une utilisation dans la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hypoglycémie.

9. Composition pharmaceutique comprenant le composé selon la revendication 2 et un tampon pharmaceutiquement acceptable.
10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, dans laquelle le tampon pharmaceutiquement acceptable est une solution saline tamponnée par de l'histidine.
11. Méthode de traitement de l'hypoglycémie chez un sujet comprenant l'administration d'une quantité efficace d'un composé selon la revendication 2.
12. Composé selon la revendication 2, pour une utilisation dans une thérapie.
13. Composé selon la revendication 2, pour une utilisation dans le traitement de l'hypoglycémie.
14. Composé selon la revendication 2, pour une utilisation dans la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hypoglycémie.



**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et  
complétée par la loi 23-13)

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 39109	Date de dépôt : 11/12/2014 ; Date d'entrée en phase nationale : 13/06/2016
Déposant : ELI LILLY AND COMPANY	Date de priorité: 18/12/2013
Intitulé de l'invention : NOUVEAU COMPOSÉ POUR LE TRAITEMENT DE L'HYPOGLYCÉMIE GRAVE	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site <a href="http://worldwide.espacenet.com">http://worldwide.espacenet.com</a> , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée <input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: M. Bendaoud	Date d'établissement du rapport : 07/07/2017
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



<b>Partie 1 : Considérations générales</b>		
Cadre 1 : base du présent rapport		
Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Description</u> 22 Pages</li> <li>• <u>Revendications</u> 14</li> </ul>		
<b>Partie 2 : Rapport de recherche</b>		
<b>Classement de l'objet de la demande :</b>		
CIB : C 07K 14/605		
Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :		
EPOQUE, Orbit		
<b>Catégorie*</b>	<b>Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</b>	<b>N° des revendications visées</b>
A	WO2008086086; 17/07/2008; UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]	1-4; 6-10 ; 12-14
A	WO2013004983; 10/01/2013; IMP INNOVATIONS LTD [GB];	1-4; 6-10 ; 12-14
A	WO2011143208; 17/11/2011; UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; MARCADIA BIOTECH INC [US]	1-4; 6-10 ; 12-14
<b>*Catégories spéciales de documents cités :</b>		
<p>-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs</p> <p>-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté</p>		

**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité**

*Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle*

Nouveauté (N)	Revendications 1-4 ; 6-10 ; 12-14 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-4 ; 6-10 ; 12-14 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-4 ; 6-10 ; 12-14 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : WO2008086086; 17/07/2008; UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]  
 D2 : WO2013004983; 10/01/2013; IMP INNOVATIONS LTD [GB];  
 D3 : WO2011143208; 17/11/2011; UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; MARCADIA BIOTECH INC [US]

**1. Nouveauté (N) :**

Aucun des documents mentionnés ci-dessus ne décrit le peptide tel que caractérisé par la séquence SEQ ID n ° 2, d'où l'objet de la revendication 1 est nouveau. Par la suite toutes les revendications dépendantes le sont.

**2. Activité inventive (AI) :**

Le document D1 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 divulgue l'utilisation des groupes acyle pour augmenter la solubilité, la séquence décrite est de 75,1% identique à SEQ ID n ° 2 revendiquée, par conséquent l'objet de la revendication 1 diffère de D1 par a séquence d'AA du peptide.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme la mise à disposition d'analogues du glucagon alternatif amélioré. La solution proposée par la présente demande, le peptide SEQ ID NO 2 montre que le problème a été résolu: SEQ ID N ° 2 montre une solubilité accrue à pH 5-7, une stabilité accrue, une augmentation de la glycémie chez la souris, une liaison et une activation du hGR.

On ne trouve aucune allusion ou suggestion permettant à l'homme du métier d'élaborer le peptide d'intérêt à partir de l'art antérieur

Les revendications 1 à 4, 6 à 10 et 12 à 14 vérifient l'activité inventive puisqu'elles sont non évidentes à l'égard de l'art antérieur.

**3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :**

L'objet des revendications 1 à 4, 6 à 10 et 12 à 14 est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.

*Cadre 6: Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée*

Les objets des revendications 5 et 11 concernent des méthodes thérapeutiques qui ne sont pas brevetables au sens de l'article 24 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.