

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 251**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2016** **PCT/CN2016/112674**
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017** **WO17114425**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2016** **E 16881214 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.02.2022** **EP 3406264**

54 Título: **Composición que comprende un agonista del receptor de GLP-1 y un agonista del receptor de glucagón y aplicación de la misma**

30 Prioridad:

29.12.2015 CN 201511017796

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2022

73 Titular/es:

PEGBIO CO., LTD. (100.0%)
Suite 417 Building A3 Biobay 218 Xinghu Street,
Industrial Park
Suzhou City, Jiangsu 215123, CN

72 Inventor/es:

XU, MIN;
LV, WEI;
ZHANG, YINGHUI y
LUO, XIAOSU

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 912 251 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende un agonista del receptor de GLP-1 y un agonista del receptor de glucagón y aplicación de la misma

Campo

La presente divulgación se refiere al campo de la medicina, en particular, se refiere a una composición que comprende un agonista del receptor de GLP-1 y un agonista del receptor de glucagón y a su uso para la pérdida de peso y/o la reducción de lípidos.

Antecedentes

En los últimos años, a medida que el desarrollo económico ha provocado cambios en la dieta y en el estilo de vida, la proporción de personas obesas ha aumentado año tras año. De acuerdo con las últimas estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, el número de personas obesas y con sobrepeso en el mundo ha aumentado de 857 millones en 1980 a 2.100 millones en 2013, lo que representa casi un tercio de la población mundial. En 2014, más de 1.900 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso, de los cuales 600 millones eran obesos. En 2014, el 39 % de los adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso y el 13 % eran obesos. El sobrepeso y la obesidad, una vez considerado un problema para los países de altos ingresos, ahora están en aumento en los países de bajos y medianos ingresos. Tener sobrepeso y obesidad aumenta la presión arterial y los niveles de colesterol en la sangre, que son los principales factores de riesgo de varias enfermedades a largo plazo, como la diabetes, enfermedad cardiovascular y cáncer.

Las intervenciones en el estilo de vida (ejercicio apropiado y dieta saludable) a menudo no controlan por completo el desarrollo de la obesidad. En este caso, la intervención farmacológica se considera adecuada y necesaria. Orlistat es actualmente la única píldora de dieta de venta libre (OTC por sus siglas en inglés) en el mundo. Más de 40 millones de personas en todo el mundo usaron Orlistat y perdieron peso con éxito. Actualmente es el producto para perder peso más vendido. Orlistat es un potente inhibidor de la lipasa gastrointestinal específico y de acción prolongada que bloquea directamente la absorción corporal de grasas en los alimentos, por lo que la grasa corporal disminuirá cuando la ingesta de energía y grasa sea menor que el consumo, para lograr el propósito de la pérdida de peso. Sin embargo, Orlistat tiene varias desventajas, por ejemplo, su efecto de pérdida de peso no es significativo para algunas personas, y debe tomarse con las comidas todos los días o después de las comidas, por lo que el cumplimiento del paciente es pobre. Por otro lado, Orlistat también tiene riesgos de seguridad. En mayo de 2010, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. advirtió sobre el riesgo de que Orlistat pueda causar daño hepático grave. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos fármacos para la pérdida de peso que actúen a través de otros mecanismos.

El péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) es una hormona polipeptídica secretada por las células L intestinales después de comer, lo que puede estimular la secreción de insulina de las células β de los islotes pancreáticos, estabilizando así el nivel de azúcar en sangre posprandial. La administración exógena de GLP-1 normaliza los niveles de azúcar en sangre en pacientes con diabetes tipo II. El efecto de GLP-1 en la reducción del nivel de azúcar en la sangre depende de la concentración de glucosa, lo que reduce en gran medida el riesgo de hipoglucemia mientras regula el nivel de azúcar en la sangre. Los fármacos basados en GLP-1, como Byetta, Victoza, Albiglutida y Dulaglutida, se han comercializado con éxito en los últimos años y poco a poco van ocupando posiciones importantes entre los fármacos para la diabetes.

La aplicación clínica encontró que los fármacos de GLP-1 tienen el efecto de reducir el peso mientras que reducen el nivel de azúcar en la sangre. El mecanismo puede ser que el GLP-1 puede actuar sobre el tracto gastrointestinal para retrasar el vaciamiento gástrico y la peristalsis intestinal, y el GLP-1 puede actuar sobre el sistema nervioso central para suprimir el apetito, aumentar la saciedad y así sucesivamente, para lograr el propósito de reducir la ingesta de alimentos. En 2014, Victoza de Novo Nordisk incluso fue aprobado para la pérdida de peso como una indicación adicional. Sin embargo, debido a la corta semivida de Victoza, los pacientes tratados con Victoza necesitan tomar una inyección todos los días, aumentando el dolor de los pacientes en el uso a largo plazo.

El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 53 a 81 del preproglucagón y tiene la siguiente secuencia: 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: 2). Oxintomodulina (OXM) es un péptido con 37 aminoácidos, que comprende la secuencia completa de 29 aminoácidos del glucagón y la extensión carboxi-terminal de un octapéptido (aminoácidos 82 a 89 del preproglucagón). Tanto Merck como Zeland están desarrollando derivados de oxintomodulina para su uso en la pérdida de peso y la disminución del nivel de glucosa. Un proyecto de péptido agonista dual para la pérdida de peso desarrollado por Merck ha entrado en fase I de ensayo clínico, mientras que zp2929 desarrollado por Zeland todavía se encuentra en fase preclínica.

Aunque el uso de oxintomodulina para bajar de peso tiene una perspectiva atractiva, todavía tiene sus defectos. Por ejemplo, la vida media de la oxintomodulina en el plasma humano es muy corta (8 a 12 minutos); como agonista dual, su actividad es escasa y la capacidad de activar cualquiera de los receptores es mucho menor que la del péptido

original, haciendo que la dosis a administrar a un cuerpo humano necesite alcanzar el nivel de mg/kg. Por otro lado, la oxintomodulina presenta una proporción fija de actividad agonista para ambos receptores, que no se puede regular y puede no ser la mejor proporción para ejercer su efecto de pérdida de peso. Por lo tanto, cómo optimizar el diseño de fármacos para resolver estos problemas se ha convertido en un tema principal para muchos trabajadores médicos de I+D.

La exendina-4 es un polipéptido de 39 aminoácidos aislado de la saliva del lagarto mexicano, que muestra un 53 % de homología con GLP-1. Los estudios han demostrado que la exendina-4 también se une al receptor de GLP-1 y presenta una actividad agonista farmacológicamente similar a la del GLP-1.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se refiere al síndrome fisiopatológico que se caracteriza por un depósito excesivo de grasa en las células hepáticas causado por factores de daño hepático definitivo, excepto el alcohol. Es una lesión hepática adquirida por estrés metabólico y está estrechamente relacionada con la resistencia a la insulina y la susceptibilidad genética. EHGNA incluye hígado graso simple (HGS), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y cirrosis relacionada. Con la prevalencia de la obesidad y su síndrome metabólico asociado en todo el mundo, la enfermedad del hígado graso no alcohólico se ha convertido en una causa importante de enfermedad hepática a largo plazo en Europa, Estados Unidos y otros países desarrollados y regiones ricas de China. En un adulto normal, la tasa de prevalencia de EHGNA es del 10 % al 30 %, de los cuales del 10 % al 20 % es EHNA, y esta última tiene una incidencia de cirrosis de hasta el 25 % en 10 años. La enfermedad del hígado graso no alcohólico no solo puede conducir directamente a la cirrosis hepática compensatoria, carcinoma hepatocelular y recurrencia del injerto hepático, sino que también puede afectar a la progresión de otras enfermedades hepáticas a largo plazo y participar en la patogénesis de la diabetes tipo II y la aterosclerosis. Las neoplasias malignas relacionadas con el síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares arterioescleróticas y la cirrosis son factores importantes que afectan a la calidad de vida y a la esperanza de vida de los pacientes con enfermedad del hígado graso no alcohólico. Por las razones anteriores, la enfermedad del hígado graso no alcohólico es un nuevo desafío en el campo de la medicina moderna y, en un futuro próximo, el impacto de la enfermedad del hígado graso no alcohólico en la salud humana seguirá aumentando.

SUMARIO

Los inventores descubrieron sorprendentemente en el estudio que la administración simultánea de un agonista del receptor de GLP-1 modificado con polímero hidrófilo y un agonista del receptor de glucagón modificado con polímero hidrófilo, ya sea que estén vinculados entre sí o que se presenten por separado, logró un efecto mucho mejor (por ejemplo, pérdida de peso) que el uso del agonista del receptor de GLP-1 solo. Por otro lado, a la vez que logra una mayor actividad, también prolonga en gran medida la vida media en el cuerpo y reduce la frecuencia de administración. En particular, la solución técnica de la presente divulgación también puede mejorar los síntomas de los trastornos del metabolismo de las grasas en animales obesos además de reducir el peso corporal, y reducir significativamente la cantidad de triglicéridos en el suero y el hígado, así como la cantidad de colesterol total en el suero de los animales después de la administración a largo plazo, lo que brinda una nueva posibilidad para el tratamiento del hígado graso no alcohólico.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En un caso, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agonista del receptor de GLP-1 y un agonista del receptor de glucagón, en donde el agonista del receptor de GLP-1 y el agonista del receptor de glucagón forman independientemente un conjugado con un polímero hidrófilo, respectivamente, o el agonista del receptor de GLP-1 y el agonista del receptor de glucagón forman un conjugado a través de un polímero hidrófilo. De manera opcional, la composición farmacéutica de la presente divulgación comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede usarse para prevenir o tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico, perder peso y/o bajar el nivel de lípidos. En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede usarse para suprimir el apetito en un sujeto, reducir el contenido de colesterol total en el suero y/o reducir el contenido de triglicéridos en el hígado.

En algunas realizaciones, el agonista del receptor de GLP-1 y el agonista del receptor de glucagón en la composición farmacéutica de la presente divulgación se unen covalentemente a través de un polímero hidrófilo para formar un conjugado.

En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo en la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene un peso molecular de 2 kDa a 60 kDa, de 5 kDa a 50 kDa, preferentemente de 10 kDa a 40 kDa, más preferentemente de 20 kDa a 40 kDa, particularmente de 15 kDa a 30 kDa, más particularmente de 21 kDa a 29 kDa. En particular, el polímero (por ejemplo, PEG) tiene un peso molecular de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 50 kDa, preferentemente de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 40 kDa, más preferentemente de aproximadamente 4 kDa a aproximadamente 35 kDa, incluso más preferentemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 30 kDa, por ejemplo, aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, 21 kDa, 22 kDa, 23 kDa, 24 kDa, aproximadamente 25 kDa, 26 kDa, 27 kDa, 28 kDa,

29 kDa, aproximadamente 30 kDa, aproximadamente 35 kDa, aproximadamente 40 kDa y aproximadamente 45 kDa, o cualquier valor entre los valores de peso molecular anteriores.

En la invención, el agonista del receptor de GLP-1 es PB-105 (tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón es el glucagón. En particular, el glucagón es PB-702 (por ejemplo, tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3, en donde el grupo amino en la cadena lateral de la lisina en la 12^a posición de la secuencia está conectado con un grupo cisteína a través de un enlace amida), PB-703 (por ejemplo, tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 4, en donde la glutamina en la 24^a posición de la secuencia se sustituye con cisteína), PB-740 (por ejemplo, tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, en donde se añade un resto de cisteína después del 29^o aminoácido) o PB-741 (por ejemplo, tiene la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 6, en donde la cadena lateral "-CO-NH₂" de la glutamina en la 24^a posición se modifica a "-CO-NH-CH₂CH₂-SH").

En algunas realizaciones, la secuencia de glucagón se modifica en una o más posiciones con referencia a la secuencia de glucagón de tipo silvestre. En particular, la modificación es la introducción del grupo funcional para el acoplamiento a la cadena lateral de lisina, ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico o asparagina (por ejemplo, sulfhidrilo, azida, maleimida, grupo amino, alquínilo, vinil sulfona, halógeno o grupo aldehído). Por ejemplo, las modificaciones incluyen la adición de cisteína a la cadena lateral de lisina en la 12^a posición de la SEQ ID NO: 2, la adición de ácido tioglicólico a la cadena lateral de lisina en la 12^a posición de la SEQ ID NO: 2, la adición de ácido mercaptopropiónico a la cadena lateral de lisina en la 12^a posición de la SEQ ID NO: 2, la adición de mercaptoetilo a la cadena lateral de glutamina en la 24^a posición de la SEQ ID NO: 2, la adición de mercaptopropilo a la cadena lateral de glutamina en la 24^a posición de la SEQ ID NO: 2 y la adición de ácido mercaptopropiónico a la cadena lateral de glutamina en la 24^a posición de la SEQ ID NO: 2.

Adicionalmente, o como alternativa, la modificación es la adición o sustitución de cisteína, por ejemplo, la glutamina en la 24^a posición de la SEQ ID NO: 2 se sustituye con cisteína, la lisina en la 12^a posición de la SEQ ID NO: 2 se sustituye con cisteína, y/o se añade una cisteína después de la 29^a posición de la SEQ ID NO: 2.

En la invención, el polímero hidrófilo es polietilenglicol (PEG).

En la invención, la relación molar del agonista del receptor de GLP-1 al agonista del receptor de glucagón es de 1:1 a 1:15.

En otro caso, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de GLP-1 pegilado y un agonista del receptor de glucagón pegilado. En particular, el agonista del receptor de GLP-1 pegilado se selecciona del grupo que consiste en PB-119, PB-120 y PB-107; el agonista del receptor de glucagón pegilado se selecciona del grupo que consiste en: PB-707, PB-708, PB-709, PB-713, PB-721 y PB-722.

En otro caso, la presente divulgación proporciona un conjugado que comprende un agonista del receptor de GLP-1 y un agonista del receptor de glucagón, en donde el agonista del receptor de GLP-1 y el agonista del receptor de glucagón forman un conjugado a través de un polímero hidrófilo.

En el conjugado de la presente divulgación, el agonista del receptor de GLP-1 y/o el agonista del receptor de glucagón se conjugan con polímeros hidrófilos directamente o a través de un enlazador, preferentemente a través del sulfhidrilo de una cisteína u otro aminoácido.

En otro caso, la presente divulgación proporciona un conjugado que tiene la fórmula general X₁-Z₁-Y-Z₂-X₂, en donde X₁ representa un agonista del receptor de GLP-1, X₂ representa un agonista del receptor de glucagón, Y representa un polímero hidrófilo, Z₁ representa un primer enlazador y Z₂ representa un segundo enlazador. En particular, la presente divulgación proporciona un conjugado que tiene la fórmula Exendina-4-Z₁-PEG-Z₂-glucagón, por ejemplo, un conjugado que tiene la fórmula PB105-PEG-PB703 (por ejemplo, PB-716, PB-717, PB-718, PB-719, PB-720).

En la presente divulgación, el enlazador, el primer enlazador y/o el segundo enlazador tienen cada uno independientemente un grupo formado por la activación de un grupo reactivo (por ejemplo, maleimida, halógeno, vinil sulfona, un enlace disulfuro, sulfhidrilo, aldehído, carbonilo, hidroxilamina O-sustituida, éster activo, alquénilo, alquínilo, azida u otros grupos con alta reactividad química). Más preferentemente, el grupo reactivo se selecciona del grupo que consiste en maleimida, halógeno, enlace vinil sulfona y disulfuro.

En la presente divulgación, el enlazador, el primer enlazador y/o el segundo enlazador comprenden cada uno independientemente un grupo reactivo activado (por ejemplo, maleimida, halógeno, vinil sulfona, un enlace disulfuro, tiol, aldehído, carbonilo, hidroxilamina O-sustituida, éster activo, alquénilo, alquínilo, azida u otros grupos con alta reactividad química). Más preferentemente, el grupo reactivo se selecciona del grupo que consiste en maleimida, halógeno, enlace vinil sulfona y disulfuro.

En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo se activa para conjugarse con el agonista del receptor de GLP-1 y el agonista del receptor de glucagón. Preferentemente, el polímero es un polímero modificado que tiene un grupo reactivo, para que el polímero se conjugue con el agonista del receptor de GLP-1 y el agonista del receptor de glucagón a través de la activación del grupo reactivo. Más preferentemente, el grupo reactivo se selecciona del grupo que

5 consiste en maleimida, halógeno, vinil sulfona, un enlace disulfuro, tiol, aldehído, carbonilo, hidroxilamina O-sustituida, éster activo, alqueno, alquino, azida y otros grupos con alta reactividad química.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende lo siguiente: una combinación de PB-721 y PB-119, una combinación de PB-722 y PB-119, y una combinación de PB-708 y PB-120. De manera específica, las estructuras de PB-119, PB-120, PB-707, PB-708, PB-709, PB-713, PB-716, PB-717, PB-718, PB-719, PB-720, PB-721 y PB-722 se muestran en la Tabla 1.

10

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación y, opcionalmente, las instrucciones de uso.

15

En otro caso, la presente divulgación proporciona el uso de la composición o conjugado de la presente divulgación para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico, perder peso y/o bajar el nivel de lípidos.

20 En otro caso, la presente divulgación proporciona el uso de la composición o conjugado de la presente divulgación para la fabricación de un medicamento para inhibir el apetito en un sujeto, reducir el colesterol total en el suero y/o reducir el contenido de triglicéridos en el hígado.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona la composición descrita anteriormente para su uso para prevenir o tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico, perder peso y/o reducir los lípidos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona la composición como se describe anteriormente para su uso para inhibir el apetito en un sujeto, reducir el colesterol total en el suero y/o reducir el contenido de triglicéridos en el hígado.

30 En otro caso, la presente divulgación proporciona un método para prevenir o tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico, perder peso y/o reducir el nivel de lípidos, que comprende administrar la composición o el conjugado de acuerdo con la presente divulgación a un sujeto que lo necesite.

35 En otro caso, la presente divulgación proporciona un método para inhibir el apetito en un sujeto, reducir el nivel de colesterol total en el suero y/o reducir el contenido de triglicéridos en el hígado, que comprende administrar la composición o el conjugado de acuerdo con la presente divulgación a un sujeto que lo necesite.

Los inventores también han descubierto inesperadamente que la composición y el conjugado de la presente divulgación reducen en gran medida la frecuencia de dosificación requerida para mantener el efecto deseado. En algunas realizaciones, el conjugado de la presente divulgación se administra al sujeto con una frecuencia de una vez al menos cada 30 días, una vez al menos cada 25 días, una vez al menos cada 20 días, una vez al menos cada 15 días, una vez al menos cada 10 días, una vez al menos cada 9 días, una vez al menos cada 8 días, una vez al menos cada 7 días, una vez al menos cada 6 días, una vez al menos cada 5 días, una vez al menos cada 4 días, una vez al menos cada 3 días, una vez al menos cada 2 días y una vez al menos todos los días. En algunas realizaciones, el conjugado de la presente divulgación se administra al sujeto con una frecuencia de una vez como máximo cada 30 días, una vez como máximo cada 25 días, una vez como máximo cada 20 días, una vez como máximo cada 15 días, una vez como máximo cada 10 días, una vez como máximo cada 9 días, una vez como máximo cada 8 días, una vez como máximo cada 7 días, una vez como máximo cada 6 días, una vez como máximo cada 5 días, una vez como máximo cada 4 días, una vez como máximo cada 3 días, una vez como máximo cada 2 días y una vez como máximo todos los días.

50

La composición y el conjugado de la presente divulgación reducen en gran medida la frecuencia de dosificación y aumentan el cumplimiento del sujeto.

55 La composición y el conjugado de la presente divulgación se pueden usar para prevenir el aumento de peso o para promover la pérdida de peso. "Prevenir" se refiere a suprimir o reducir el aumento de peso en comparación con ningún tratamiento, y no significa necesariamente detener por completo el aumento de peso. La composición y el conjugado de la presente divulgación pueden causar una disminución en la ingesta de alimentos y/o un aumento en el gasto de energía, dando como resultado un efecto visible en el peso corporal. Independientemente de su efecto sobre el peso corporal, la composición y el conjugado de la presente divulgación pueden tener un efecto beneficioso sobre la tolerancia a la glucosa y los niveles de colesterol circulante (por ejemplo, reducir los niveles de LDL circulante y aumentar la relación HDL/LDL). Por tanto, el compuesto de la presente divulgación se puede usar para tratar directa o indirectamente cualquier condición causada o caracterizada por sobrepeso, tal como el tratamiento y/o la prevención de la obesidad, la obesidad mórbida, la inflamación relacionada con la obesidad, la enfermedad de la vesícula biliar relacionada con la obesidad o la apnea del sueño inducida por la obesidad. La composición y el conjugado de la presente divulgación también se pueden usar para tratar el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la

65

intolerancia a la glucosa, la diabetes tipo II, la hipertensión, la dislipidemia aterógena, la aterosclerosis, la arterioesclerosis, la cardiopatía coronaria o el accidente cerebrovascular. Su papel en estos trastornos puede ser causado o estar relacionado con sus efectos sobre el peso corporal, o puede ser independiente de su efecto sobre el peso corporal.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el perfil de purificación de PB-716.

10

La figura 2 muestra el perfil de purificación de PB-717.

La figura 3 muestra el perfil de purificación de PB-718.

15

La figura 4 muestra el perfil de purificación de PB-719.

La figura 5 muestra el perfil de purificación de PB-720.

20

La figura 6 muestra el efecto de una dosis única de compuestos de la serie PB-716 sobre el peso corporal de ratones con DIO.

La figura 7 muestra el efecto de la administración continua de compuestos de la serie PB-716 sobre la ingesta acumulada de alimentos de ratones con DIO.

25

La figura 8 muestra la tasa de descenso de la ingesta acumulada de alimentos entre los grupos de tratamiento y el grupo modelo de control después de la administración durante 14 días consecutivos.

La figura 9 muestra el efecto de la administración continua de compuestos de la serie PB-716 sobre el peso corporal de ratones con DIO.

30

La figura 10 muestra la tasa de descenso del peso corporal de ratones con DIO después de la administración continua de compuestos de la serie PB-716.

La figura 11 muestra el efecto de la administración a largo plazo de compuestos de la serie PB-716 sobre el nivel de azúcar en sangre aleatorio de ratones con DIO.

35

La figura 12 muestra el efecto de la administración continua de los compuestos PB-718, PB-119 y la combinación (PB-708 + PB-120) sobre el peso corporal de ratones con DIO.

40

La figura 13 muestra la tasa de descenso del peso corporal de ratones con DIO después de la administración continua de los compuestos PB-718, PB-119 y la combinación (PB-708 + PB-120).

La figura 14 muestra el efecto de la administración a largo plazo de los compuestos PB-718, PB-119 y la combinación (PB-708 + PB-120) sobre la ingesta acumulada de alimentos de ratones con DIO.

45

La figura 15 muestra la tasa de descenso de la ingesta acumulada de alimentos después de la administración durante 14 días consecutivos.

La figura 16 muestra el efecto de la administración continua de los compuestos PB-718, PB-119 y la combinación (PB-708 + PB-120) en el nivel de azúcar en sangre aleatorio de ratones con DIO.

50

La figura 17 muestra el efecto de la administración a largo plazo sobre el peso corporal aleatorio de ratones con DIO.

55

La figura 18 muestra la tasa de descenso del peso corporal aleatorio de ratones con DIO después de la administración a largo plazo.

La figura 19 muestra el efecto de la administración a largo plazo sobre la ingesta de alimentos de ratones con DIO.

60

La figura 20 muestra la tasa de descenso de la ingesta acumulada de alimentos después de la administración a largo plazo.

La figura 21 muestra el efecto de la administración a largo plazo sobre el nivel de triglicéridos en el suero de ratones con DIO.

65

La figura 22 muestra el efecto de la administración a largo plazo sobre el nivel de triglicéridos en el hígado de ratones con DIO.

La figura 23 muestra el efecto de la administración a largo plazo sobre el nivel de colesterol total en el suero de ratones con DIO.

5 La figura 24 muestra el efecto de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación sobre el peso corporal de monos cynomolgus obesos.

La figura 25 muestra el efecto de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación sobre la ingesta acumulada de alimentos de monos cynomolgus obesos.

10 La figura 26 muestra un histograma del cambio porcentual en el consumo promedio de alimentos después de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación: el número de administraciones en monos cynomolgus.

15 La figura 27 muestra el efecto de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación sobre el nivel de triglicéridos en el suero de los monos cynomolgus.

La figura 28 muestra el efecto de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación sobre el nivel de glucosa en el suero de los monos cynomolgus.

20 La figura 29 muestra el efecto de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación sobre el nivel de alanina aminotransferasa en el suero de los monos cynomolgus.

25 La figura 30 muestra el efecto de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación en la cintura de los monos cynomolgus.

La figura 31 muestra el efecto de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación sobre la distribución de grasa de los monos cynomolgus.

30 La figura 32 muestra el efecto de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días sobre la ingesta acumulada de alimentos de ratones con DIO.

La figura 33 muestra la tasa de descenso de la ingesta acumulada de alimentos después de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días en comparación con el grupo de control modelo.

35 La figura 34 muestra el efecto de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días sobre el peso corporal de ratones con DIO.

La figura 35 muestra la tasa de descenso del peso corporal de ratones con DIO después de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días.

40 La figura 36 muestra el efecto de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días sobre el nivel de azúcar en sangre en ayunas de ratones con DIO.

45 La figura 37 muestra el efecto de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días sobre la tolerancia oral al azúcar de ratones con DIO.

La figura 38 muestra la concentración de azúcar en sangre en los ratones después de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días.

50 La figura 39 muestra el nivel de insulina en el suero de los ratones después de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días.

La figura 40 muestra la evaluación de EHNA en ratones después de la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) durante 21 días.

55

Descripción detallada

Definición

60 Tal como se usan en el presente documento, los términos "enlazador", "primer enlazador", "segundo enlazador", y similares, se refieren al grupo, segmento, enlace químico o cualquier entidad que sirva para conectar un polímero a una molécula biológicamente activa en la presente divulgación. En la presente divulgación, el enlazador puede contener un grupo activador (por ejemplo, maleimida, halógeno, vinil sulfona, un enlace disulfuro, sulfhidrilo, aldehído, carbonilo, hidroxilamina O-sustituida, éster activo, alqueno, alquino, azida u otros grupos con alta reactividad química), por ejemplo, MAL, ppMAL y similares.

65

El "polietilenglicol" descrito en el presente documento tiene el significado comúnmente entendido por un experto en la materia e incluye tanto polietilenglicol (incluidas diferentes estructuras, por ejemplo, estructura lineal, ramificada o bifurcada, como la forma de estrella) y sus derivados modificados terminalmente, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, el PEG es metoxipolietilenglicol (mPEG). En el presente documento, si no se indica específicamente, el polietilenglicol (PEG) incluye ambos tipos en los que el grupo terminal es un grupo hidroxilo u otros grupos. Los otros grupos incluyen, pero sin limitación, alcoxi, cicloalcoxi, cicloalquiloxi, alquenilo, ariloxi o aralquiloxi. Todos estos tipos de PEG son conocidos en la técnica y se usan comúnmente en la modificación de polipéptidos. La cadena secundaria de PEG puede ser lineal, ramificada, bifurcada o consistir en múltiples brazos, y diferentes polietilenglicoles pueden tener diferentes longitudes de cadena de polímeros y estructura de agregados.

Tal como se usa en el presente documento, "conjugado" se refiere a un producto formado mediante la unión covalente de una molécula que tiene actividad biológica (p. ej., agonista del receptor de GLP-1 y agonista del receptor de glucagón) con una molécula de polietilenglicol directamente o mediante un enlazador.

Asimismo, hay muchas formas de determinar el peso molecular de un polímero como el polietilenglicol. Dado que el polímero está compuesto por moléculas de diferente grado de polimerización en un determinado intervalo de distribución, el peso molecular promedio se usa generalmente para indicar el peso molecular del polímero. De manera específica, puede ser un peso molecular promedio en número o un peso molecular promedio en peso. Aunque puede haber algunas desviaciones en el peso molecular promedio en número y el peso molecular promedio en peso cuando el grado de polimerización del polímero difiere mucho, estos dos tienden a ser iguales para el polímero con un estrecho intervalo de distribución. Con respecto a los polímeros mencionados en el presente documento, tales como polietilenglicol, cuando se hace referencia a su peso molecular, este puede ser tanto un peso molecular promedio en peso como un peso molecular promedio en número, preferentemente un peso molecular promedio en número.

El "agonista del receptor de GLP-1" descrito en el presente documento se refiere a una sustancia que puede activar el receptor de GLP-1, por ejemplo, GLP-1 de tipo silvestre y sus variantes (como GLP-1-(7-37) amida y GLP-1-(7-36) amida), exendina-4 de tipo silvestre y sus variantes, y exendina-3 de tipo silvestre y sus variantes. En algunas realizaciones de la presente divulgación, el conjugado formado por un agonista del receptor de GLP-1 y un polímero hidrófilo es de acción prolongada. En otras realizaciones de la presente divulgación, el conjugado formado por un agonista del receptor de GLP-1 y un agonista del receptor de glucagón junto con un polímero hidrófilo es de acción prolongada.

Tal como se usa en el presente documento, "agonista del receptor de glucagón" se refiere a una sustancia que puede activar el receptor de glucagón, tal como glucagón de tipo silvestre y variantes del mismo. Por ejemplo, el glucagón es PB-702 (por ejemplo, tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3, en donde el grupo amino en la cadena lateral de la lisina en la 12ª posición de la secuencia está conectado con un grupo cisteína a través de un enlace amida), PB-703 (por ejemplo, tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 4, en donde la glutamina en la 24ª posición de la secuencia se sustituye con una cisteína), PB-740 (por ejemplo, tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, en donde se añade un resto de cisteína después del 29º aminoácido) o PB-741 (por ejemplo, tiene la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 6, en donde la cadena lateral "-CO-NH₂" de la glutamina en la 24ª posición se modifica a "-CO-NH-CH₂CH₂-SH"). En algunas realizaciones, el conjugado de la presente divulgación formado por un agonista del receptor de glucagón y un polímero hidrófilo es de acción prolongada.

"Exendina-4", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que se encuentra en la saliva de las iguanas tóxicas (J. Biol. Chem, 265, 20259-20262, 1990; J. Biol. Chem, 267, 7402-7405, 1992) y sus variantes que mantienen sustancialmente la función de activar el receptor de GLP-1. La exendina-4 de tipo silvestre es altamente homóloga (53 %) a GLP-1 (7-36), que tiene una secuencia de His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 7).

Tal como se usa en el presente documento, "glucagón" se refiere a un polipéptido correspondiente a los aminoácidos 53 a 81 del preproglucagón (que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 2, 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) y sus variantes que mantienen sustancialmente la función de activar el receptor de glucagón.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "acción prolongada" cuando se usa para agonista del receptor significa que la frecuencia de administración del mismo no es más de una vez al día, preferentemente hasta varios días, por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, 40 días, 50 días o más.

Los términos tales como "comprender", "componer", "contener" e "incluir" no pretenden ser limitantes. Asimismo, a menos que se especifique lo contrario, una palabra sin modificación numérica incluye la forma plural, y "o" significa "y/o". A menos que se defina lo contrario en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto habitual en la materia.

Tal como se usa en el presente documento, "variante" y "variante funcional" se usan indistintamente y se refieren a una molécula biológica modificada o alterada, preferentemente la variante todavía conserva su actividad biológica. Por ejemplo, una "variante" de un polipéptido se refiere a polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, deleciones, inserciones, fusiones, truncamientos o cualquier combinación de los mismos.

5 Los polipéptidos variantes pueden ser completamente funcionales o pueden carecer de una o más actividades. Una variante completamente funcional puede contener, por ejemplo, solamente cambios conservadores o cambios en restos no críticos o en regiones no críticas. La variante funcional puede contener también una sustitución de aminoácidos similares, dando como resultado una función sin cambios o un cambio funcional insignificante.

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto habitual en la materia. Para la definición y terminología en la técnica, un experto en la materia puede consultar Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel). Las abreviaturas de los restos de aminoácidos son los códigos estándar de 3 letras y/o 1 letra utilizados en la técnica para representar a uno de los 20 L-aminoácidos comúnmente utilizados.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" significa una combinación de al menos un fármaco y, opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que se combinan para lograr un propósito particular. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye combinaciones que se encuentran separadas en el tiempo y/o espacio siempre y cuando puedan actuar juntas para lograr el objetivo de la presente divulgación. Por ejemplo, los ingredientes contenidos en la composición farmacéutica (p. ej., el conjugado de la presente divulgación) pueden administrarse al sujeto como un todo o aplicarse por separado al sujeto. Cuando los ingredientes contenidos en la composición farmacéutica se administran por separado a un sujeto, los ingredientes pueden administrarse al sujeto simultánea o secuencialmente. Preferentemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es agua, tampón, solución salina isotónica tal como PBS (tampón fosfato), glucosa, manitol, dextrosa, 20 lactosa, almidón, estearato de magnesio, celulosa, carbonato de magnesio, glicerol al 0,3 %, ácido hialurónico, etanol o polialquilenglicol tal como polipropilenglicol, triglicéridos y similares. El tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable depende de si la composición de la invención está formulada para administración oral, nasal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa. La composición de acuerdo con la invención puede comprender un agente humectante, emulsionante o sustancia tampón como aditivo.

30 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral, nasal, intracutánea, subcutánea, intramuscular o intravenosa.

35 Tal como se usa en el presente documento, "cantidad farmacéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a una dosis suficiente para mostrar el beneficio para el sujeto al que se administra. La cantidad real administrada, así como la tasa y el tiempo de administración, dependerá de la propia condición y gravedad del propio sujeto. La prescripción del tratamiento (como la determinación de la dosis, etc.) es en última instancia responsabilidad del médico general y otros médicos, con quién se cuenta para tomar una decisión, generalmente considerando la enfermedad a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por el médico.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, tal como un ser humano, pero también pueden ser otros animales, tales como animales salvajes (por ejemplo, garza, cigüeña, grullas, etc.), ganado (por ejemplo, pato, gansos, etc.) o animales experimentales (p. ej., orangután, mono, rata, ratón, conejo, cobaya, marmota, ardilla terrestre, etc.).

Aunque los intervalos numéricos y los parámetros establecidos en el amplio alcance de la presente divulgación abarcan aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se presentan de la forma más precisa posible. Sin embargo, cualquier valor numérico inherentemente contiene necesariamente un cierto error, lo cual es causado por la desviación estándar existente en sus respectivas mediciones. Además, se ha de entender que todos los intervalos divulgados en el presente documento abarcan todos y cada uno de los subintervalos incluidos en los mismos. Por ejemplo, se debe considerar que el intervalo mencionado de "1 a 10" incluye todos y cada uno de los subintervalos entre el mínimo 1 y el máximo 10, inclusive, es decir, todos los subintervalos que comienzan con un mínimo de 1 o más, tal como de 1 a 6,1, y subintervalos que terminan en un máximo de 10 o menos, tal como de 5,5 a 10.

60 Cabe señalar además que, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la forma singular incluye la forma plural de la misma, a menos que esté claramente limitado a un objeto señalado. El término "o" se puede usar indistintamente con el término "y/o" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para demostrar y explicar adicionalmente determinadas realizaciones y aspectos representativos de la presente divulgación, y no deben considerarse como limitantes de su alcance.

Tabla 1. Moléculas bioactivas involucradas en la presente divulgación

Nombre	Estructura	SEQ ID No.	Descripción
PB-105	HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNNGG PSSGAPPPC	1	Variante de exendina-4
PB-701	HSQGTFTSDY SKYLSRRAQ DFVQWLMNT	2	Glucagón de tipo silvestre
PB-702	HSQGT FTSDY SK(-Cys)YLSRRAQ DFVQWLMNT	3	Variante de glucagón (12ª posición)
PB-703	HSQGTFTSDY SKYLSRRAQ DFVCWLMNT	4	Variante de glucagón (24ª posición)
PB-740	HSQGTFTSDY SKYLSRRAQ DFVQWLMNTC	5	Variante de glucagón (30ª posición)
PB-741	HSQGTFTSDY SKYLSRRAQ DFVQ(-CH ₂ CH ₂ SH)WLMNT	6	Variante de glucagón (24ª posición)
PB-119	mPEG-23KD -ppMAL-PB-105		
PB-120	mPEG-25KD -ppMAL-PB-105		
PB-107	mPEG-30KD -ppMAL-PB-105		
PB-707	mPEG-23KD-ppMAL-PB-703		
PB-708	mPEG-25KD-ppMAL-PB-703		
PB-709	mPEG-30KD-ppMAL-PB-703		
PB-713	mPEG-40KD-ppMAL-PB-703		
PB-716	PB-105-PEG-40KD -(ppMAL)2--PB-703		
PB-717	PB-105-PEG-30KD -(ppMAL)2--PB-703		
PB-718	PB-105-PEG-25KD -(ppMAL)2--PB-703		
PB-719	PB-105-PEG-20KD -(ppMAL)2--PB-703		
PB-720	PB-105-PEG-10KD -(ppMAL)2--PB-703		
PB-721	mPEG-23KD -ppMAL--PB-740		
PB-722	mPEG-23KD -ppMAL--PB-741		
Nota: el subrayado indica modificación			

Ejemplos

5 Ejemplo 1. Preparación de PB-119 (Conjugado de PB-105 y mPEG-ppMAL-23KD)

10 mg de PB-105 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 65 mg de mPEG23KD-ppMAL (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y se colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (la relación molar de PB-105 a PEG es 1:1,2). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 10 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 30 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 2. Preparación de PB-120 (Conjugado de PB-105 y mPEG-ppMAL-25KD)

10 mg de PB-105 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 72 mg de mPEG25KD-ppMAL (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y se colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (la relación molar de PB-105 a PEG es 1:1,2). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético cargado en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 10 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 30 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 3. Preparación de PB-107 (Conjugado de PB-105 y mPEG-ppMAL-30KD)

10 mg de PB-105 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 86 mg de mPEG30KD-ppMAL (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y se colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (la relación molar de PB-105 a PEG es 1:1,2). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 10 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 30 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 4. Preparación de PB-707 (Conjugado de PB-703 y mPEG-ppMAL-23KD)

10 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 100 mg de mPEG-ppMAL-23KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y se colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (la relación molar de PB-703 a PEG es 1:1,5). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 15 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 30 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 5. Preparación de PB-708 (Conjugado de PB-703 y mPEG-ppMAL-25KD)

10 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 110 mg de mPEG-ppMAL-25KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y se colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (la relación molar de PB-703 a PEG es 1:1,5). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 15 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 30 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 6. Preparación de PB-709 (Conjugado de PB-703 y mPEG-ppMAL-30KD)

10 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 130 mg de mPEG-ppMAL-30KD (producido

por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y se colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (la relación molar de PB-703 a PEG es 1:1,5). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 15 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 30 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 7. Preparación de PB-713 (Conjugado de PB-703 y mPEG-ppMAL-40KD)

10 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 175 mg de mPEG-ppMAL-40KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y se colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (la relación molar de PB-703 a PEG es 1:1,5). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 15 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 30 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 8. Preparación de PB-721 (Conjugado de PB-740 y mPEG-ppMAL-23KD)

Se pesaron 10 mg de PB-740 (adquirido de Chinese Peptide Co., Ltd., China) y 96 mg de mPEG-ppMAL-23KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) y se colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (la relación molar de PB-740 a PEG es 1:1,5). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 15 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 30 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 9. Preparación de PB-722 (Conjugado de PB-741 y mPEG-ppMAL-23KD)

Se pesaron 10 mg de PB-741 (adquirido de Chinese Peptide Co., Ltd., China) y 97 mg de mPEG-ppMAL-23KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) y se colocaron en un recipiente de vidrio de 100 ml (la relación molar de PB-741 a PEG es 1:1,5). La mezcla se disolvió en 5 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 10 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usó tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para lavar el exceso de PEG y 15 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 300 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores.

Ejemplo 10. Preparación de PB-716 (Conjugado de PB-703, PB-105 y PEG-(ppMAL)2-40KD)

20 mg de PB-105 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China), 21 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 158,6 mg de PEG-(ppMAL)2-40KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y colocaron en un recipiente de vidrio de 50 ml (La relación molar de PEG, PB-105 y PB-703 es 1:1,2:1,5). La

mezcla se disolvió en 10 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

- 5 La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 20 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usaron 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para equilibrar y se usaron 30 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0+NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 40 %.
- 10 Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores. La figura 1 muestra el perfil de purificación de PB-716.

Ejemplo 11. Preparación de PB-717 (Conjugado de PB-703, PB-105 y PEG-(ppMAL)2-30KD)

- 15 20 mg de PB-105 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China), 21 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 119mg de PEG-(ppMAL)2-30KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y colocaron en un recipiente de vidrio de 100 ml (La relación molar de PEG, PB-105 y PB-703 es 1:1,2:1,5). La mezcla se disolvió en 10 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

- 25 La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 20 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usaron 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para equilibrar y se usaron 30 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0+NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 40 %.
- 30 Los picos de elución se recogieron al mismo volumen. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores. La figura 2 muestra el perfil de purificación de PB-717.

Ejemplo 12. Preparación de PB-718 (Conjugado de PB-703, PB-105 y PEG-(ppMAL)2-25KD)

- 35 20 mg de PB-105 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China), 21 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 99mg de PEG-(ppMAL)2-25KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y colocaron en un recipiente de vidrio de 100 ml (La relación molar de PEG, PB-105 y PB-703 es 1:1,2:1,5). La mezcla se disolvió en 10 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

- 45 La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 20 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usaron 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para equilibrar y 30 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 40 %. Los picos de elución se recogieron al mismo volumen. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores. La figura 3 muestra el perfil de purificación de PB-718.

Ejemplo 13. Preparación de PB-719 (Conjugado de PB-703, PB-105 y PEG-(ppMAL)2-20KD)

- 55 20 mg de PB-105 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China), 21 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 79,3 mg de PEG-(ppMAL)2-20KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y colocaron en un recipiente de vidrio de 100 ml (La relación molar de PEG, PB-105, PB-703 es 1:1,2:1,5). La mezcla se disolvió en 10 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

- 60 La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 20 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Tras la carga, se usaron 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0) para equilibrar y 30 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 40 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con

una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores. La figura 4 muestra el perfil de purificación de PB-719.

Ejemplo 14. Preparación de PB-720 (Conjugado de PB-703, PB-105 y PEG-(ppMAL)2-10KD)

20 mg de PB-105 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China), 21 mg de PB-703 (adquirido de Kaijie Peptide Co., Ltd., Chengdu, China) y 39,7mg de PEG-(ppMAL)2-10KD (producido por PEGBIO Co., Ltd., China) se pesaron y colocaron en un recipiente de vidrio de 100 ml (La relación molar de PEG, PB-105 y PB-703 es 1:1,2:1,5). La mezcla se disolvió en 10 ml de tampón PBS 0,2 M (pH 6,5) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora con agitación. El pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido clorhídrico para terminar la reacción. La solución de reacción se almacenó a 4 °C para su purificación y uso futuro.

La solución de reacción se diluyó 5 veces con agua ultrapura y el pH de la solución de reacción se ajustó a 4,0 usando ácido acético. La solución de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico Macrocap SP de 20 ml que se había equilibrado con 3-4 volúmenes de columna de tampón A (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0). Se usaron 30 volúmenes de columna de tampón de elución B (HAc-NaAc 20 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M) para la elución en gradiente hasta el 40 %. Los picos de elución se recogieron en volúmenes iguales y cada fracción recogida se analizó mediante HPLC. Las fracciones con una pureza superior al 95 % se combinaron y cuantificaron para proporcionar muestras para experimentos de eficacia posteriores. La figura 5 muestra el perfil de purificación de PB-720.

Ejemplo 15. CE50 *in vitro* de glucagón pegilado

Células HEK293 que expresan de manera estable el receptor de glucagón (HD Biosciences Co., Ltd., Shanghai, China) se cultivaron en medio DMEM (Hyclone) suplementado con 10 % de FBS (Hyclone) en una incubadora a 37 °C con 10 % de CO₂. Las células se digirieron con tripsina (Hyclone), se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5x10⁴ células/100 µl y se incubaron durante 16-24 horas. Después, el medio de cultivo original se descartó y se sustituyó por medio DMEM sin suero y la incubación se continuó durante 4 horas. Se añadieron glucagón de tipo silvestre, variantes de glucagón y glucagón pegilado (las concentraciones finales fueron 100 nmol/l, 30 nmol/l, 10 nmol/l, 3 nmol/l, 1 nmol/l, 0,3 nmol/l, 0,1 nmol/l, 0,01 nmol/l, respectivamente) y se incubaron con células durante 20 min. Se descartó el medio con glucagones en diferentes formas y se añadió tampón de lisis celular (incluido en el kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas AMPc, R&D Systems). La placa se colocó en un congelador a -80 °C y se congeló y descongeló dos veces para lisar las células. Los sobrenadantes se recogieron mediante centrifugación criogénica. Siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas AMPc (R&D Systems), las concentraciones de AMPc en el sobrenadante de los pocillos de muestra se determinaron trazando una curva estándar. Se usó el software Graphpad Prism para trazar las curvas de respuesta a la dosis de glucagón y sus variantes y se calculó la CE50 de cada curva de muestra.

Glucagón de tipo silvestre, las variantes de glucagón y el glucagón pegilado han mostrado que aumentan el contenido de AMPc en las células HEK293 y/o las células R de glucagón de una manera dependiente de la dosis a nivel celular, y los valores CE50 de las mismas para estimular las células para liberar AMPc se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 CE50 *in vitro* de glucagón pegilado

Compuesto	CE50 (nM)
Glucagón	0,84
PB-702	2,23
PB-703	1,7
PB-707	14,9
PB-716	6,2
PB-740	1,45
PB-741	2,25
PB-721	6,94
PB-722	12,3

Ejemplo 16. Experimento para el efecto farmacológico de la administración a largo plazo del conjugado de la presente divulgación sobre la pérdida de peso en ratones con DIO

Ratones macho C57BL/6 (Cavens Lab Animal Co., Ltd., Changzhou, China) fueron alimentados con una dieta rica en grasas (MD12032, 45 % de kcal, Medicience Co., Ltd., Jiangsu, China) durante 9 semanas, de los cuales el peso corporal era un 20 % mayor que el de los ratones alimentados con una dieta común (Suzhou Shuangshi Animal Feed

Technology Co., Ltd., China), lo que indica que el modelo de obesidad inducida por la obesidad (DIO) se estableció con éxito. 35 ratones con DIO se dividieron en 7 grupos en función de su peso corporal y nivel de azúcar en sangre aleatorio, con 5 ratones por grupo, que fueron el grupo de PB-716 (383 µg/kg), el grupo de PB-717 (383 µg/kg), el grupo de PB-718 (383 µg/kg), el grupo de PB-719 (383 µg/kg), el grupo de PB-720 (383 µg/kg), el grupo de Victoza (200 µg/kg) y el grupo de control modelo (solución salina fisiológica) (dosis en términos de contenido en péptidos). Después de la primera administración, cada grupo se observó durante 96 horas y a continuación se dosificó por segunda vez. En los experimentos posteriores, el grupo de Victoza se dosificó una vez al día y los grupos restantes se dosificaron una vez cada 3 días. Los experimentos de administración continua se realizaron durante un total de 14 días. Durante el período experimental, el peso corporal y la ingesta de alimentos de los ratones se midieron todos los días. Se midió el nivel de azúcar en sangre al azar antes del inicio del experimento y después del complemento del experimento.

Después de la primera administración, el peso corporal de cada grupo de tratamiento de animales fue significativamente menor que el del grupo de control. Los resultados se muestran en la figura 6. 48-96 horas después de la administración, el peso corporal de los ratones del grupo de Victoza se recuperó gradualmente; a las 96 horas, no hubo diferencia significativa en el peso corporal entre los ratones del grupo de Victoza y el grupo de control. El peso de los ratones del grupo de PB-720 se mantuvo básicamente constante durante las 48-96 horas después de la administración, con ligero rebote. El peso de los ratones en los grupos de PB-716, PB-717, PB-718 y PB-719 siguieron disminuyendo hasta 48 horas después de la administración y se recuperaron ligeramente durante las 72-96 horas después de la administración. En comparación con el grupo de control, el efecto de reducción de peso corporal de la administración única de PB-716, PB-717, PB-718 y PB-719 se puede mantener hasta 96 horas después de la administración, lo que indica que la pegilación prolonga en gran medida el tiempo de actuación del compuesto en animales.

El efecto de la administración continua sobre la ingesta de alimentos de ratones con DIO se muestra en la Figura 7. Después de una única administración, los ratones se observaron durante 96 horas y a continuación se inició la administración continua, en donde el grupo de Victoza se dosificó una vez al día, y los grupos restantes se dosificaron una vez cada 3 días. Dentro de los 14 días posteriores al inicio de la administración continua, la ingesta acumulada de alimentos del grupo de control modelo mostró una tendencia ascendente lineal, mientras que los grupos de tratamiento tienen diferentes grados de disminución en la ingesta de alimentos en comparación con el grupo de control. Al final de la administración continua de 14 días, la ingesta acumulada de alimentos de los grupos de PB-716 y Victoza fue la que más se redujo, hasta el 58,67 % y el 50,82 %, respectivamente. La ingesta acumulada de alimentos de los grupos de PB-720, PB-719, PB-718 y PB-717 también disminuyeron un 31,83 %, un 34,88 %, un 48,79 % y un 39,63 %, respectivamente. La Figura 8 mostró la tasa de descenso de la ingesta acumulada de alimentos de los grupos de tratamiento en relación con el grupo de modelo de control después de la administración durante 14 días consecutivos.

El efecto de la administración continua sobre el peso corporal de los ratones con DIO se muestra en la Figura 9 y la Figura 10. Al final del experimento, el peso corporal del grupo de control modelo aumentó en un 10,24 % en comparación con el de antes de la administración, y el peso corporal de cada grupo de tratamiento disminuyó en diferentes grados. Entre ellos, el grupo de PB-716 tiene la disminución más significativa, con una pérdida de peso del 38,03 % en comparación con antes de la administración, lo que mostró una diferencia estadísticamente significativa del grupo de control modelo ($p < 0,001$). La pérdida de peso en los otros grupos fue: el grupo de Victoza disminuyó un 15,83 % ($p < 0,05$) en comparación con el anterior a la administración; el grupo de PB-720 disminuyó un 10,21 % ($p < 0,05$); el grupo de PB-719 disminuyó un 24,73 % ($p < 0,001$); el grupo de PB-718 disminuyó un 30,25 % ($p < 0,001$); el grupo de PB-717 disminuyó un 28,11 % ($p < 0,001$), lo que indica que la administración a largo plazo de los compuestos de la serie PB-716 tiene una inhibición significativa en el peso corporal de los ratones con DIO.

El efecto de la administración continua sobre el nivel de azúcar en sangre aleatorio de ratones con DIO se muestra en la Figura 11. Después de 9 semanas de alimentación rica en grasas, el nivel de azúcar en la sangre al azar de los ratones C57BL/6 aumentó hasta cierto punto. El nivel de azúcar en sangre aleatorio promedio en el grupo de alimentación normal fue de 8,7 mmol/l, mientras que el nivel de azúcar en sangre aleatorio promedio en el grupo de alimentación rica en grasas aumentó en un 33,3 %, a 11,6 mmol/l. El nivel de azúcar en sangre aleatorio de cada grupo de tratamiento disminuyó significativamente después de la administración, y el grupo de PB-716 tuvo la mayor disminución (51,06 % en promedio) ($P < 0,05$). PB-720, PB-719 y PB-718 también disminuyeron un 29,31 %, un 33,40 % y un 38,89 %, respectivamente, lo que mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del grupo de control modelo, lo que indica que la administración a largo plazo de compuestos de la serie PB-716 tiene un efecto hipoglucemiante en ratones con DIO.

Estos resultados muestran que la serie PB-716 de conjugados de agonista dual de exendina-4 y glucagón prolongan en gran medida la duración de la acción del compuesto en animales debido a la unión de moléculas de PEG. La administración a largo plazo de los compuestos de la serie PB-716 tiene un efecto inhibitorio evidente sobre la ingesta de alimentos de los ratones con DIO y reduce significativamente el peso corporal de los ratones con DIO, entre los cuales PB-716 tiene el mejor efecto de pérdida de peso.

Ejemplo 17. Experimento sobre el efecto farmacológico de la administración a largo plazo de la combinación

de PB-708 y PB-120 sobre la pérdida de peso en ratones con DIO

Ratones macho C57BL/6 (Cavens Lab Animal Co., Ltd., Changzhou, China) fueron alimentados con una dieta rica en grasas (MD12032, 45 % de kcal, Medicience Co., Ltd., Jiangsu, China) durante 12 semanas, de los cuales el peso corporal era un 20 % mayor que el de los ratones alimentados con una dieta común (Suzhou Shuangshi Animal Feed Technology Co., Ltd., China), lo que indica que el modelo de obesidad inducida por la obesidad (DIO) se estableció con éxito. 35 ratones con DIO se dividieron en 7 grupos en función de su peso corporal y nivel de azúcar en sangre aleatorio, con 5 ratones por grupo, que fueron el grupo de Victoza (200 µg/kg), el grupo de dosis alta de PB-718 (383 µg/kg), el grupo de dosis baja de PB-718 (153,2 µg/kg), el grupo de PB-119 (210 µg/kg), el grupo de PEG-OXM (conjugado de agonista dual natural para el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón Oxintomodulina y PEG de 23KD) (222,5 µg/kg), el grupo de administración combinada (172,9 µg/kg de PB-708 + 210 µg/kg de PB-120) y el grupo de control modelo (solución salina fisiológica) (dosis en términos de contenido de péptido). El grupo de Victoza recibió una dosis una vez al día y los grupos restantes una vez cada 2 días. El experimento de administración continua se llevó a cabo durante un total de 14 días. Durante el período experimental, el peso corporal y la ingesta de alimentos de los ratones se midieron todos los días. Se midió el nivel de azúcar en sangre al azar antes del inicio del experimento y después del complemento del experimento.

El efecto de la administración a largo plazo sobre el peso corporal de los ratones con DIO se muestra en la Figura 12 y la Figura 13. Al final del experimento, el peso corporal del grupo de control modelo aumentó en un 6,30 % en comparación con el de antes de la administración, y el peso corporal de cada grupo de tratamiento disminuyó en diferentes grados. Entre ellos, el grupo de Victoza perdió un 15,92 % ($p < 0,05$) de peso en comparación con antes de la administración; el grupo de PB-119 perdió un 13,33 % ($p < 0,05$), similar al grupo de Victoza. El grupo de PEG-OXM solamente disminuyó un 1,34 % ($p > 0,05$), probablemente debido al hecho de que el agonista dual natural Oxintomodulina tiene una actividad débil frente al glucagón y el receptor de GLP-1. El peso corporal del grupo de administración combinada disminuyó un 24,72 % en comparación con el de antes de la administración, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en comparación con el grupo de control modelo. PB-718 mostró un efecto dependiente de la dosis sobre la pérdida de peso en ratones con DIO. El grupo de dosis baja de PB-718 perdió el 18,78 % del peso corporal ($p < 0,001$), mientras que el grupo de dosis alta de PB-718 perdió el 27,38 % del peso corporal ($p < 0,001$). Los resultados del experimento muestran que el agonista dual PB-718 para el receptor de glucagón y GLP-1, así como la administración combinada a largo plazo de agonista del receptor de glucagón + GLP-1, tiene un efecto inhibitorio obvio sobre el peso corporal de los ratones con DIO, cuyo efecto de pérdida de peso fue significativamente mejor que el del agonista del receptor de GLP-1 PB-119 solo.

El efecto de la administración a largo plazo sobre la ingesta de alimentos de ratones con DIO se muestra en la Figura 14 y la Figura 15. Durante el experimento, la ingesta acumulada de alimentos del grupo de control modelo mostró una tendencia ascendente lineal, mientras que los grupos de tratamiento tuvieron un grado diferente de disminución en la ingesta de alimentos en comparación con el grupo de control. Al final de la administración continua de 14 días, la ingesta acumulada de alimentos del grupo de administración combinada y el grupo de dosis alta de PB-718 fue el que más disminuyó, hasta un 43,69 % y un 45,34 %, respectivamente. La ingesta acumulada de alimentos del grupo de dosis baja de PB-718 y el grupo de PB-119 también disminuyó un 34,37 % y un 39,95 %, respectivamente.

El efecto de la administración a largo plazo sobre el nivel de azúcar en sangre aleatorio de ratones con DIO se mostró en la Figura 16. Después de 12 semanas de alimentación rica en grasas, el nivel de azúcar en la sangre al azar de los ratones C57BL/6 aumentó hasta cierto punto. El nivel de azúcar en sangre aleatorio promedio en el grupo de alimentación normal fue de 8,7 mmol/l, mientras que el nivel de azúcar en sangre aleatorio promedio en el grupo de alimentación rica en grasas aumentó en un 17,3 %, hasta 10,2 mmol/l. El nivel de azúcar en sangre aleatorio de cada grupo de tratamiento disminuyó significativamente después de la administración, y el nivel de azúcar en sangre del grupo de dosis alta de PB-718, grupo de administración combinada, grupos de dosis baja de PB-119 y PB-718 disminuyeron un 31,61 %, un 31,61 %, un 27,27 % y un 28,30 %, respectivamente, lo que mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del grupo de control modelo, lo que indica que la administración a largo plazo del compuesto PB-718 tiene cierto efecto hipoglucemiante en ratones con DIO.

Ejemplo 18. Experimento sobre el efecto farmacológico de la administración a largo plazo de la combinación de PB-119 y PB-721 o la combinación de PB-119 y PB-722 sobre la pérdida de peso en ratones con DIO

Ratones macho C57BL/6 (Cavens Lab Animal Co., Ltd., Changzhou, China) fueron alimentados con una dieta rica en grasas (MD12032, 45 % de kcal, Medicience Co., Ltd., Jiangsu, China) durante 16 semanas, de los cuales el peso corporal era un 20 % mayor que el de los ratones alimentados con una dieta común (Suzhou Shuangshi Animal Feed Technology Co., Ltd., China), lo que indica que el modelo de obesidad inducida por la obesidad (DIO) se estableció con éxito. 80 ratones con DIO se dividieron en 10 grupos en función de su peso corporal y nivel de azúcar en sangre aleatorio, con 8 ratones por grupo, que fueron el grupo de control modelo, el grupo de PB-119 (10 nmol/kg), el grupo de PB-721 (60 nmol/kg), el grupo de PB-722 (60 nmol/kg), el grupo de PB-722 (10 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg), el grupo de PB-722 (30 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg), el grupo de PB-722 (60 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg), el grupo de PB-722 (100 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg), el grupo de PB-722 (150 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg), el grupo de PB-721 (60 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg) y el grupo de control modelo (solución salina fisiológica). Cada grupo se administró por vía subcutánea, una vez cada dos días, y el experimento duró 21 días con 11 administraciones.

Durante el período experimental, el peso corporal y la ingesta de alimentos de los ratones se midieron todos los días. El nivel de azúcar en la sangre se midió el Día 1 y el Día 21, y el suero de triglicéridos en el suero, colesterol total, los triglicéridos en el hígado y otros índices se midieron el día 21.

- 5 El efecto de la administración a largo plazo sobre el peso corporal de los ratones con DIO se muestra en la Figura 17 y la Figura 18. Durante el experimento, el peso corporal del grupo de control modelo se mantuvo estable y el peso corporal de cada grupo de tratamiento disminuyó en diferentes grados. Después de la administración, el peso corporal del grupo de control modelo aumentó en un 0,85 % en comparación con antes de la administración. El peso corporal del grupo de PB-119 solo (10 nmol/kg) disminuyó un 14,37 %, y el peso corporal de los grupos de PB-721 (60 nmol/l) y PB-722 (60 nmol/l) solo disminuyó un 21,65 % y un 21,95 %, respectivamente. Sin embargo, en el caso de dosis iguales, los ratones en los grupos de administración combinada (10 nmol/kg de PB-119 + 60 nmol/kg de PB-721) y (10 nmol/kg de PB-119 + 60 nmol/kg de PB-722) tienen una disminución del peso corporal del 47,18 % y del 40,02 %, respectivamente, y la tasa de pérdida de peso corporal excedió la suma de la tasa causada por la administración de los dos componentes en la combinación sola, demostrando que el uso simultáneo de los dos componentes de la combinación tiene un efecto sinérgico en la pérdida de peso de los ratones con DIO.

Además, los inventores han encontrado sorprendentemente que cuando la relación molar del agonista del receptor de GLP-1 (es decir, PB-119) y el agonista del receptor de glucagón (es decir, PB-722) está dentro de un cierto intervalo, el efecto de pérdida de peso es sorprendentemente bueno. Véanse los datos del grupo de PB-722 (60 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg), el grupo de PB-722 (100 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg), el grupo de PB-722 (150 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg).

El efecto de la administración a largo plazo sobre la ingesta de alimentos de ratones con DIO se muestra en la Figura 19 y la Figura 20. PB-119, PB-721 y PB-722 solos tienen cierto efecto inhibitorio sobre el apetito de los ratones con DIO, mientras que la combinación de PB-119 y PB-721 o la combinación de PB-119 y PB-722 tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre el apetito de los ratones con DIO, que fue más prominente que la suma del efecto inhibitorio logrado por la administración de los dos componentes solos. En comparación con el grupo de control modelo, la ingesta acumulada de alimentos de los grupos de PB-119 (10 nmol/kg) solo, PB-721 (60 nmol/kg) solo y PB-722 (60 nmol/kg) solo disminuyeron un 25,14 %, un 2,36 % y un 9,11 %, respectivamente. La ingesta acumulada de alimentos del grupo de administración combinada (10 nmol/kg de PB-119 + 60 nmol/kg de PB-721) disminuyó en un 61,44 % y la ingesta acumulada de alimentos del grupo de administración combinada (10 nmol/kg de PB-119 + 60 nmol/kg de PB-722) disminuyó un 50,56 %.

Los resultados de los triglicéridos en el suero, el colesterol total en el suero y los triglicéridos en el hígado se muestran en la figura 21, en la figura 22 y en la figura 23. Los niveles de colesterol total y triglicéridos hepáticos en el grupo de ratones con DIO de control modelo fueron significativamente más altos que los del grupo de control normal, indicando un claro trastorno del metabolismo de los lípidos. La administración a largo plazo de PB-119 (10 nmol/kg), PB-721 (60 nmol/kg) o PB-722 (60 nmol/kg) solos no mejoraron significativamente el nivel de triglicéridos en el suero en ratones con DIO. El nivel de triglicéridos en el suero en los grupos de administración combinada de PB-119 y PB-721 o PB-119 y PB-722 a la misma dosis disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en un 32,58 % y un 22,83 %, respectivamente, en comparación con la del grupo control modelo.

El contenido de triglicéridos en el hígado de los ratones con DIO fue significativamente mayor que el de los ratones de control normales ($p < 0,01$). En comparación con el grupo de control modelo, el contenido de triglicéridos hepáticos del grupo de PB-119 (10 nmol/kg) solo disminuyó en un 12,67 % ($p > 0,05$); el contenido de triglicéridos hepáticos del grupo de PB-721 (60 nmol/kg) solo, el grupo de PB-722 (60 nmol/kg) solo y los dos grupos de administración combinada disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) en un 73,29 %, un 76,84 %, un 64,47 % y un 74,48 %, respectivamente, que estaba cerca del nivel de triglicéridos en el hígado en ratones de control normales.

El contenido de colesterol total en el suero de los ratones con DIO fue significativamente mayor que el de los ratones de control normales ($P < 0,001$). El contenido de colesterol total en el suero en el grupo de administración a largo plazo de PB-119 (10 nmol/kg) solo, el grupo de PB-721 (60 nmol/kg) solo y el grupo de PB-722 (60 nmol/kg) solo de ratones con DIO disminuyó ($p < 0,05$) en un 39,35 %, un 60,86 % y un 60,56 %, respectivamente. El contenido de colesterol total en el suero en la administración combinada del grupo de PB-119 y PB-721 o el grupo de PB-119 y PB-722 disminuyó significativamente ($p < 0,001$) en un 90,85 % y un 91,88 %, respectivamente.

Ejemplo 19. Experimento sobre el efecto farmacológico en la pérdida de peso en monos *Cynomolgus* con obesidad inducida por la dieta

60 14 monos *cynomolgus* con obesidad inducida por la dieta (adquiridos de Jingang Biotechnology Co. Ltd., Hainan, China; modelo de obesidad inducida por la dieta establecido por WuXi Apptec Co. Ltd., Shanghai, China; Índice de Masa Corporal $IMC > 35$) se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, con 1 mono por género en el grupo de control en blanco y 2 monos por género en el grupo de tratamiento: grupo de control en blanco (solución salina fisiológica al 0,9 %), grupo de dosis baja (la composición de la presente divulgación), grupo de dosis media (la composición de la presente divulgación) y grupo de dosis alta (la composición de la presente divulgación). A los animales de cada grupo se les administró por vía subcutánea una vez cada 4 días durante 8 veces consecutivas. Durante el experimento, los

animales fueron observados dos veces al día para el estado general, comportamiento, actividad, excreción, respiración y otros síntomas anormales. La cantidad de comida ingerida se midió todos los días, el peso corporal se midió cada 4 días y se tomaron muestras de sangre para medir los indicadores bioquímicos sanguíneos el día 1 (antes de la administración) y el día 32 (después de la administración).

5 En el experimento, a excepción de la pérdida de peso y la reducción de la ingesta de alimentos, todos los animales experimentales fueron bien tolerados y no mostraron otras anomalías.

10 El efecto de la administración a largo plazo de la composición de la presente divulgación sobre el peso corporal de monos cynomolgus obesos se muestra en la Figura 24. Durante el experimento, el peso corporal del grupo de control en blanco se mantuvo estable y el peso corporal de cada grupo de tratamiento disminuyó en diferentes grados. Después de la administración, el peso corporal del grupo de control en blanco aumentó en un 0,065 % en comparación con el anterior a la administración, y los porcentajes de pérdida de peso del grupo de dosis baja, el grupo de dosis media y el grupo de dosis alta fueron un 15,0 %, un 12,4 % y un 11,5 %, respectivamente.

15 El efecto de la administración a largo plazo sobre la ingesta de alimentos de la obesidad inducida por la dieta en monos cynomolgus se muestra en la Figura 25 y la Figura 26. Después de la administración una vez cada 4 días durante 8 veces consecutivas, la ingesta de alimentos de cada grupo de tratamiento se redujo notablemente. Antes y después de la administración, la ingesta de alimentos del grupo de control en blanco disminuyó solo un 2,33 %, mientras que la ingesta de alimentos del grupo de dosis baja, el grupo de dosis media y el grupo de dosis alta disminuyeron un 20 75,6 %, un 62,5 % y un 53,7 %, respectivamente.

Los resultados anteriores muestran que la composición de la presente divulgación puede reducir significativamente el peso corporal del sujeto y suprimir significativamente el apetito del sujeto.

25 Los resultados bioquímicos de la sangre de los animales de experimentación se muestran en la Tabla 3. Los valores promedio de triglicéridos, la glucosa y la alanina aminotransferasa se muestran en las Figuras 27, 28 y 29. A los monos Cynomolgus con obesidad inducida por la dieta se les inyectó por vía subcutánea la composición de la presente divulgación una vez cada 4 días durante 8 semanas consecutivas. Antes y después de la administración, los 30 triglicéridos en el suero, la glucosa en el suero y la alanina aminotransferasa en el suero disminuyeron, mientras que en el grupo de control en blanco, hubo pocos cambios en los triglicéridos, los niveles de glucosa y alanina aminotransferasa fueron ligeramente elevados. No hubo anomalías en los experimentos bioquímicos sanguíneos del grupo de dosis baja, el grupo de dosis media y el grupo de dosis alta.

Tabla 3. A los monos *Cynomolgus* con obesidad inducida por la dieta se les inyectó por vía subcutánea la composición de la presente divulgación durante 8 veces consecutivas. Se mostraron indicadores bioquímicos sanguíneos antes y después de la administración.

Grupo		1 (Grupo de control)		2 (Grupo de dosis baja)				3 (Grupo de dosis media)				4 (Grupo de dosis alta)			
Género		Macho	Hembra	Macho		Hembra		Macho		Hembra		Macho		Hembra	
N.º de animal		C1001	C1502	C2001	C2002	C2503	C2504	C3001	C3002	C3503	C3504	C4001	C4002	C4503	C4504
Colesterol total (mmol/l)	Antes de la administración	2,36	2,72	2,18	2,84	2,80	2,81	2,78	2,22	2,68	2,35	3,41	2,78	2,88	2,47
	Después de la administración	2,36	2,21	2,79	2,92	2,88	2,24	2,97	1,70	2,53	3,00	4,17	3,50	2,81	2,55
Triglicéridos (mmol/l)	Antes de la administración	0,91	1,46	1,53	1,26	1,03	0,57	0,70	0,49	0,61	1,51	0,30	1,46	0,30	1,60
	Después de la administración	1,25	0,97	0,42	0,22	0,63	1,05	0,45	0,31	0,40	0,43	0,25	0,62	0,32	0,82
Glucosa (mmol/l)	Antes de la administración	3,18	6,95	5,05	3,87	6,36	9,14	4,88	3,46	5,31	6,08	3,96	4,97	4,06	4,09
	Después de la administración	3,25	7,48	3,36	2,52	4,51	5,61	3,83	3,32	4,91	6,87	2,99	2,91	3,77	3,39
Bilirrubina total (umol/l)	Antes de la administración	2,46	2,69	2,49	5,16	2,65	3,39	3,38	3,18	2,87	2,87	4,61	2,48	5,52	2,87
	Después de la administración	2,15	3,43	5,33	5,77	3,98	11,69	6,05	3,84	3,87	4,71	4,13	3,72	8,08	4,46
Alanina Aminotransferasa (U/l)	Antes de la administración	30	41	41	60	26	20	73	24	25	129	43	54	56	64
	Después de la administración	42	50	18	50	50	19	22	29	23	42	18	35	42	65
Aspartato Aminotransferasa (U/l)	Antes de la administración	29	26	40	37	28	33	64	39	31	53	48	41	44	40
	Después de la administración	34	27	30	40	30	40	44	40	40	44	42	47	39	45

(continuación)

Grupo	1 (Grupo de control)		2 (Grupo de dosis baja)				3 (Grupo de dosis media)				4 (Grupo de dosis alta)			
	Género		Macho		Hembra		Macho		Hembra		Macho		Hembra	
N.º de animal	Macho	Hembra	C2001	C2002	C2503	C2504	C3001	C3002	C3503	C3504	C4001	C4002	C4503	C4504
Proteína total (g/l)	81,2	85,3	76	90	88	75,5	81,8	86,5	89,4	85,6	82,6	88,5	90,2	79,5
	80,4	81	70,5	82,2	83,2	68,5	79,1	80,6	86,5	87	80,3	84,8	88,8	75
Albumina (g/l)	41,5	42,5	40,4	46,9	37,2	38,4	41	43,2	44,8	39,5	43	44,8	43,9	38,8
	40,3	41,2	35,5	45	38,9	31,1	43	41,7	44	43	43,3	44,6	43,1	39,6
Fosfatasa Alcalina (U/l)	116	153	162	145	94	238	180	162	126	168	94	266	140	168
	115	114	162	122	80	474	128	130	98	123	119	193	110	124
Glutamil Transpeptidasa (U/l)	46	87	25	77	52	79	102	87	54	55	49	66	59	29
	45	77	22	74	49	58	86	96	59	35	64	52	55	26
Globulina (g/l)	39,7	42,8	35,6	43,1	50,8	37,1	40,8	43,3	44,6	46,1	39,6	43,7	46,3	40,7
	40,1	39,8	35	37,2	44,3	37,4	36,1	38,9	42,5	44	37	40,2	45,7	35,4
Albumina/Globulina	1,05	0,99	1,13	1,09	0,73	1,04	1	1	1	0,86	1,09	1,03	0,95	0,95
	1,00	1,04	1,01	1,21	0,88	0,83	1,19	1,07	1,04	0,98	1,17	1,11	0,94	1,12

(continuación)

Grupo	1 (Grupo de control)		2 (Grupo de dosis baja)				3 (Grupo de dosis media)				4 (Grupo de dosis alta)			
	Macho	Hembra	Macho		Hembra		Macho		Hembra		Macho		Hembra	
Género	C1001	C1502	C2001	C2002	C2503	C2504	C3001	C3002	C3503	C3504	C4001	C4002	C4503	C4504
N.º de animal														
Urea (mmol/l)	Antes de la administración	4,30	4,31	4,44	5,42	4,34	5,11	5,32	5,46	3,97	6,9	5,08	4,54	6,25
	Después de la administración	4,37	4,44	7,08	5,28	6,99	5,25	5,39	7,74	6,33	4,88	5,3	3,95	4,07
Creatinina (mmol/l)	Antes de la administración	81,0	93,0	109	65,0	50	119	82	45	54	102	116	50	39
	Después de la administración	72,0	77,0	104	60,0	48	108	75	42	55	87	86	49	39
Creatina cinasa (U/l)	Antes de la administración	149	112	213	86,0	96	150	96	118	391	139	174	138	314
	Después de la administración	294	59	153	79,0	186	96	92	217	181	60	175	86	394
Calcio (mmol/l)	Antes de la administración	2,42	2,41	2,58	2,36	2,49	2,49	2,54	2,72	2,51	2,69	2,74	2,41	2,31
	Después de la administración	2,43	2,33	2,46	2,45	2,38	2,37	2,47	2,73	2,79	2,49	2,47	2,41	2,32
Fósforo (mmol/l)	Antes de la administración	1,44	1,46	1,8	1,01	2,03	1,58	1,87	1,75	1,52	1,91	1,65	1,85	1,7
	Después de la administración	1,6	1,62	1,49	1,08	1,94	1,3	1,56	1,16	1,06	1,38	1,26	1,44	1,41
Sodio (mmol/l)	Antes de la administración	145	148	151	143	149	149	150	152	149	155	162	145	149
	Después de la administración	143	146	144	142	141	145	146	151	148	145	147	147	151

(continuación)

Grupo		1 (Grupo de control)		2 (Grupo de dosis baja)				3 (Grupo de dosis media)				4 (Grupo de dosis alta)			
Género		Macho	Hembra	Macho		Hembra		Macho		Hembra		Macho		Hembra	
N.º de animal		C1001	C1502	C2001	C2002	C2503	C2504	C3001	C3002	C3503	C3504	C4001	C4002	C4503	C4504
Potasio (mmol/l)	Antes de la administración	4,3	4,1	4,0	4,9	4,1	4,9	5,1	5,3	6,4	3,8	4,3	5,5	4,2	3,8
	Después de la administración	4,6	4,9	4,8	5,1	4,5	5,9	4,1	6,6	7,1	5,8	5,4	5,6	5,0	5,1
Cloro (mmol/l)	Antes de la administración	105	105	106	104	103	106	106	107	106	103	104	114	103	105
	Después de la administración	104	111	103	106	107	101	105	110	112	110	106	110	112	115

Los efectos de la administración a largo plazo en la cintura y la distribución de grasa de los monos cynomolgus con obesidad inducida por la dieta se muestran en la Figura 30 y la Figura 31. Después de la administración una vez cada 4 días durante 8 veces consecutivas, la cintura y la distribución de grasa en todos los grupos de tratamiento disminuyeron significativamente, mientras que la cintura y la distribución de la grasa de los monos cynomolgus en el grupo de control en blanco no cambiaron significativamente antes y después de la administración.

Ejemplo 20. Experimento para el efecto farmacológico de la combinación de PB-119 y PB-722 en la pérdida de peso en ratones con DIO

Se alimentó a ratones C57BL/6 macho (de la misma fuente descrita anteriormente) con una dieta rica en grasas (45 % de kcal) durante 22 semanas. Su peso corporal promedio y su nivel de azúcar en la sangre fueron un 20 % más altos en comparación con los ratones alimentados con dietas comunes de la misma edad, lo que indica que el modelo de obesidad e hiperglucemia se estableció con éxito. 36 ratones con DIO se dividieron en 6 grupos en función de su peso corporal y nivel de azúcar en sangre aleatorio, con 6 ratones por grupo. El grupo 1 fue el grupo de control modelo, el grupo 2 fue de 10 nmol/kg (42,03 µg/kg, basado en péptido, lo mismo a continuación) de grupo PB-119, el grupo 3 fue 60 nmol/kg (212,58 µg/kg) de grupo PB-722, el grupo 4 fue 10 nmol/kg (42,03 µg/kg) de PB-119 y 20 nmol/kg (70,86 µg/kg) de grupo PB-722, el grupo 5 fue 10 nmol/kg (42,03 µg/kg) de PB-119 y 60 nmol/kg (212,58 µg/kg) de grupo PB-722, el grupo 6 fue el grupo de inyección de liraglutida de 25 nmol/kg (75,02 µg/kg). A excepción de que la administración se llevó a cabo dos veces al día en el grupo 6, la administración se llevó a cabo una vez cada dos días en otros grupos. El experimento se llevó a cabo durante un total de 21 días para una administración continua. El peso corporal y la ingesta de alimentos de los ratones se midieron el día de la administración, y el nivel de azúcar en sangre aleatorio y el nivel de azúcar en sangre en ayunas se midieron el segundo día después de la última administración.

Los resultados mostraron que la administración continua de la combinación (PB-119 + PB-722) tiene un efecto inhibitorio significativo sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal de los ratones con DIO.

Dentro de los 21 días posteriores al inicio de la administración continua, la ingesta acumulada de alimentos del grupo de control modelo mostró una tendencia ascendente lineal, y la ingesta de alimentos de los grupos combinados disminuyó en varios grados en comparación con el grupo de control. Los resultados se muestran en la Figura 32 y en la Figura 33. Al final del experimento de administración continua de 21 días, el grupo 5: PB-722 (60 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg) mostró la mayor disminución en la ingesta acumulada de alimentos, alcanzando el 61,1 %, mientras que el grupo de PB-119 tuvo la menor disminución en la ingesta acumulada de alimentos, que fue del 14,4 %.

El peso corporal del grupo de control modelo aumentó en un 2,3 % en comparación con antes de la administración, mientras que el peso corporal de los grupos de tratamiento mostró disminución en varios grados. Los resultados se muestran en la Figura 34 y en la Figura 35. La disminución del grupo de combinación PB-722 (60 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg) fue la más significativa, que fue una disminución del 46,1 % en comparación con antes de la administración, mostrando relevancia estadística en comparación con el grupo de control modelo ($p < 0,01$). El grupo PB-119 tiene la menor pérdida de peso, lo que supuso una disminución del 16,6 % en comparación con antes de la administración.

La administración continua de la combinación redujo significativamente el nivel de azúcar en la sangre en ayunas en los ratones. Excepto que la concentración del nivel de azúcar en la sangre en ayunas en el grupo de control aumentó, la concentración del nivel de azúcar en la sangre en ayunas en otros grupos de tratamiento disminuyó en varios grados. Los resultados se muestran en la figura 36. El grupo de combinación PB-722 (60 nmol/kg) + PB-119 (10 nmol/kg) tuvo la disminución más significativa, que fue del 39,6 % en comparación con antes de la administración. El nivel de azúcar en la sangre en ayunas en el grupo de liraglutida (administrada dos veces al día) se redujo en un 37,0 %. El grupo de PB-119 tuvo la menor disminución del nivel de azúcar en la sangre, que fue un 17,9 % más bajo que antes de la administración.

La administración continua de la combinación también mejoró significativamente la tolerancia oral a la glucosa en ratones. Después de 21 días de administración, se realizó un experimento de tolerancia oral a la glucosa. A los ratones se les administró por vía oral una solución de glucosa de 2,5 g/kg y se midió el nivel de glucosa al azar a los 0 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min después de la alimentación con azúcar. Como se muestra en los resultados, el área bajo la curva de concentración-tiempo del nivel de azúcar en la sangre de los grupos de combinación de dosis alta y dosis baja fue significativamente menor que la del grupo de control y significativamente mejor que el grupo de liraglutida, lo que demostró que la combinación de la presente divulgación mejoró de forma eficaz la tolerancia oral a la glucosa en ratones, y los resultados se muestran en la Figura 37.

Ejemplo 21. Experimento para el efecto farmacológico de la combinación de PB-119 y PB-722 en modelo de ratón con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)

30 ratones C57/BL6J (adquiridos de Lingchang Biotechnology Co. Ltd., Shanghai, China) se utilizaron en este experimento. A veinticuatro de ellos se les inyectó estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal una semana después de nacer y se les alimentó con una dieta rica en grasas (adquirida de Research Diets, Inc) durante cinco semanas para crear con éxito un modelo de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Los otros 6 se usaron como control normal

y se alimentaron con dieta normal. La administración comenzó a la sexta semana. 24 ratones modelo con EHNA se dividieron aleatoriamente en 4 grupos según su peso corporal, 6 ratones por grupo, que fueron el grupo de control en blanco (solución salina fisiológica al 0,9 %), el grupo de control positivo (10 mg/kg de telmisartán), el grupo de dosis baja (10 nmol/kg de PB-119 + 30 nmol/kg de PB-722), el grupo de dosis alta (10 nmol/kg de PB-119 + 60 nmol/kg de PB-722). El grupo de control positivo se administró por vía oral una vez al día y los otros grupos se administraron por vía subcutánea una vez cada dos días durante 21 días consecutivos. Durante el período de administración, el peso corporal se midió todos los días y la ingesta de alimentos se midió cada dos días. Después del último día de administración, los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche y a continuación se pesaron y sacrificaron. Se tomaron suero y tejidos hepáticos y se midieron los pesos del hígado. Se detectaron niveles séricos de glucosa e insulina. El tejido hepático se fijó con una solución de formaldehído y se hicieron secciones de tejido y se tiñeron con HE, rojo aceite y rojo Sirio. Las secciones fueron examinadas y puntuadas para determinar el índice de EHNA.

El efecto de la administración a largo plazo sobre el nivel de azúcar en sangre y los niveles de insulina en ratones se muestra en la Figura 38 y la Figura 39. La concentración del nivel de azúcar en sangre del grupo de control modelo fue significativamente mayor que la del grupo de control normal. El control positivo de telmisartán no tuvo efecto sobre el nivel de azúcar en sangre en animales. Después de la administración a largo plazo del grupo de dosis baja combinado (10 nmol/kg de PB-119 + 30 nmol/kg de PB-722) y el grupo de dosis alta (10 nmol/kg de PB-119 + 60 nmol/kg de PB-722), la concentración del nivel de azúcar en la sangre disminuyó significativamente, mostrando un efecto obvio en la reducción del nivel de azúcar en la sangre. Después de la administración a largo plazo, no hubo cambios significativos en el nivel de insulina en cada grupo. Combinando este resultado con los cambios en la concentración del nivel de azúcar en la sangre, se demostró que la administración a largo plazo de la combinación mejoró la sensibilidad a la insulina en animales.

Después de 21 días de administración continua, las puntuaciones de EHNA de las secciones del hígado se muestran en la Figura 40. Las puntuaciones de EHNA del grupo de control modelo fueron significativamente más altas que las del grupo de control normal, indicando que el modelo fue establecido exitosamente. La administración a largo plazo de la combinación PB-119 + PB-722 mejoró la puntuación de EHNA en animales de forma dependiente de la dosis, lo que indica que la administración combinada mejoró significativamente la EHNA en ratones. Las puntuaciones de EHNA de los grupos de dosis alta y dosis baja fueron más bajas que las del fármaco de control positivo, telmisartán.

La descripción anterior es solo una realización preferida, que es solo a modo de ejemplo y no limita la combinación de características necesarias para llevar a cabo la presente divulgación. Los encabezados proporcionados no pretenden limitar las diversas realizaciones de la presente divulgación. No se pretende que términos tales como "comprende", "que comprende/n" e "incluye" sean limitados. Asimismo, a menos que se especifique lo contrario, un sustantivo sin modificación numérica incluye la forma plural y "o" significa "y/o". A menos que se defina lo contrario en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto habitual en la materia.

Listado de secuencias

<110> PEGBIO CO.,LTD.

<120> COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN AGONISTA DEL RECEPTOR DE GLP-1 Y UN AGONISTA DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN Y APLICACIÓN DE LA MISMA

<130> JCL/P200863EP00

<140> EP16881214.7

<141> 28/12/2016

<150> CN201511017796

<151> 29/12/2015

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PB-105

<400> 1

ES 2 912 251 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Cys
35

<210> 2
<211> 29
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PB-702

<400> 3

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> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PB-703

<400> 4

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 Cys Trp Leu Met Asn Thr
20 25

ES 2 912 251 T3

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> PB-740
 10
 <400> 5
 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 Cys
 20 25 30
 <210> 6
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> PB-741
 20
 <400> 6
 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

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agonista del receptor de GLP-1 y un agonista del receptor de glucagón, cada uno conjugado independientemente con un polímero hidrófilo, en donde
- el agonista del receptor de GLP-1 es PB-105, y el agonista del receptor de glucagón se selecciona del grupo que consiste en PB-702, PB-703, PB-740 y PB-741, en donde
- PB-105 tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,
 PB-702 tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,
 PB-703 tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,
 PB-740 tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y
 PB-741 tiene una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6;
- el polímero hidrófilo es polietilenglicol ("PEG"); y
 la relación molar del agonista del receptor de GLP-1 al agonista del receptor de glucagón es de 1:1 a 1:15.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polietilenglicol tiene un peso molecular de 2 kDa a 60 kDa, de 5 kDa a 50 kDa, preferentemente de 10 kDa a 40 kDa, más preferentemente de 20 kDa a 40 kDa, particularmente de 15 kDa a 30 kDa, más particularmente de 21 kDa a 29 kDa.
4. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un elemento seleccionado del grupo que consiste en: combinación de PB-721 y PB-119, combinación de PB-722 y PB-119, y la combinación de PB-708 y PB-120, en donde:
- PB-721 es mPEG-23KD-ppMAL-PB-740, en donde PB-740 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;
 PB-722 es mPEG-23KD-ppMAL-PB-741, en donde PB-741 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;
 PB-119 es mPEG-23KD-ppMAL-PB-105, en donde PB-105 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
 PB-120 es mPEG-25KD-ppMAL-PB-105, en donde PB-105 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y
 PB-708 es mPEG-25KD-ppMAL-PB-703, en donde PB-703 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
5. Un kit, que comprende la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y opcionalmente instrucciones de uso.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en:
- 1) prevenir o tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico, perder peso, reducir el nivel de lípidos y/o reducir el nivel de azúcar en la sangre; o
 2) inhibir el apetito en un sujeto, reducir el nivel de colesterol total en el suero y/o reducir el contenido de triglicéridos en el hígado.

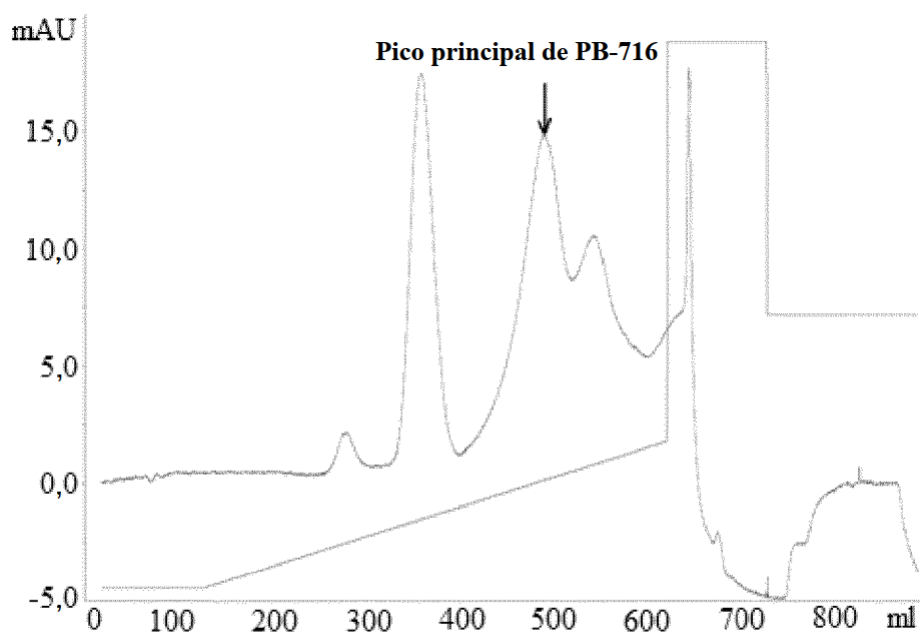


Figura 1

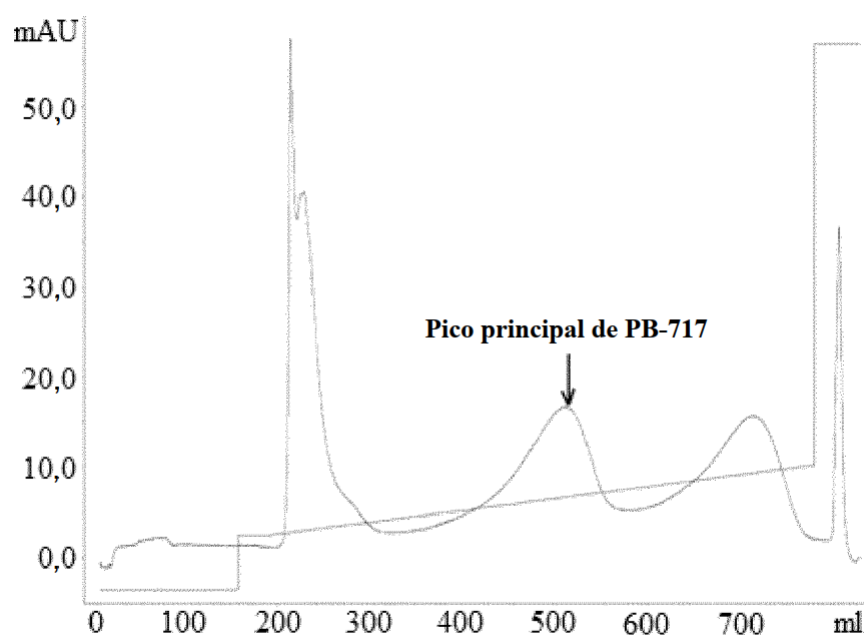


Figura 2

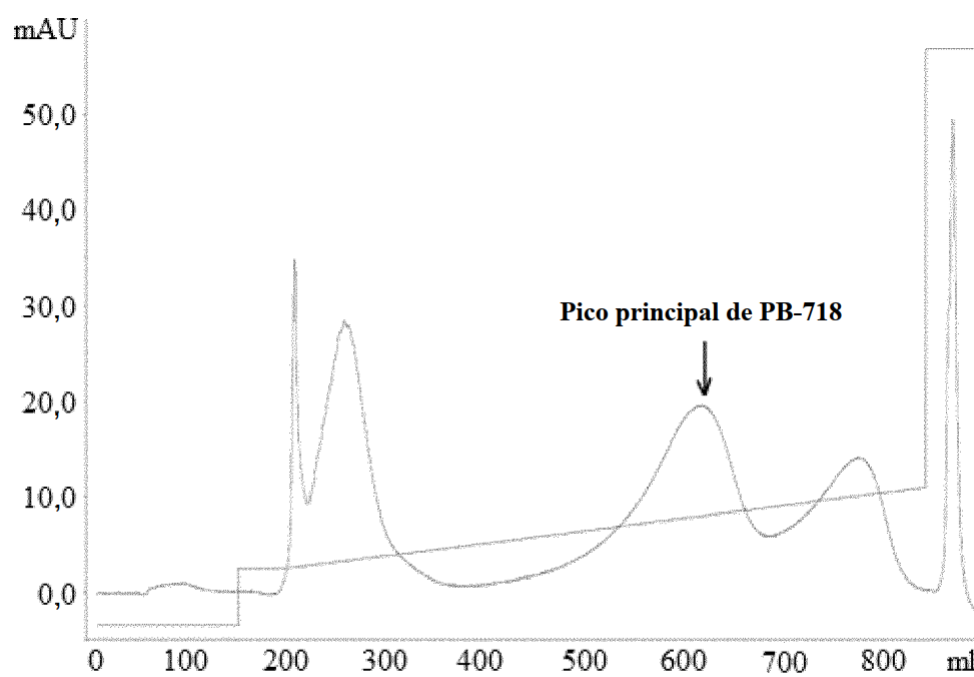


Figura 3

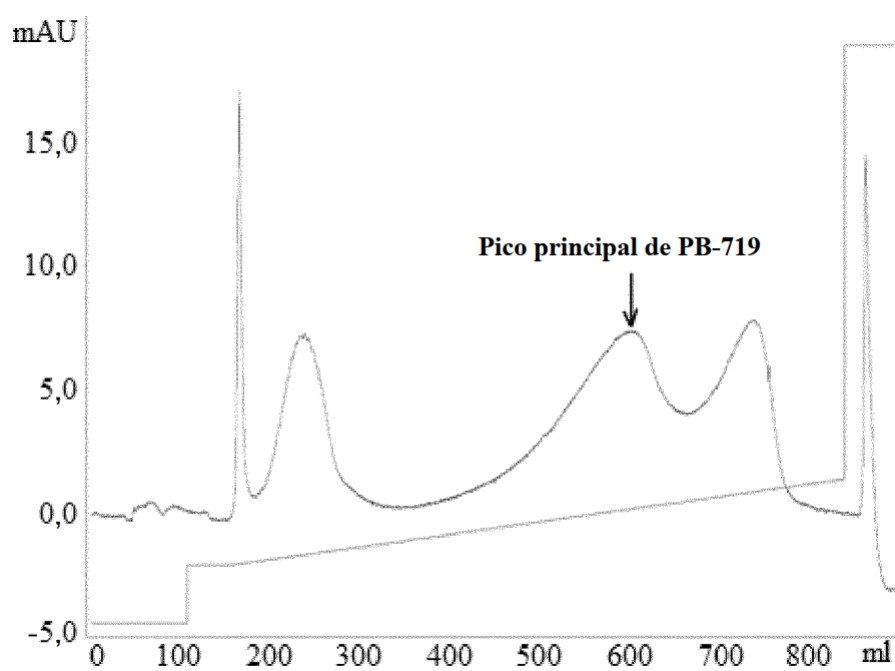


Figura 4

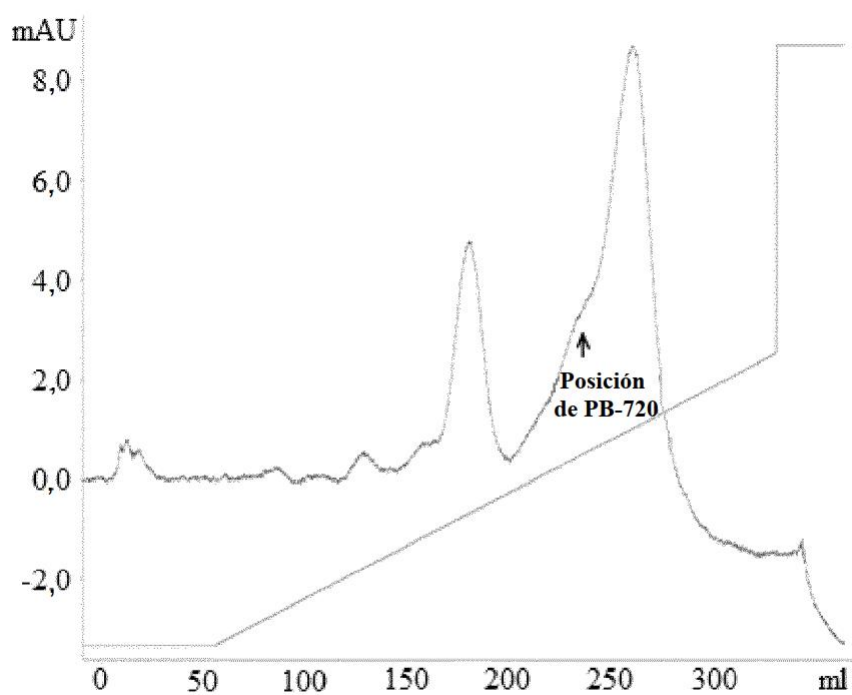


Figura 5

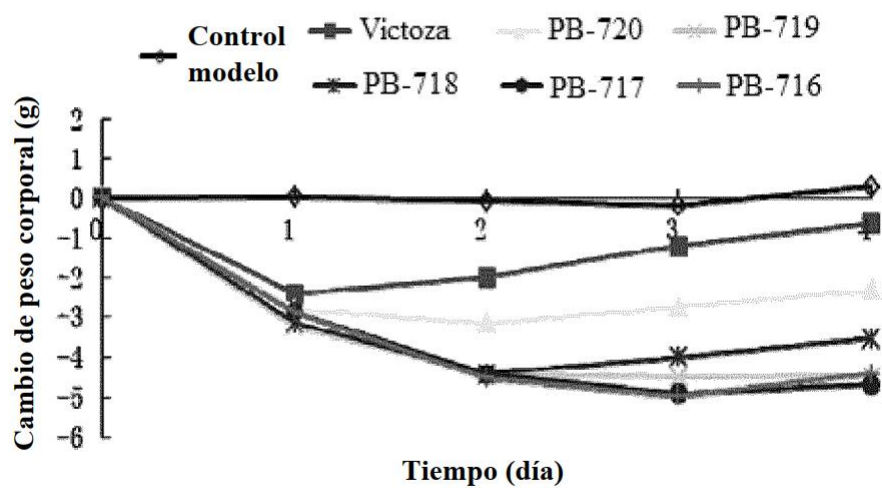


Figura 6

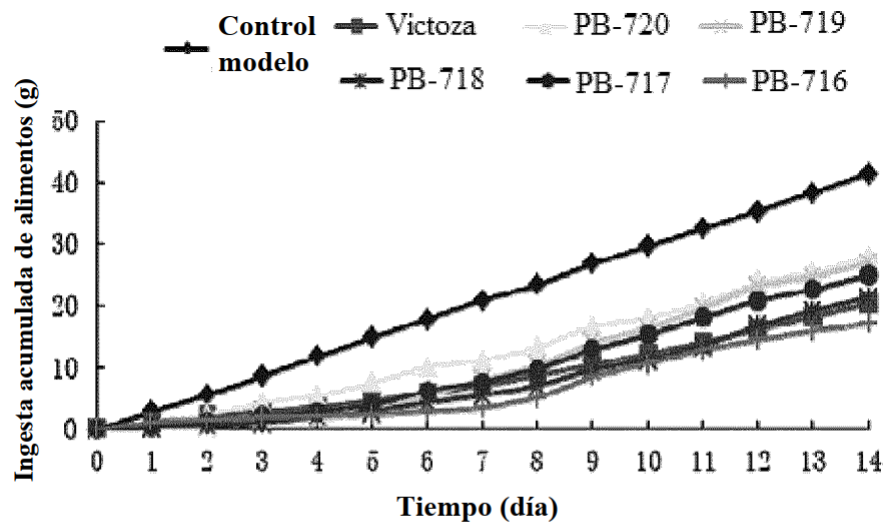


Figura 7

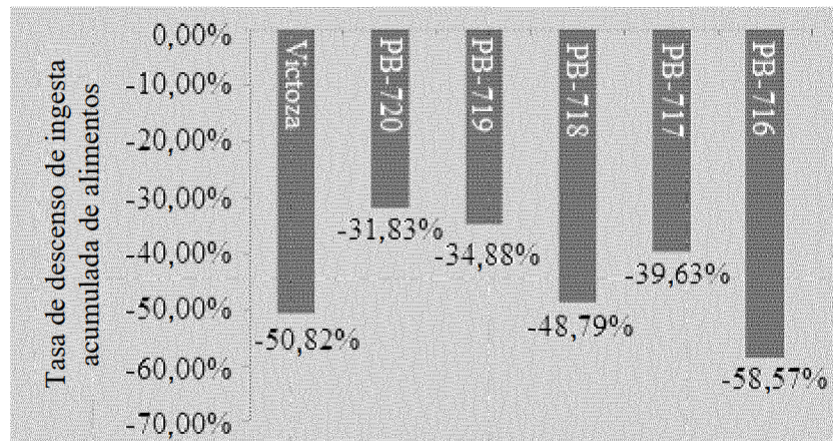


Figura 8

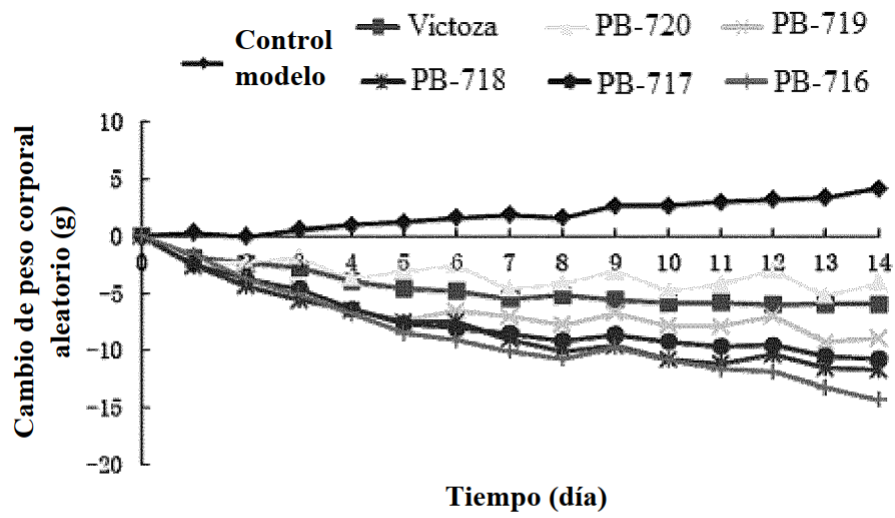


Figura 9

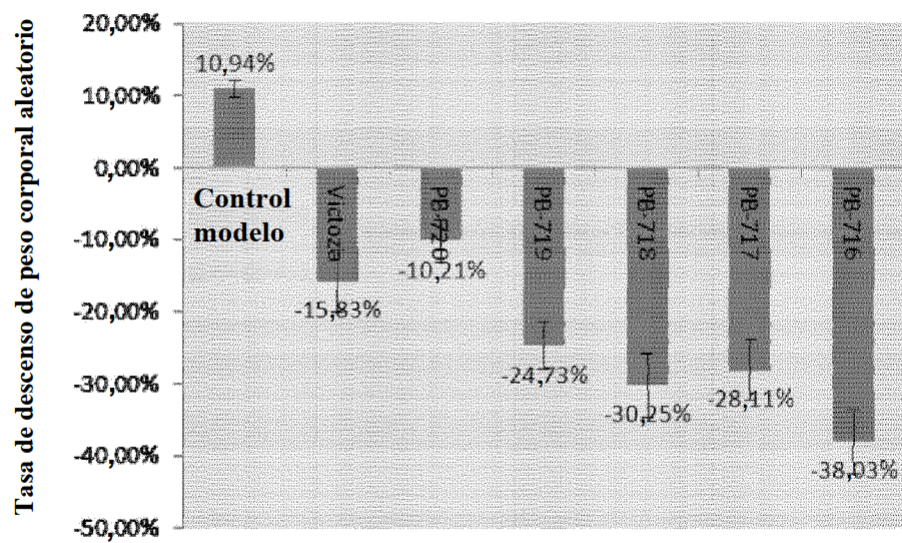


Figura 10

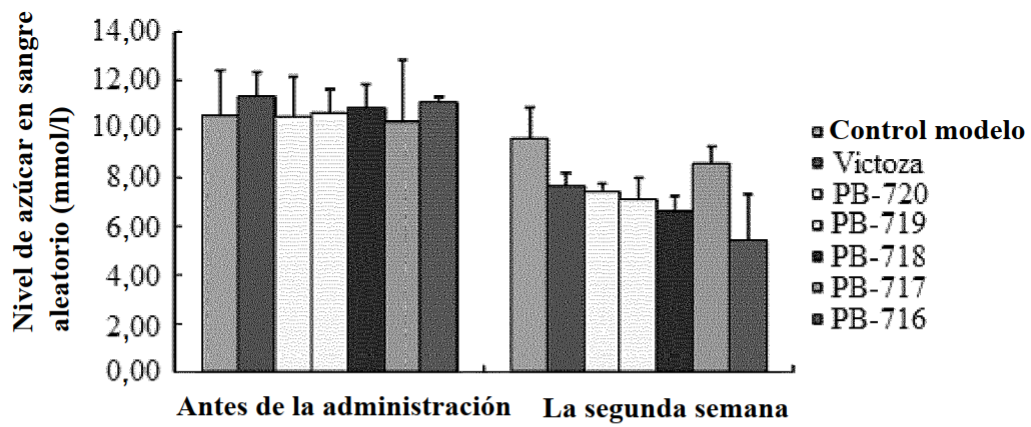


Figura 11

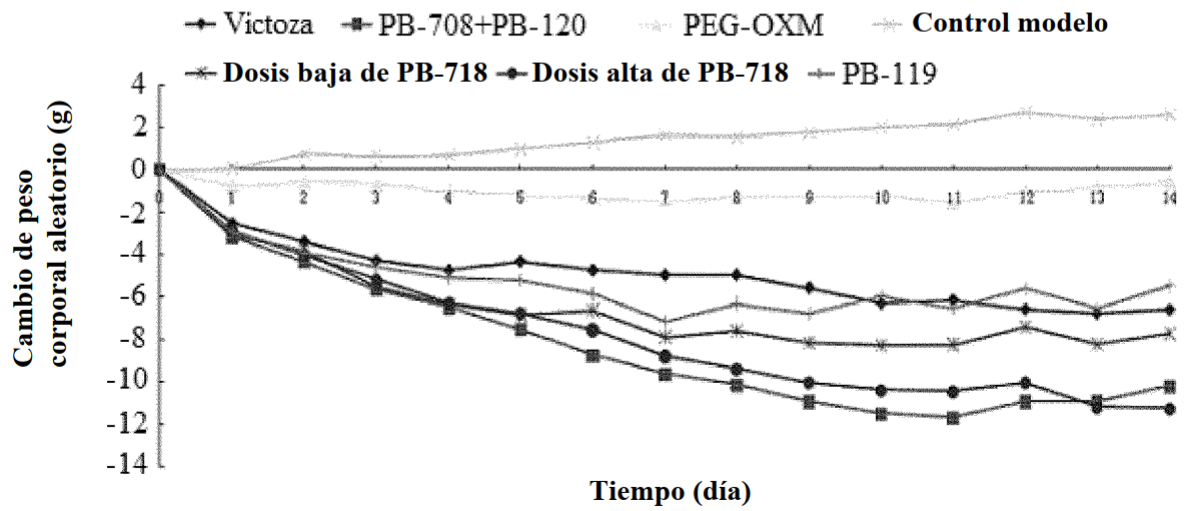


Figura 12

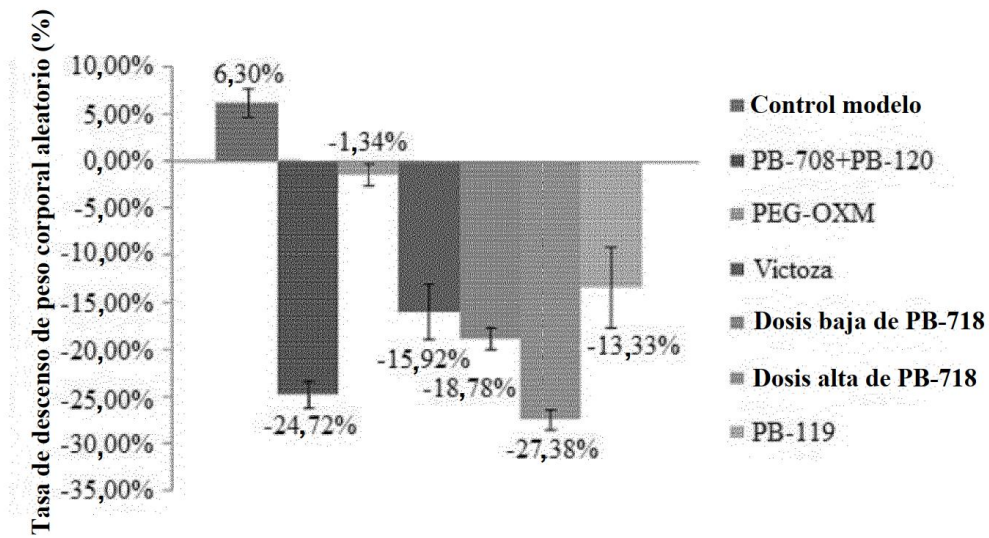


Figura 13

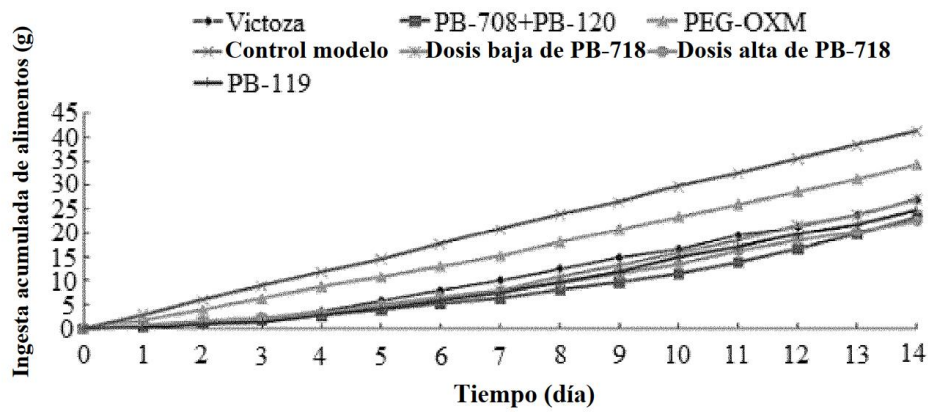


Figura 14

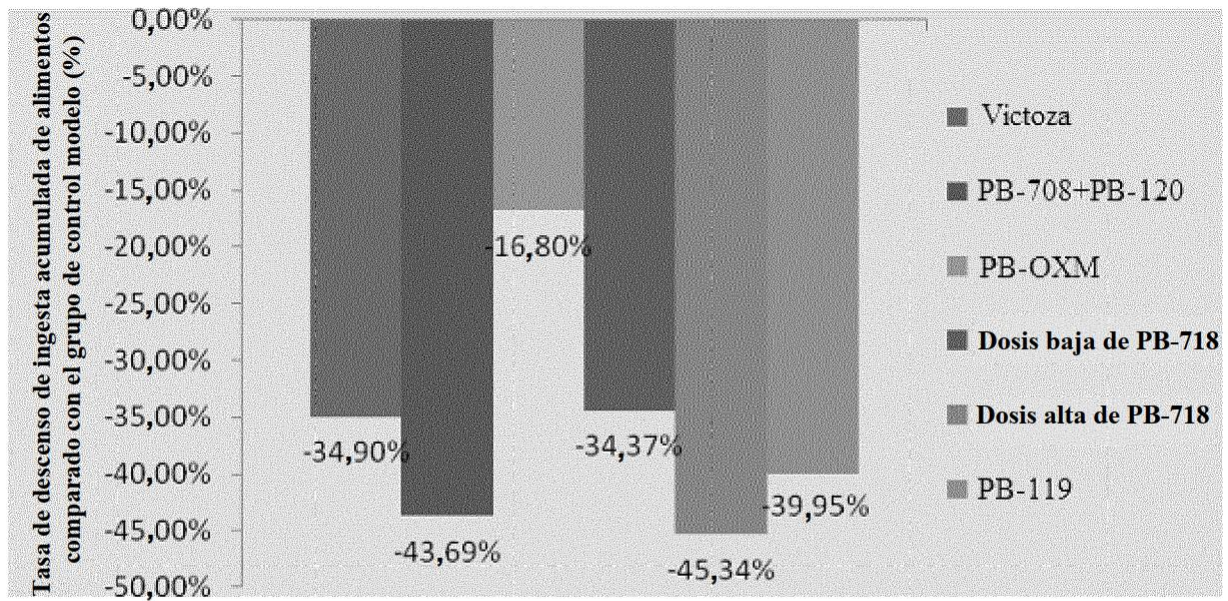


Figura 15

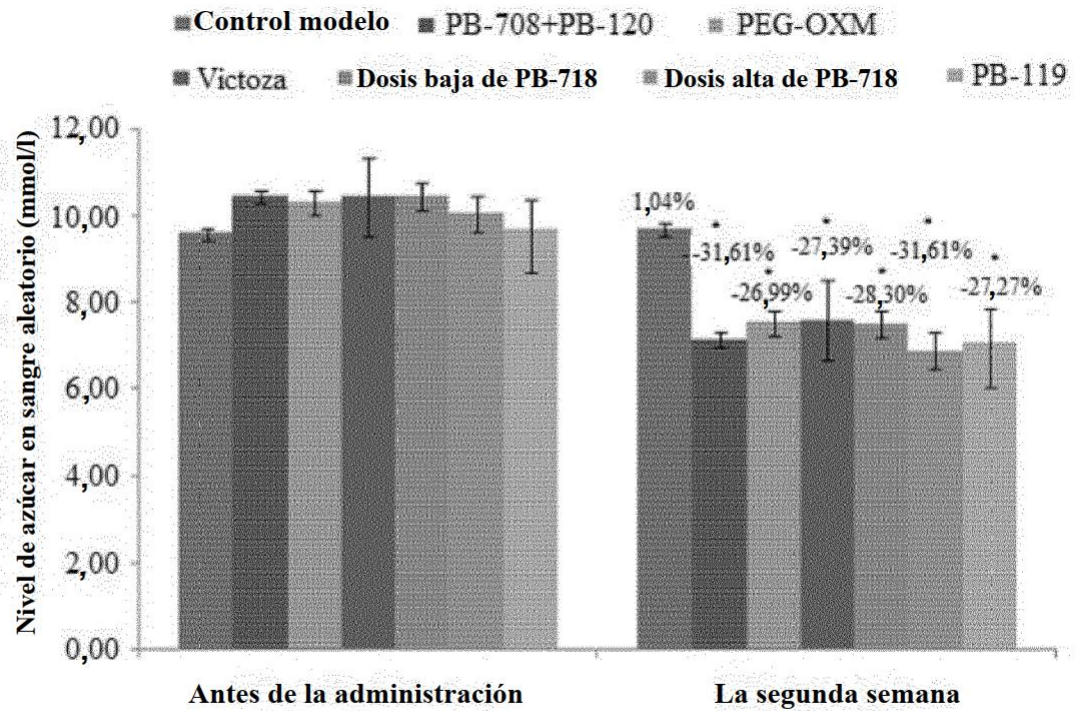


Figura 16

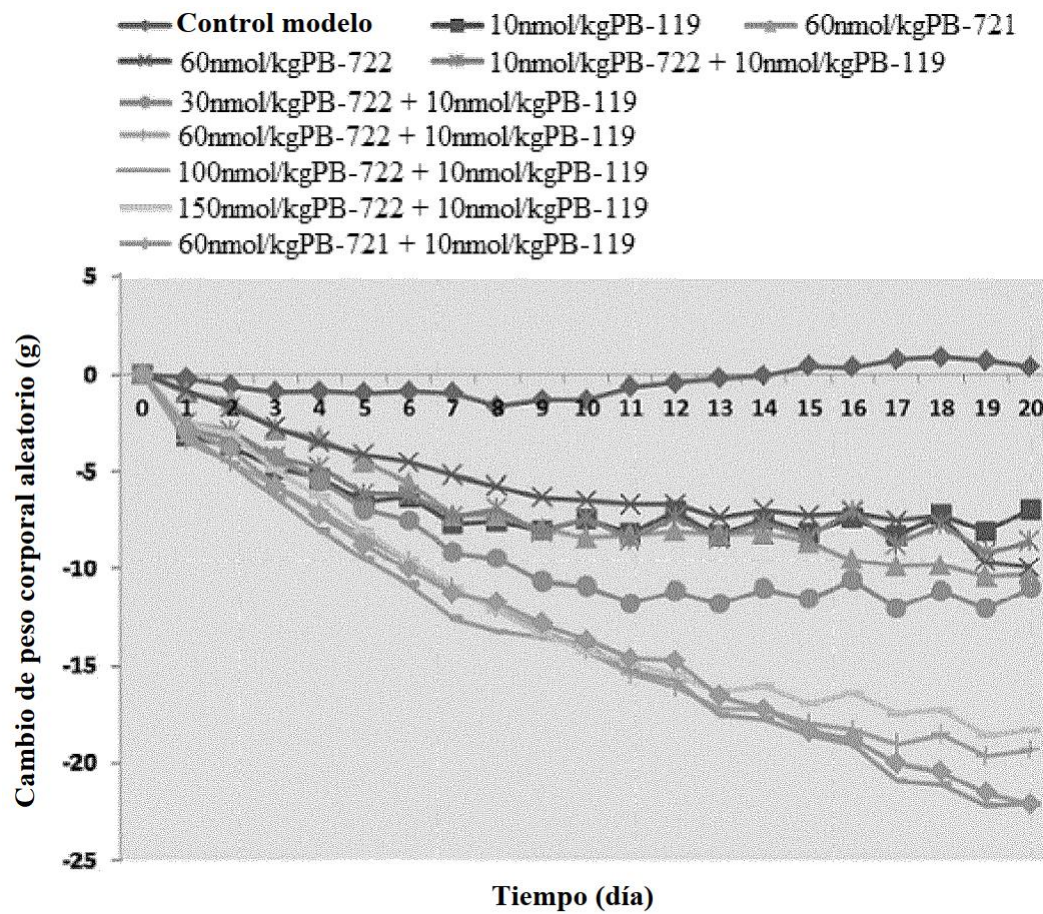


Figura 17

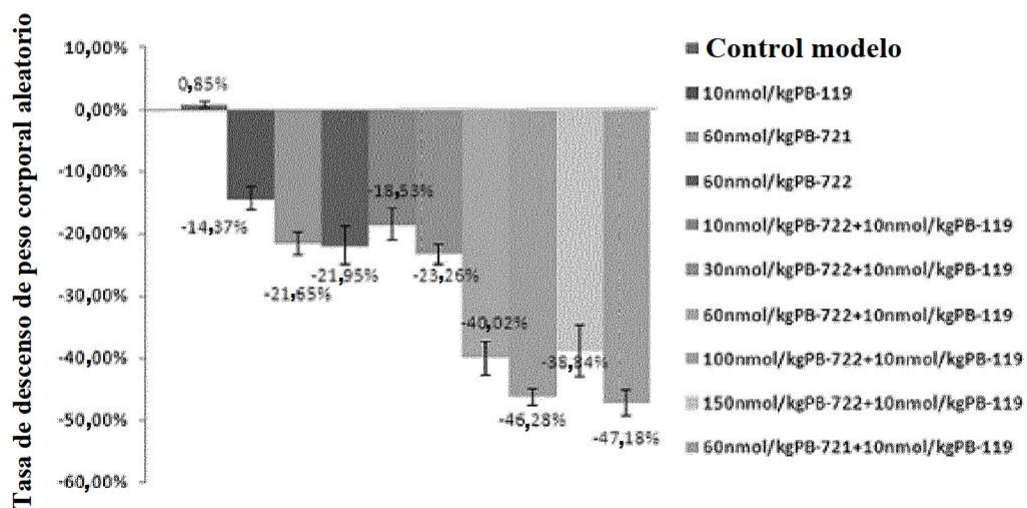


Figura 18

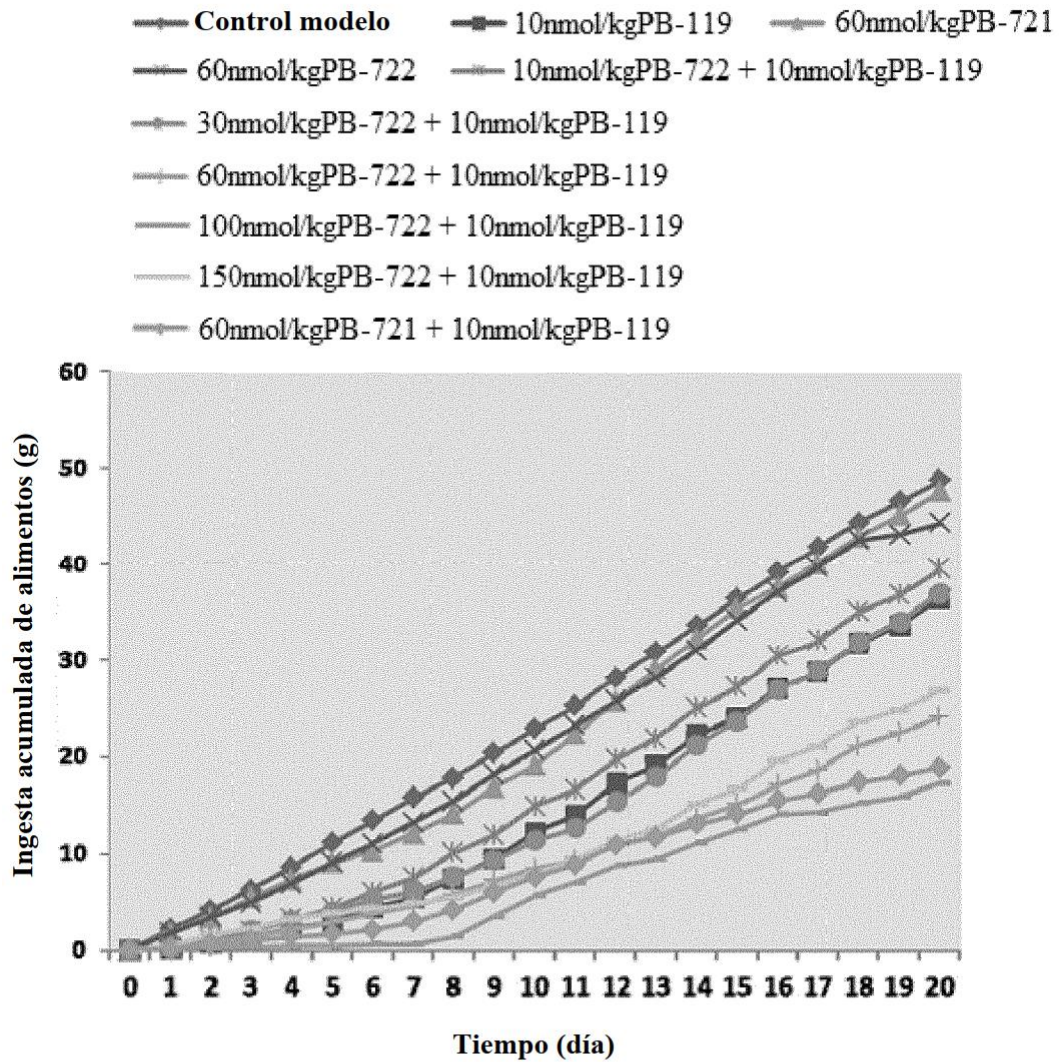


Figura 19

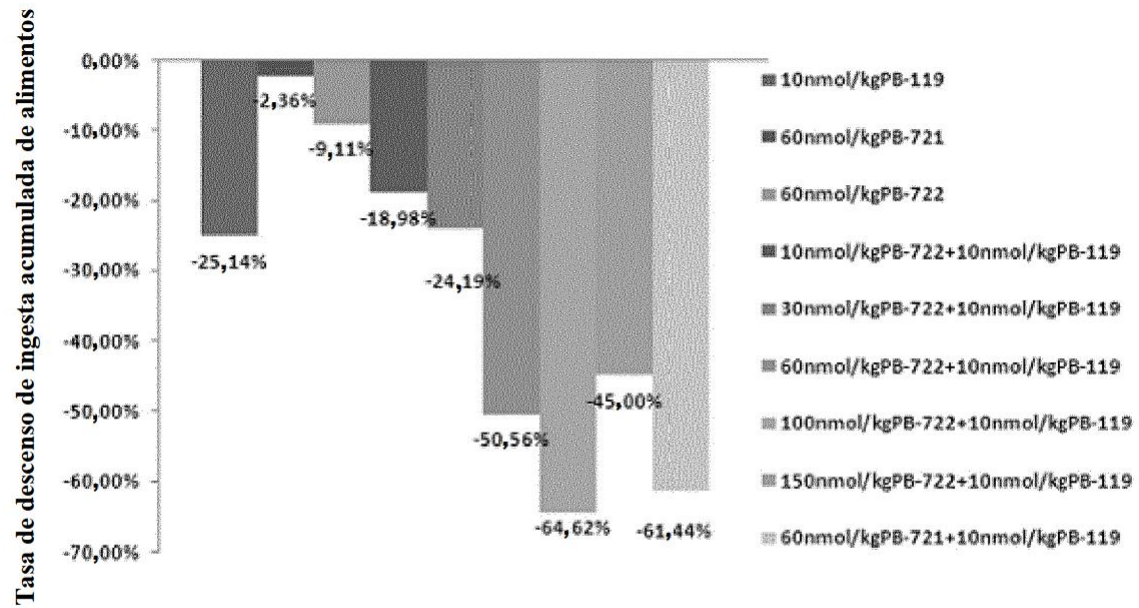


Figura 20

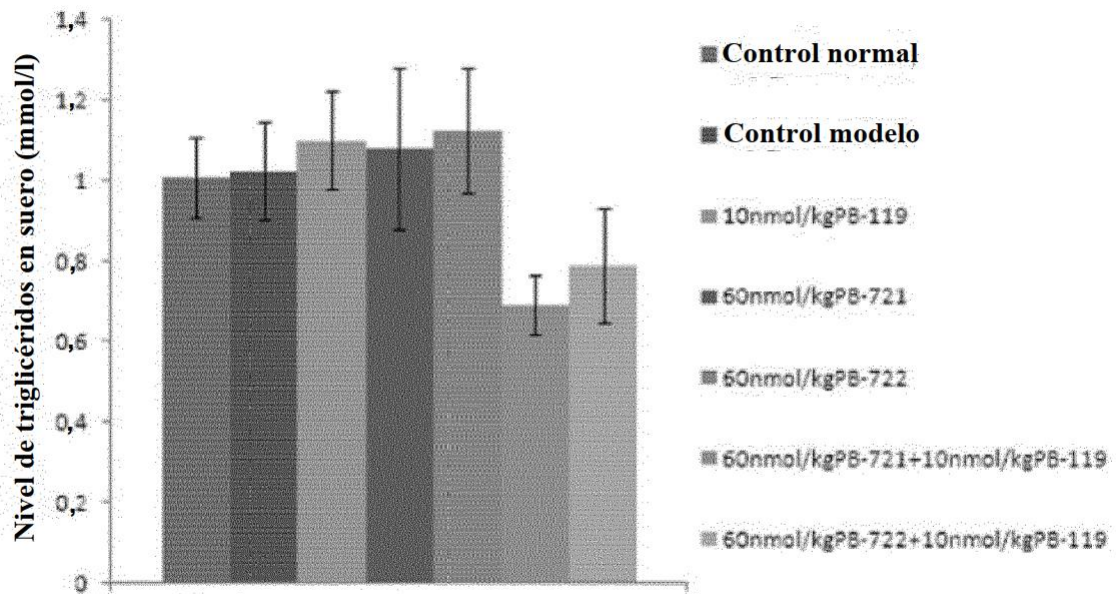


Figura 21

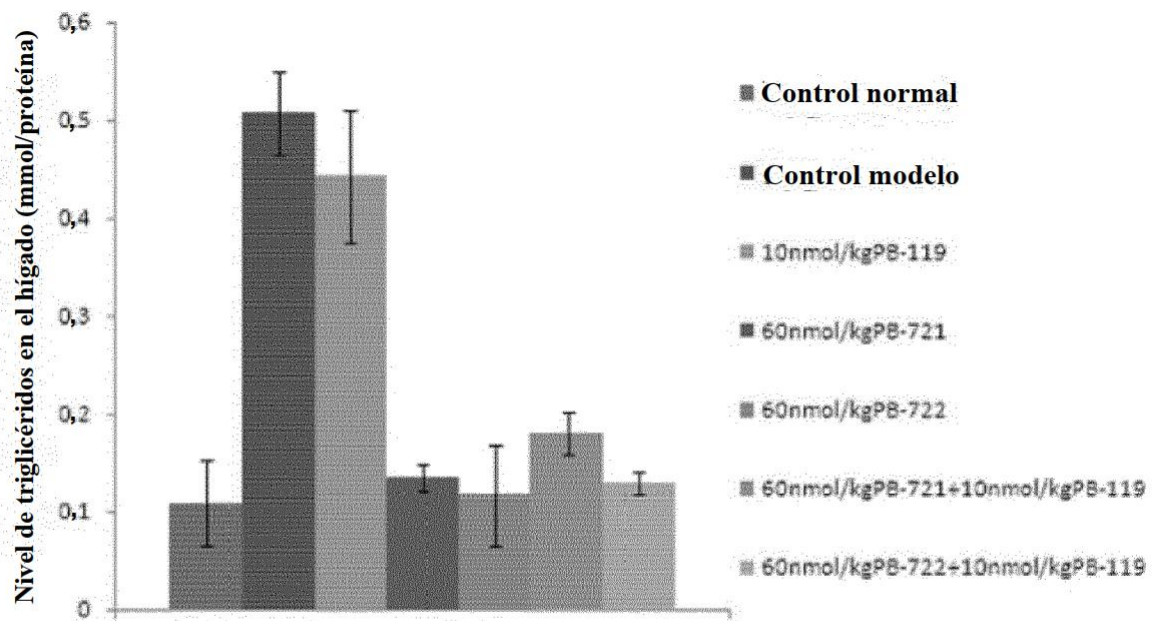


Figura 22

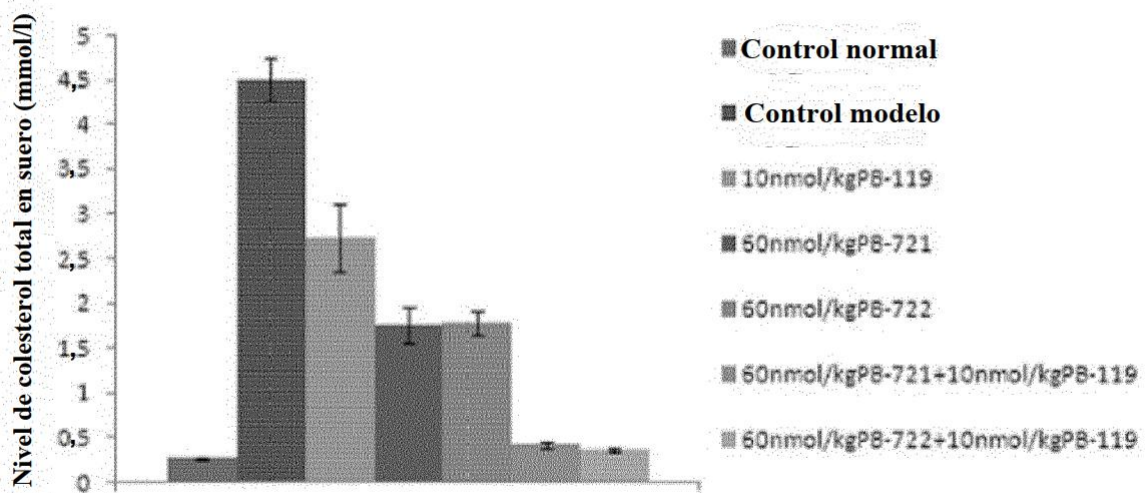


Figura 23

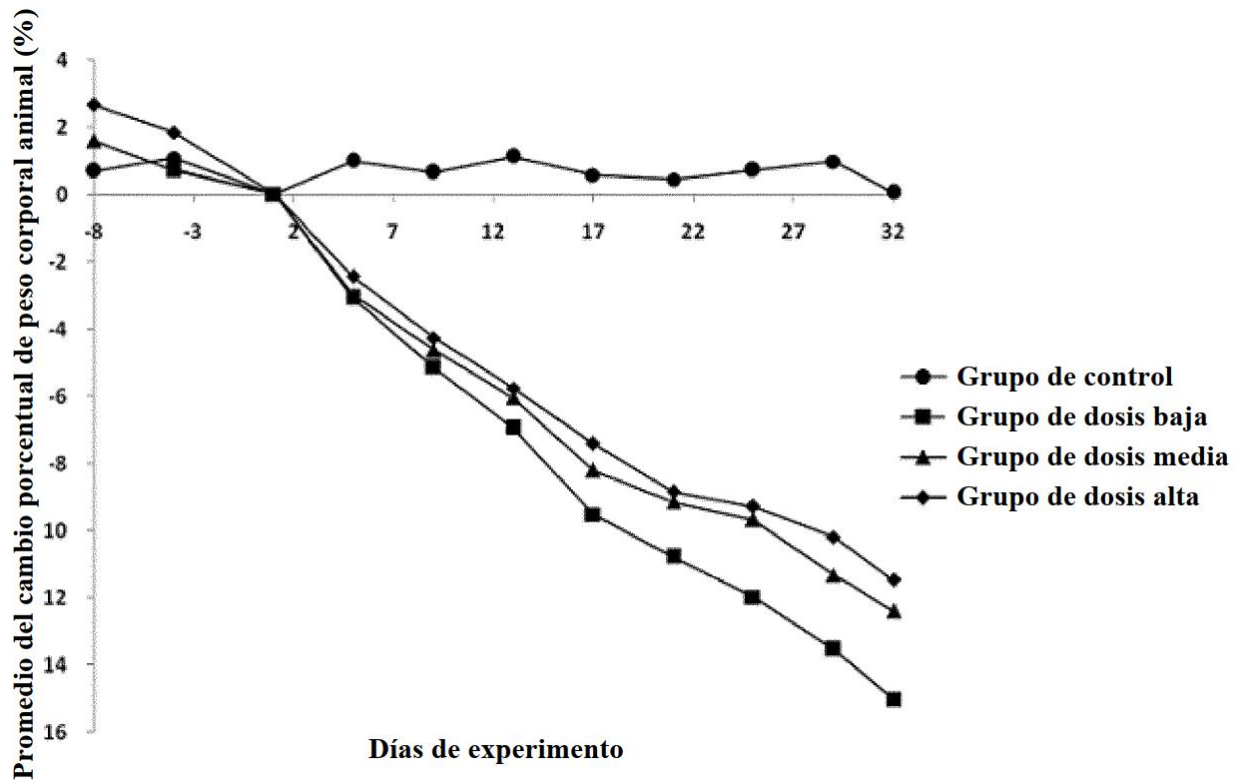


Figura 24

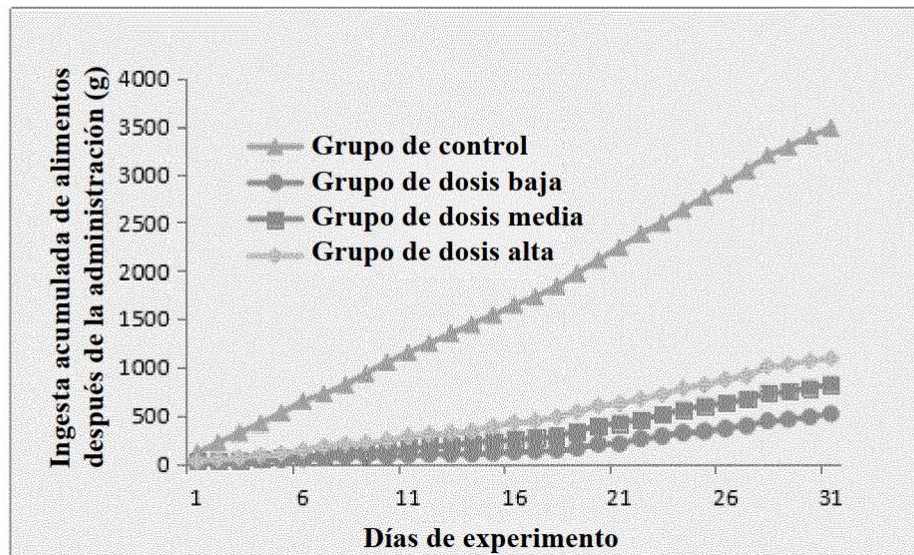


Figura 25

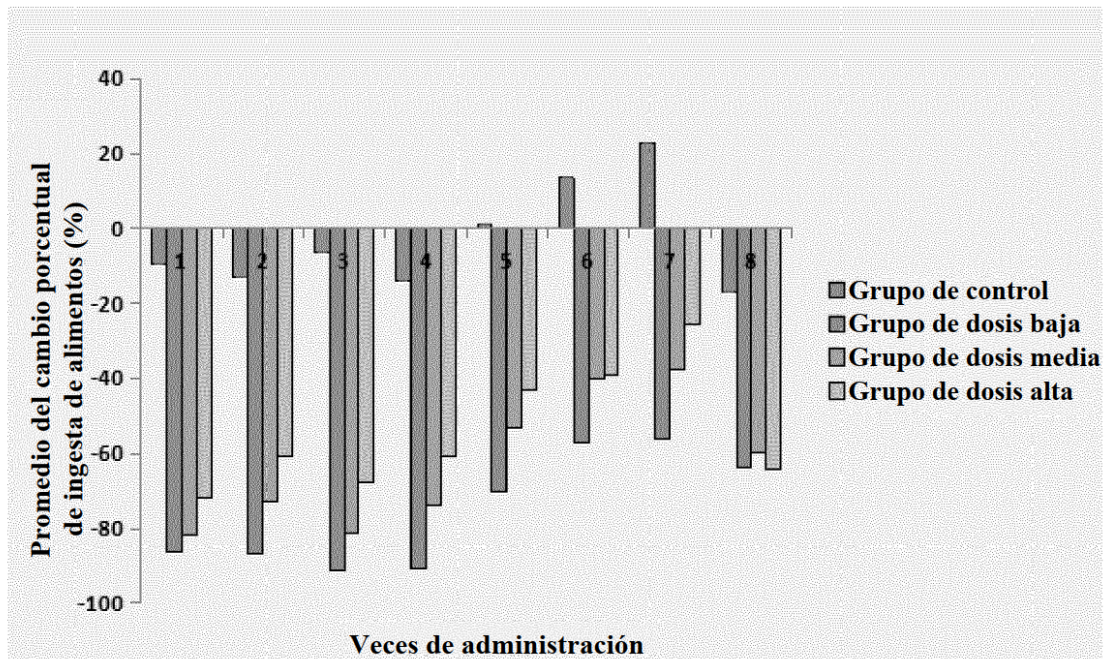


Figura 26

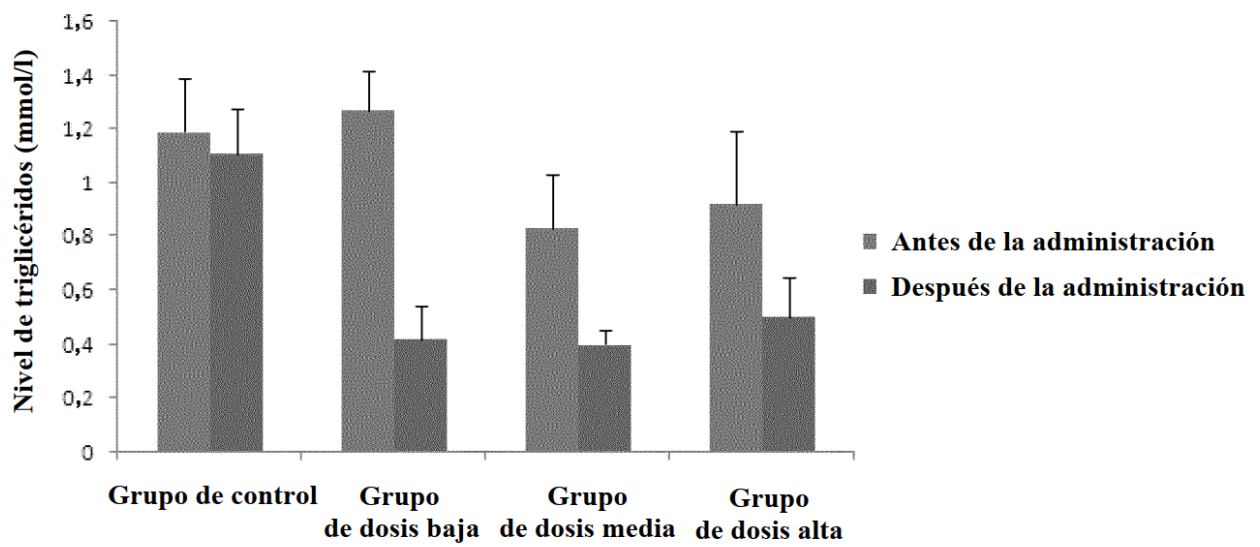


Figura 27

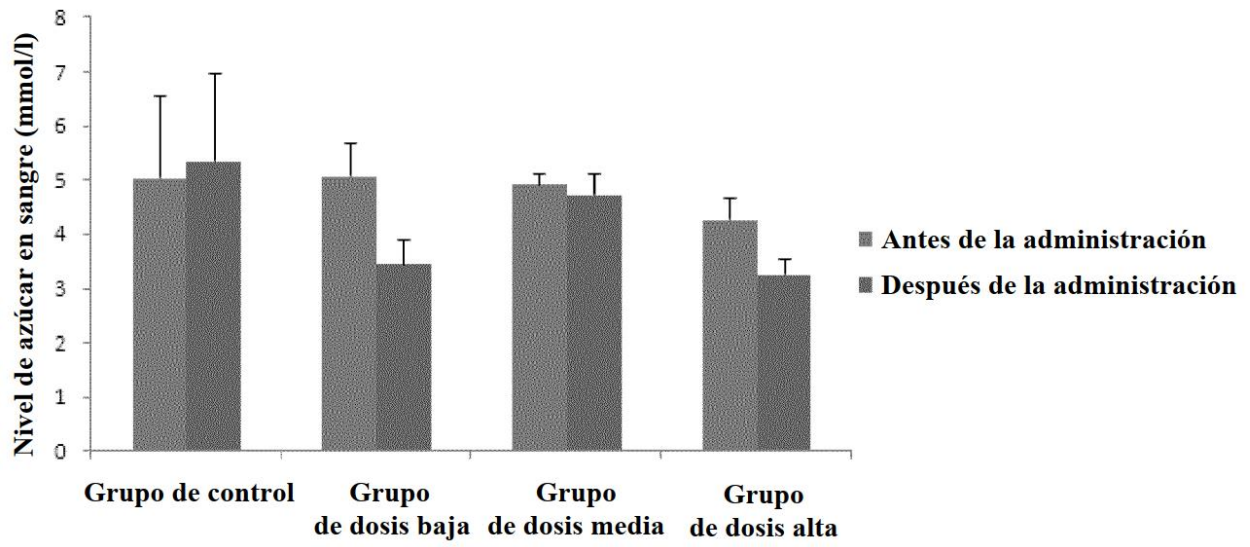


Figura 28

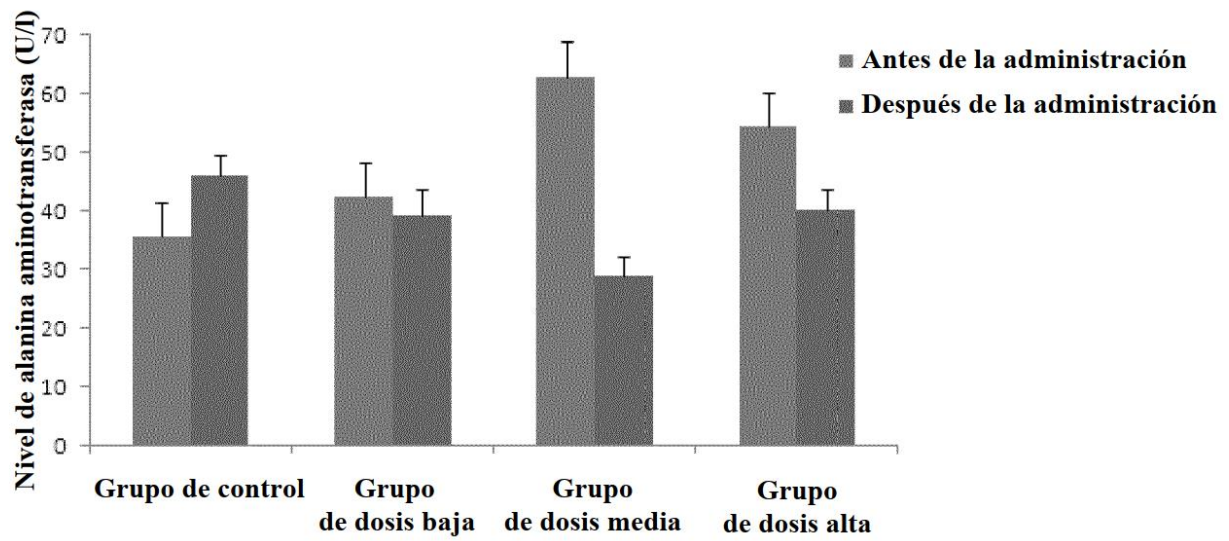


Figura 29

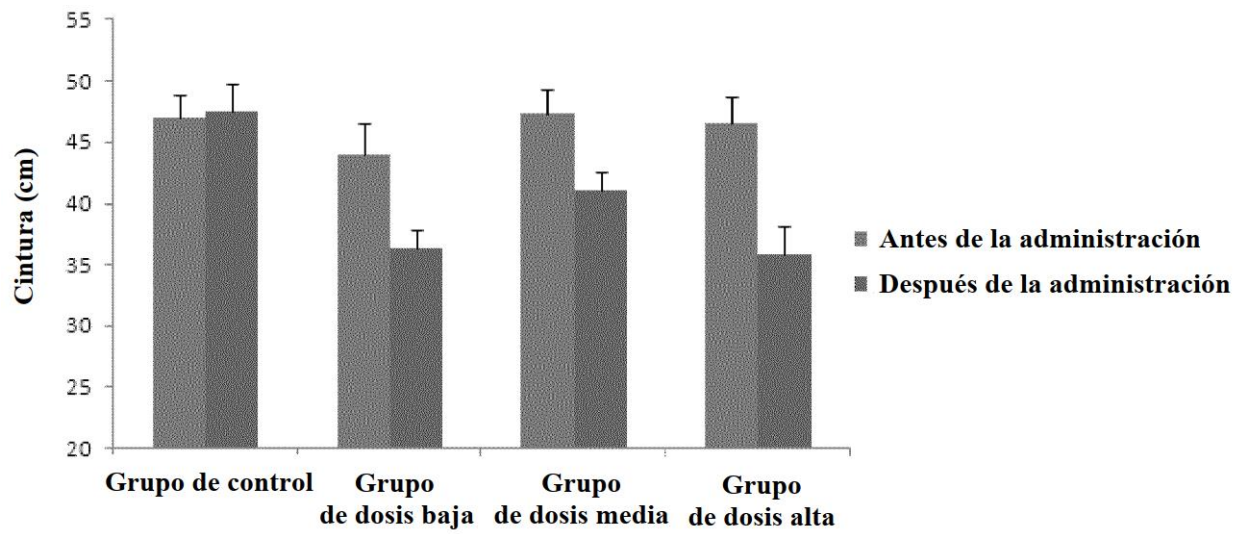


Figura 30

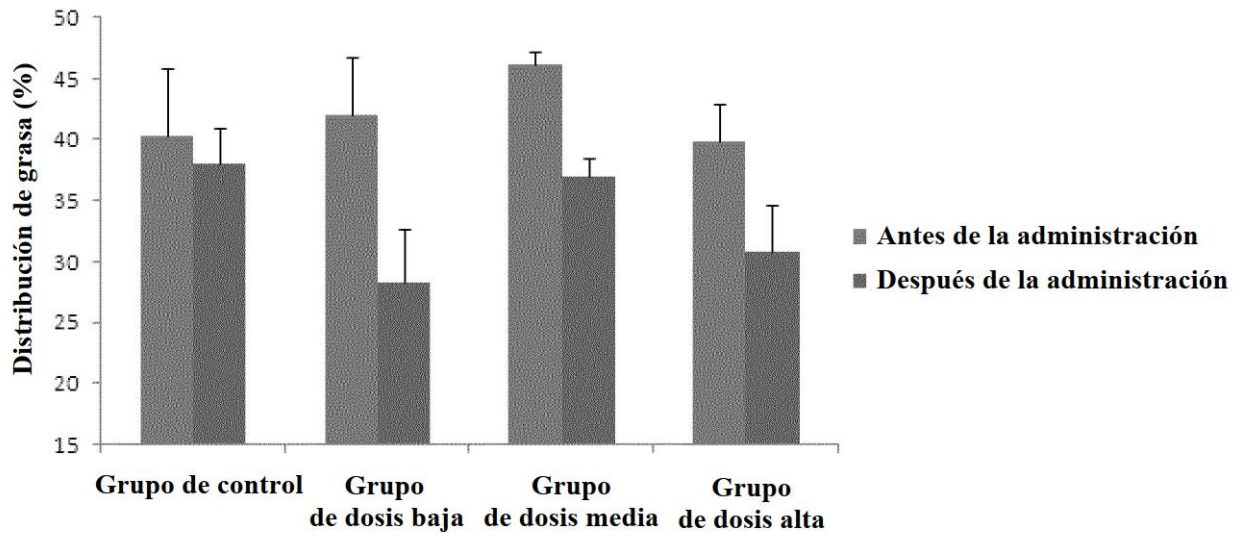


Figura 31

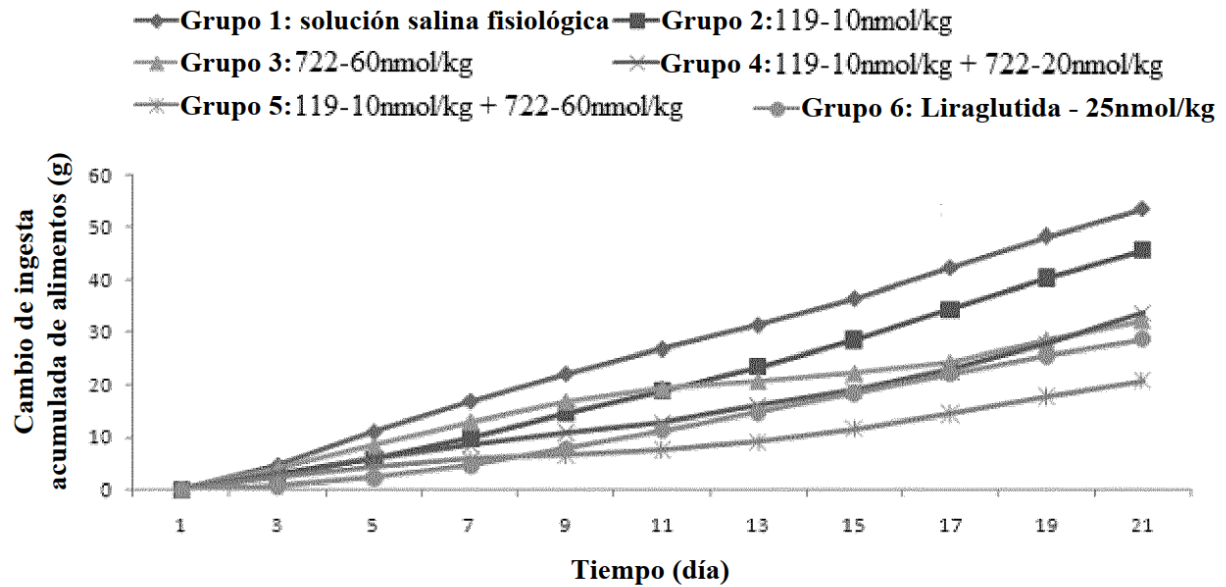


Figura 32

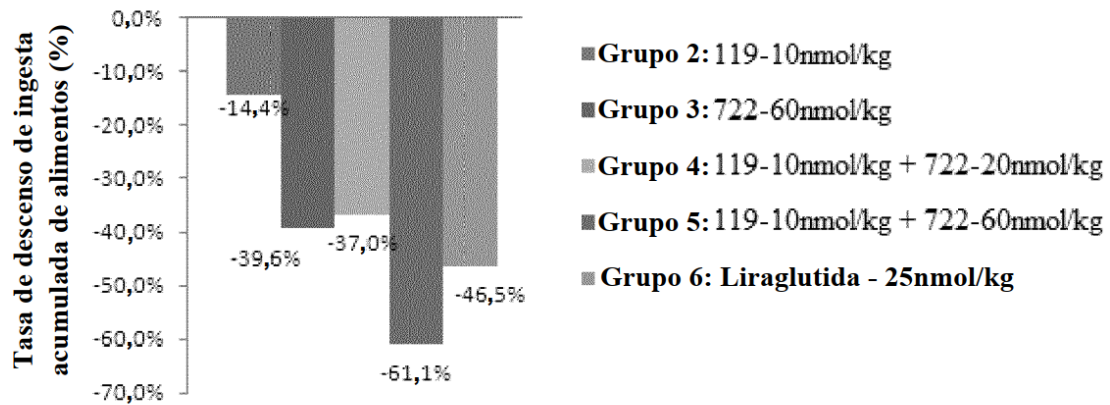


Figura 33

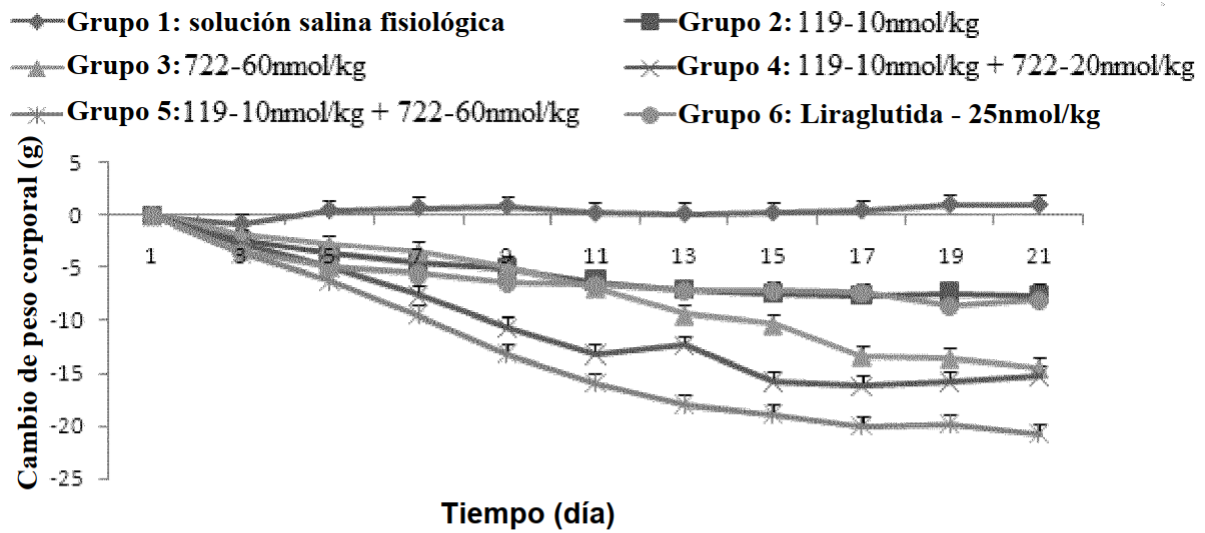


Figura 34

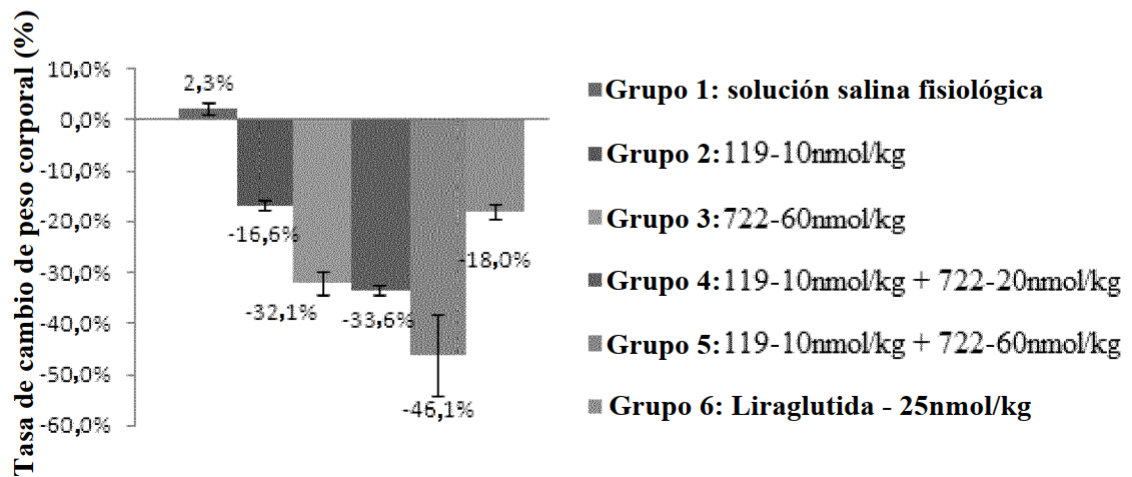


Figura 35

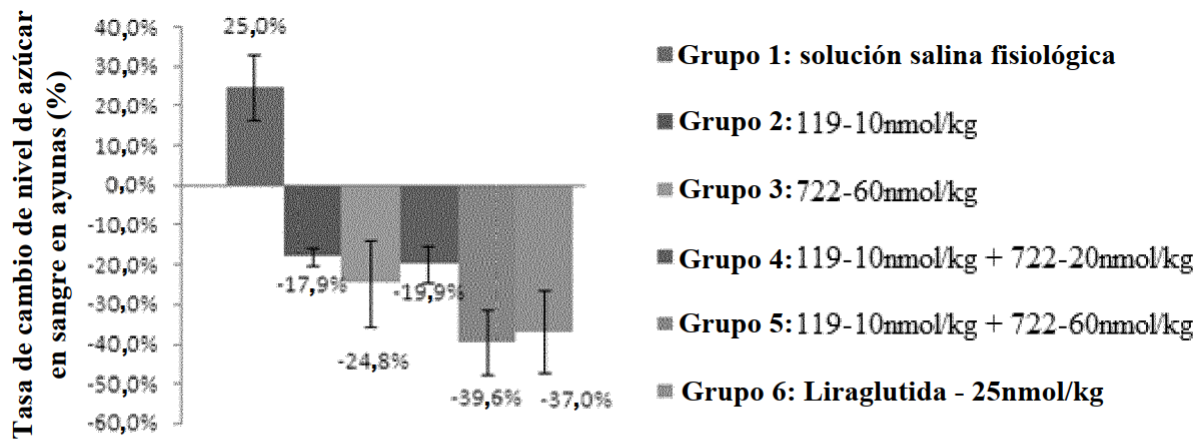


Figura 36

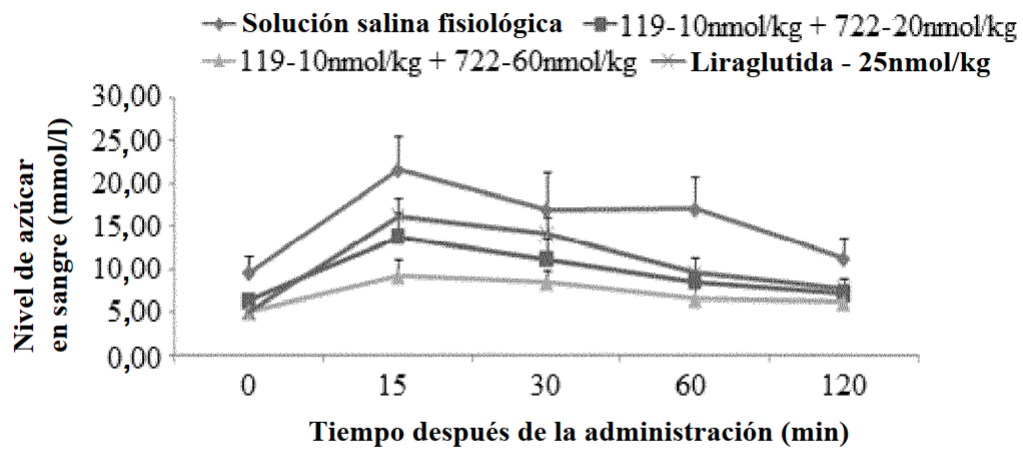


Figura 37

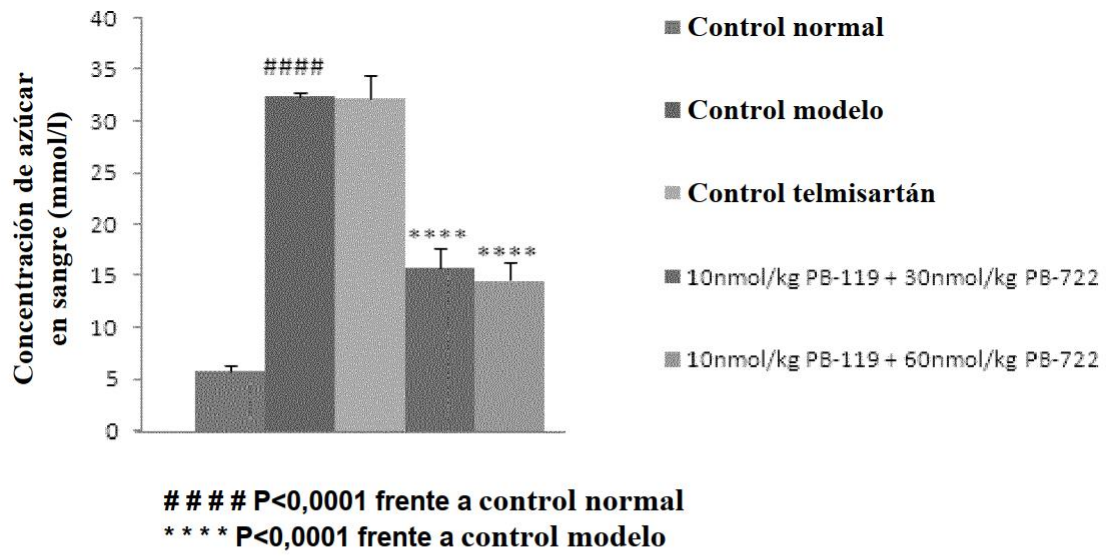


Figura 38

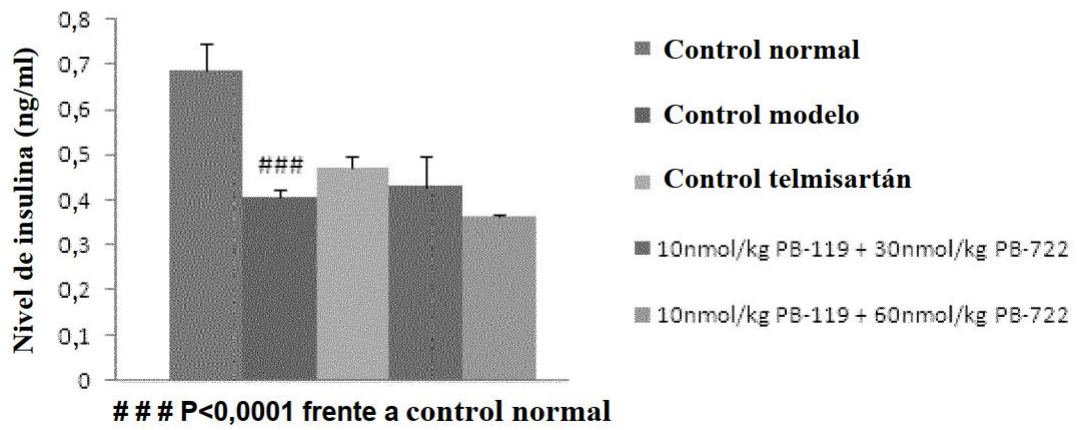
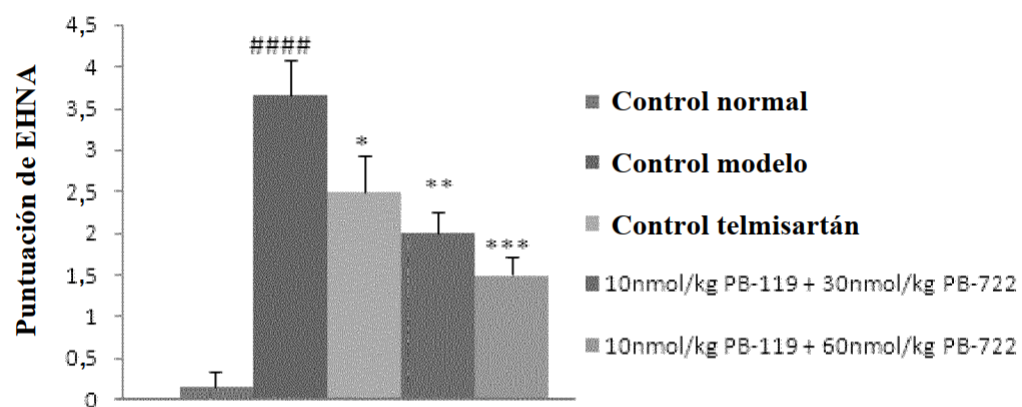


Figura 39



$P < 0,0001$ frente a control normal

* $p < 0,05$, * $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ frente a control modelo

Figura 40