

CONJUGADO DE ACCIÓN PROLONGADA DEL AGONISTA TRIPLE RECEPTOR DEL GLUCAGÓN /GLP-1/GIP

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a un conjugado de acción prolongada de un agonista triple que tiene actividades en todo el glucagón, GLP-1, y receptores de GIP, y uso de los mismos.

[Técnica anterior]

Obesidad y diabetes, incluida la diabetes tipo 2 son trastornos
10 metabólicos típicos que se producen en la sociedad moderna. Estos trastornos se consideran factores que amenazan la salud en el mundo y, debido a la incidencia de estos trastornos, los costos económicos aparejados aumentan rápidamente en la actualidad.

Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y polipéptido insulínico
15 dependiente de glucosa (GIP) son las principales hormonas gastrointestinales y hormonas neuronales y son materiales que participan en el control de los niveles de glucosa en sangre según la ingesta de alimentos. El glucagón es una hormona peptídica que se segrega el páncreas y participa en el control de los niveles de glucosa junto con los dos materiales descritos anteriormente.

20 El GLP-1 es una hormona segregada por el intestino delgado que se estimula por la ingesta de alimentos. El GLP-1 estimula la secreción de insulina en el páncreas de manera dependiente de la glucosa en sangre e inhibe la secreción de glucagón, de este modo ayuda a reducir los niveles de glucosa en sangre. Además, el GLP-1 tiene las funciones de aminorar la acción digestiva
25 en el tracto gastrointestinal al actuar como un factor de saciedad, y reducir la

cantidad de ingesta de alimentos al retrasar el tiempo para el vaciamiento de los alimentos ingeridos en el tracto gastrointestinal. Asimismo, se informó que la administración GLP-1 a ratas tiene efectos para inhibir la ingesta de alimentos y reducir el peso corporal, y se conformó que estos efectos ocurren
5 en igual medida tanto en estados normales y obesos, por lo tanto muestra el potencial de GLP-1 como un agente para tratar la obesidad.

El GIP, una de las hormonas gastrointestinales segregadas por la estimulación de la ingesta de alimentos como es el caso de GLP-1, es una hormona de que consiste en 40 aminoácidos segregados por las células K
10 intestinales. Se informó que el GIP tiene la función de estimular la secreción de insulina en el páncreas de manera dependiente de la glucosa en sangre y ayuda a reducir los niveles de glucosa en sangre, de este modo muestra los efectos del aumento de la activación de GLP-1, antiinflamatorio, *etc.*

El glucagón se produce en el páncreas cuando bajan los niveles de
15 glucosa en sangre por motivos tales como medicaciones, trastornos, deficiencia de hormonas o enzimas, *etc.* El glucagón envía una señal para la dispersión de glucógeno en el hígado para provocar la liberación de glucosa y aumentar a un nivel normal los niveles de glucosa en sangre. Además del efecto de aumentar los niveles de glucosa en sangre, el glucagón elimina el apetito en animales y
20 humanos y activa la lipasa sensible a hormonas de adipocitos para estimular la lipólisis y el gasto energético, de este modo muestra un efecto anti-obesidad.

En tal sentido, se están llevando a cabo estudios activos para desarrollar GLP-1 como un agente terapéutico para tratar la diabetes y la obesidad, basado en los efectos del GLP-1 que controla los niveles de glucosa
25 en sangre y reduce el peso corporal. Actualmente, la exendina-4, que se

prepara a partir del veneno del lagarto y tiene una homología del aminoácido de aproximadamente el 50 % con GLP-1, está bajo desarrollo como un agente terapéutico para tratar el mismo tipo de trastornos. No obstante, se informó que los agentes terapéuticos que contienen GLP-1 y exendina-4 muestran efectos secundarios tales como vómitos y náuseas (Syed YY., *Drugs*, 2015 Jul; 75 (10): 1141 - 52).

Además, para maximizar de la reducción del peso corporal y como una alternativa al material terapéutico basado en el GLP-1 descrito anteriormente, los estudios se han enfocado en agonistas duales que tienen actividades tanto en los receptores de GLP-1 como en los receptores del glucagón, y demostraron ser más eficaces en la reducción de peso corporal debido a la activación de los receptores del glucagón, comparado cuando el GLP-1 se trataba solo (Jonathan W *et al.*, *Nat Chem Bio.*, 2009 Oct (5); 749 - 757).

Además, en el estudio que se refiere a los agonistas triples, que simultáneamente tienen actividades en todos los receptores del GLP-1, GIP, y glucagón, recientemente se han realizado esfuerzos para aumentar la vida media de los agonistas triples sustituyendo una secuencia de aminoácido para aumentar la resistencia a la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), la cual descompone las hormonas gastrointestinales para deshacerse de sus actividades, seguida de la adición de un grupo acilo a una región particular de la misma (Finan B *et al.*, *Nat Med.*, 2015 Jan; 21 (1): 27 - 36). Sin embargo, sus efectos de activar tres tipos distintos de receptores no resultaron significativos y ningún agonista triple mostró varios radios activos a los mismos.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar un material novedoso que pueda activar altamente el GLP-1, GIP, y los receptores del

glucagón y tenga los efectos para controlar los niveles de glucosa en sangre y reducir el peso corporal sin causar efectos secundarios tales como vómitos y náuseas.

Además, se necesita que se desarrolle un material novedoso que tenga
5 varios radios activos al GLP-1; GIP, y receptores del glucagón. Por ejemplo, existe una necesidad en aumento para el desarrollo de un material que tenga el efecto de reducir el peso corporal, pero que tenga un efecto significativamente más alto para controlar los niveles de glucosa en sangre debido a las altas actividades del GLP-1 y GIP, pero con actividad de glucagón relativamente baja
10 para un efecto hipoglucémico; o un material que tenga actividades altas para todos los GLP-1, GIP y glucagón, por lo tanto que tenga un efecto significativamente alto en la reducción de peso corporal.

Además, el GLP-1, el GIP y el glucagón poseen una baja estabilidad *in vivo* y por lo tanto tienen la desventaja que se deben administrar diariamente o
15 dos veces al día cuando se aplican a los humanos para usos terapéuticos.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un conjugado de un péptido que tiene actividades en un receptor de glucagón, un péptido similar
20 al glucagón tipo 1 (GLP-1) y un receptor polipéptido insulínotropo dependiente de la glucosa (GIP).

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un polinucleótido que codifica el conjugado, un vector que incluye el polinucleótido y un transformante que incluye el polinucleótido o el vector.

25 Incluso un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar

una composición que contiene el conjugado.

Incluso otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para tratar un trastorno clave, el cual incluye administrar el conjugado o una composición que contiene el conjugado a un sujeto que lo
5 necesite.

Incluso otro objeto de la presente invención es proporcionar un uso del conjugado o una composición del mismo para el uso en la preparación de un medicamento.

[Solución técnica]

10 Para alcanzar los objetivos anteriores, en un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de un péptido que tiene actividades en un receptor de glucagón, un péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y un receptor polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP).

En una realización específica, el conjugado está representado por la
15 Fórmula Química 1 a continuación:

[Fórmula Química 1]

X - La - F

en la que,

X es un péptido que tiene actividades en un receptor de glucagón, un
20 péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y un receptor polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP);

L es un conector;

a es 0 o un número entero positivo, con la condición que cuando a es 2 o mayor, cada L es independiente una de otra; y

25 F es un material que puede aumentar la vida media de X.

En otra realización específica, X es un análogo del glucagón nativo con una variación seleccionada del grupo que consiste en sustitución, adición, eliminación, modificación y una combinación de los mismos, en al menos un aminoácido de la secuencia del glucagón nativo.

- 5 Incluso en otra realización específica, la secuencia del aminoácido con adición deriva de una secuencia del aminoácido GLP-1 nativo, una secuencia del aminoácido GIP nativo o una secuencia del aminoácido exendina-4 nativo.

Incluso en otra realización específica, la X es un péptido que incluye una secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General 1 a
10 continuación:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (Fórmula General 1, SEQ ID NO: 103)

en la que, en la Fórmula General 1,

- 15 Xaa1 es histidina (His, H), 4-imidazoacetilo (CA), o tirosina (Tyr, Y);

Xaa2 es glicina (Gly, G), ácido α -metil-glutámico, o Aib (ácido aminoisobutírico);

Xaa3 es ácido glutámico (Glu, E) o glutamina (Gln, Q);

Xaa7 es treonina (Thr, T) o isoleucina (Ile, I);

- 20 Xaa10 es leucina (Leu, L), tirosina (Tyr, Y), lisina (Lys, K), cisteína (Cys, C) o valina (Val, V);

Xaa12 es lisina (Lys, K), serina (Ser, S) o isoleucina (Ile, I);

Xaa13 es glutamina (Gln, Q), tirosina (Tyr, Y), alanina (Ala, A) o cisteína (Cys, C);

- 25 Xaa14 es leucina (Leu, L), metionina (Met, M), o tirosina (Tyr, Y);

Xaa15 es cisteína (Cys, C), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E) o leucina (Leu, L);

Xaa16 es glicina (Gly, G), ácido glutámico (Glu, E) o serina (Ser, S);

Xaa17 es glutamina (Gln, Q), arginina (Arg, R), isoleucina (Ile, I), ácido
5 glutámico (Glu, E), cisteína (Cys, C), o lisina (Lys, K);

Xaa18 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), arginina (Arg, R), o histidina (His, H);

Xaa19 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), cisteína (Cys, C), o valina (Val, V);

10 Xaa20 es lisina (Lys, K), glutamina (Gln, Q), o arginina (Arg, R);

Xaa21 es ácido glutámico (Glu, E), glutamina (Gln, Q), leucina (Leu, L), cisteína (Cys, C), o ácido aspártico (Asp, D);

Xaa23 es isoleucina (Ile, I) o valina (Val, V);

Xaa24 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), cisteína (Cys, C),
15 asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), o ácido glutámico (Glu, E);

Xaa27 es valina (Val, V), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), o metionina (Met, M);

Xaa28 es cisteína (Cys, C), lisina (Lys, K), alanina (Ala, A), asparagina (Asn, N), o ácido aspártico (Asp, D);

20 Xaa29 es cisteína (Cys, C), glicina (Gly, G), glutamina (Gln, Q), treonina (Thr, T), ácido glutámico (Glu, E), o histidina (His, H);

Xaa30 es cisteína (Cys, C), glicina (Gly, G), lisina (Lys, K), o histidina (His, H), o está ausente; y

R1 es cisteína (Cys, C), GKKNDWKHNIT (SEQ ID NO: 106), m-
25 SSGAPPPS-n (SEQ ID NO: 107), o m-SSGQPPPS-n (SEQ ID NO: 108), o está

ausente;

en la que,

m es -Cys-, -Pro-, o-Gly-Pro-,

n es -Cys-, -Gly-, -Ser-, o-His-Gly-, o está ausente.

5 Incluso en otra realización específica,

en la Fórmula General 1,

Xaa14 es leucina o metionina; y

Xaa15 es cisteína, ácido aspártico, o leucina.

Incluso en otra realización específica, en la Fórmula General 1,

10 Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;

Xaa7 es treonina;

Xaa10 es tirosina, cisteína, o valina;

Xaa12 es lisina o isoleucina;

Xaa13 es tirosina, alanina, glutamina, o cisteína;

15 Xaa14 es leucina, cisteína, o metionina;

Xaa15 es cisteína, leucina, ácido glutámico, o ácido aspártico;

Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, cisteína, ácido glutámico, o
lisina;

Xaa18 es alanina, glutamina, arginina, o histidina;

20 Xaa19 es alanina, glutamina, valina, o cisteína;

Xaa20 es lisina, arginina, o glutamina;

Xaa21 es ácido glutámico, glutamina, leucina, cisteína, o ácido
aspártico;

Xaa23 es isoleucina valina;

25 Xaa24 es cisteína, alanina, glutamina, asparagina, ácido glutámico, o

ácido aspártico; y

Xaa27 es leucina o lisina.

Incluso en otra realización específica, en la Fórmula General 1,

Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;

5 Xaa7 es treonina;

Xaa10 es tirosina, cisteína, o valina;

Xaa12 es lisina o isoleucina;

Xaa13 es tirosina, alanina, o cisteína;

Xaa14 es leucina o metionina;

10 Xaa15 es cisteína o ácido aspártico;

Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, cisteína, o lisina;

Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;

Xaa19 es alanina, glutamina, o cisteína;

Xaa20 es lisina o glutamina;

15 Xaa21 es ácido glutámico, cisteína, o ácido aspártico;

Xaa23 es valina;

Xaa24 es alanina, glutamina, cisteína, asparagina, o ácido aspártico; y

Xaa27 es leucina o lisina.

Incluso en otra realización específica, en la Fórmula General 1,

20 Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;

Xaa7 es treonina;

Xaa10 es tirosina o cisteína;

Xaa12 es lisina o isoleucina;

Xaa13 es tirosina, alanina, o cisteína;

25 Xaa14 es leucina o metionina;

- Xaa15 es cisteína o ácido aspártico;
- Xaa16 es ácido glutámico;
- Xaa17 es arginina, isoleucina, cisteína, o lisina;
- Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;
- 5 Xaa19 es alanina, glutamina, o cisteína;
- Xaa20 es lisina o glutamina;
- Xaa21 es ácido glutámico o ácido aspártico;
- Xaa23 es valina;
- Xaa24 es glutamina, asparagina, o ácido aspártico;
- 10 Xaa27 es leucina; y
- Xaa28 es cisteína, alanina, asparagina, o ácido aspártico.
- Incluso en otra realización específica, en la Fórmula General 1,
- Xaa1 es histidina o 4-imidazoacetilo;
- Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;
- 15 Xaa3 es glutamina;
- Xaa7 es treonina;
- Xaa10 es tirosina;
- Xaa12 es isoleucina;
- Xaa13 es alanina o cisteína;
- 20 Xaa14 es metionina;
- Xaa15 es ácido aspártico;
- Xaa16 es ácido glutámico;
- Xaa17 es isoleucina o lisina;
- Xaa18 es alanina o histidina;
- 25 Xaa19 es glutamina o cisteína;

- Xaa20 es lisina;
- Xaa21 es ácido aspártico;
- Xaa23 es valina;
- Xaa24 es asparagina;
- 5 Xaa27 es leucina;
- Xaa28 es alanina o asparagina;
- Xaa29 es glutamina o treonina; y
- Xaa30 es cisteína, o lisina, o está ausente.
- Incluso en otra realización específica,
- 10 en la Fórmula General 1,
- Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;
- Xaa3 es glutamina;
- Xaa7 es treonina;
- Xaa10 es tirosina, cisteína, o valina;
- 15 Xaa12 es lisina;
- Xaa13 es tirosina;
- Xaa14 es leucina;
- Xaa15 es ácido aspártico;
- Xaa16 es glicina, ácido glutámico, o serina;
- 20 Xaa17 es glutamina, arginina, cisteína, o lisina;
- Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;
- Xaa19 es alanina o glutamina;
- Xaa20 es lisina o glutamina;
- Xaa21 es ácido glutámico, cisteína, o ácido aspártico;
- 25 Xaa23 es valina;

Xaa24 es alanina, glutamina, o cisteína;

Xaa27 es leucina o lisina; y

Xaa29 es glicina, glutamina, treonina, o histidina.

Incluso en otra realización específica, X es un péptido que incluye una
5 secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General 2 a
continuación:

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-
Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-
Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31- Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-
10 Xaa40 (General Formula 2, SEQ ID NO: 104)

En la Fórmula General 2,

Xaa1 es 4-imidazoacetilo, histidina, o tirosina;

Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;

Xaa10 es tirosina o cisteína;

15 Xaa13 es alanina, glutamina, tirosina, o cisteína;

Xaa14 es leucina, metionina, o tirosina;

Xaa15 es ácido aspártico, ácido glutámico, o leucina;

Xaa16 es glicina, ácido glutámico, o serina;

20 Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, ácido glutámico, cisteína, o
lisina;

Xaa18 es alanina, glutamina, arginina, o histidina;

Xaa19 es alanina, glutamina, cisteína, o valina;

Xaa20 es lisina, glutamina, o arginina;

25 Xaa21 es cisteína, ácido glutámico, glutamina, leucina, o ácido
aspártico;

Xaa23 es isoleucina valina;

Xaa24 es cisteína, alanina, glutamina, asparagina, o ácido glutámico;

Xaa28 es lisina, cisteína, asparagina, o ácido aspártico;

Xaa29 es glicina, glutamina, cisteína, o histidina;

5 Xaa30 es cisteína, glicina, lisina, o histidina;

Xaa31 es prolina o cisteína; y

Xaa40 es cisteína o está ausente.

Incluso en otra realización específica, en la Fórmula General 2,

Xaa13 es alanina, tirosina, o cisteína;

10 Xaa15 es ácido aspártico o ácido glutámico;

Xaa17 es glutamina, arginina, cisteína, o lisina;

Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;

Xaa21 es cisteína, ácido glutámico, glutamina, o ácido aspártico;

Xaa23 es isoleucina valina;

15 Xaa24 es cisteína, glutamina, o asparagina;

Xaa28 es cisteína, asparagina, o ácido aspártico;

Xaa29 es glutamina, cisteína, o histidina; y

Xaa30 es cisteína, lisina, o histidina.

Incluso en otra realización específica, X es un péptido que incluye una
20 secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General 3 a
continuación:

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-
Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-
Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (Fórmula
25 General 3, SEQ ID NO: 105).

En la Fórmula General 3,

Xaa1 es histidina o tirosina;

Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;

Xaa13 es alanina, tirosina, o cisteína;

5 Xaa17 es arginina, cisteína, o lisina;

Xaa18 es alanina o arginina;

Xaa19 es alanina o cisteína;

Xaa21 es ácido glutámico o ácido aspártico;

Xaa24 es glutamina o asparagina;

10 Xaa28 es cisteína o ácido aspártico;

Xaa29 es cisteína, histidina, o glutamina;

Xaa30 es cisteína o histidina;

Xaa31 es prolina o cisteína; y

Xaa40 es cisteína o está ausente.

15 Incluso en otra realización específica, R1 es cisteína, GKKNDWKHNIT (SEQ ID NO: 106), CSSGQPPPS (SEQ ID NO: 109), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 110), GPSSGAPPPSC (SEQ ID NO: 111), PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 112), PSSGAPPPSG (SEQ ID NO: 113), PSSGAPPPSHG (SEQ ID NO: 114), PSSGAPPPSS (SEQ ID NO: 115), PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 116), o
20 PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 117), o está ausente.

Incluso en otra realización específica, en las Fórmulas Generales 1 a 3, el aminoácido 16 y el aminoácido 20 del extremo N-terminal juntos forman un anillo.

Incluso en otra realización específica, X es un péptido que incluye una
25 secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ

ID NOS: 1 a 102.

Incluso en otra realización específica, F se selecciona del grupo que consiste en un polímero, ácido graso, colesterol, albúmina y un fragmento de los mismos, un material de unión de albúmina, un polímero de unidades de repetición de secuencias de aminoácido particulares, un anticuerpo, un fragmento del anticuerpo, un material de unión del FcRn, un tejido conectivo *in vivo*, un nucleótido, fibronectina, transferrina, un sacárido, heparina, y elastina.

Incluso en otra realización específica, F es un polímero seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, propilenglicol, un copolímero de propilenglicol - etilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol de polivinilo, polisacárido, dextrano, polivinil éter etílico, un polímero biodegradable, un polímero lípido, quitinas, ácido hialurónico, un oligonucleótido y una combinación de los mismos.

Incluso en otra realización específica, F es una región Fc de inmunoglobulina.

Incluso en otra realización específica, F es una región IgG Fc.

Incluso en otra realización específica, L se selecciona del grupo que consiste en un péptido, ácido graso, un sacárido, un polímero, un compuesto de peso molecular bajo, un nucleótido, y una combinación del mismo.

Incluso en otra realización específica, L es un polímero seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, propilenglicol, un copolímero de propilenglicol - etilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol de polivinilo, polisacárido, dextrano, polivinil éter etílico, un polímero biodegradable, un polímero lípido, quitinas, ácido hialurónico, un oligonucleótido y una combinación de los mismos.

Incluso en otra realización específica, L es polietilenglicol.

Incluso otro aspecto de la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica el conjugado, un vector que incluye el polinucleótido y un transformante que incluye el polinucleótido o el vector.

- 5 Incluso otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición que contiene el conjugado.

En una realización específica, la composición es una composición farmacéutica.

- 10 En otra realización específica, la composición es para prevenir o tratar el síndrome metabólico.

Incluso en otra realización específica, el síndrome metabólico puede incluir intolerancia a la glucosa, hipercolesterolemia, dislipidemia, obesidad, diabetes, hipertensión, arteriosclerosis debido a la dislipidemia, aterosclerosis, arteriosclerosis, o cardiopatías coronarias.

- 15 Incluso otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un trastorno clave, que incluye la administración del conjugado o una composición que contiene el conjugado a un sujeto que lo necesite.

En una realización específica, el trastorno es síndrome metabólico.

- 20 Incluso otro aspecto de la presente invención proporciona un uso del conjugado o una composición que contiene el conjugado en la preparación de un medicamento.

En una realización específica, el medicamento es para evitar o tratar el síndrome metabólico.

- 25 **[Efectos ventajosos de la invención]**

El conjugado del agonista triple según la presente invención tiene actividades en un receptor de glucagón, un receptor de glucagón, un receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), y un receptor polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP), y por lo tanto se puede aplicar para el tratamiento del síndrome metabólico.

[Breve descripción de los dibujos]

La Fig. 1 muestra un histograma que ilustra el resultado de medición del cambio de peso corporal en un modelo de animal obeso (ratones) en un intervalo de dos días, durante la administración de un conjugado de acción prolongada de un agonista triple mediante una dieta rica en grasas para los ratones una vez cada dos días durante 28 días ($p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, vs. vehículo por análisis de varianza con un factor (ANOVA)).

La Fig. 2 muestra un histograma que ilustra el resultado de medición de la cantidad de grasa mesentérica en un modelo de animal obeso (ratones) en un intervalo de dos días, durante la administración de un conjugado de acción prolongada de un agonista triple mediante una dieta rica en grasas para los ratones una vez cada dos días durante 28 días ($p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, vs. análisis de varianza con un factor (ANOVA)).

[DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION]

A continuación en el presente documento, se describirá la presente invención en más detalle.

Asimismo, cada una de las explicaciones y realizaciones ejemplares divulgadas en el presente documento se pueden aplicar a otras explicaciones y realizaciones ejemplares. Es decir, todas las combinaciones de diversos factores divulgados en el presente pertenecen al alcance de la presente

invención. Además, el alcance de la presente invención no debería estar limitado a la divulgación específica proporcionada a continuación.

A lo largo de toda la especificación de la presente invención no solo se usan los códigos convencionales de una letra y tres letras para los aminoácidos que ocurren normalmente, sino también aquellos códigos de tres letras que generalmente se permiten para otros aminoácidos, tales como o ácido α -aminoisobutírico (Aib), Sar (N-metilglicina), y ácido α -metil-glutámico.

Además, los aminoácidos que se mencionan en el presente documento se abrevian según las reglas de la nomenclatura de IUPAC-IUB de la siguiente manera:

alanina (Ala, A)	arginina (Arg, R)
asparagina (Asn, N)	ácido aspártico (Asp, D)
cisteína (Cys, C)	ácido glutámico (Glu, E)
glutamina (Gln, Q)	glicina (Gly, G)
histidina (His, H)	isoleucina (Ile, I)
leucina (Leu, L)	lisina (Lys, K)
metionina (Met, M)	fenilalanina (Phe, F)
prolina (Pro, P)	serina (Ser, S)
treonina (Thr, T)	triptófano (Trp, W)
tirosina (Tyr, Y)	valina (Val, V)

Un aspecto de la presente invención proporciona un conjugado de un péptido que tiene actividades en un receptor de glucagón, un péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y un receptor polipéptido insulínotropo dependiente de la glucosa (GIP).

En la presente invención, el conjugado de un péptido, el cual tiene actividades en un receptor de glucagón, un receptor de GLP-1, y un receptor GIP, puede estar en una forma en la cual el material biocompatible se conjuga al péptido para aumentar la vida media *in vivo* del péptido. En la presente
 5 invención, el material biocompatible se puede usar indistintamente con un transportador.

En la presente invención, el conjugado del péptido puede mostrar una duración en aumento de la eficacia comparada con el péptido, en el cual el transportador no está conjugado, y en el presente documento el conjugado se
 10 denomina "conjugado de acción prolongada".

Asimismo, puede ser que dicho conjugado no ocurra naturalmente.

En una realización específica de la presente invención, el conjugado es un conjugado representado por la Fórmula Química 1 a continuación:

[Fórmula Química 1]

15 X - La - F

en la que,

X es un péptido que tiene actividades en un receptor de glucagón, un péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y un receptor polipéptido insulino-trópico dependiente de la glucosa (GIP);

20 L es un conector;

a es 0 o un número entero positivo, con la condición que cuando a es 2 o mayor, cada L es independiente una de otra; y

F es un material que puede aumentar la vida media de X.

En la presente invención el "péptido que tiene actividades en un
 25 receptor de glucagón, un receptor (GLP-1) y un receptor (GIP)" puede

corresponder a una constitución de una fracción que constituye el conjugado anterior. Específicamente, el péptido corresponde a X en la Fórmula Química 1 anterior.

En la presente invención, el péptido que tiene actividades en un receptor de glucagón, un receptor GLP-1 y un receptor (GIP) se puede usar indistintamente con un agonista triple.

El péptido puede incluir diversos materiales (por ejemplo, varios péptidos) que tienen un nivel significativo de actividades en los receptores de glucagón, de GLP-1 y GIP.

El agonista triple que tiene niveles significantes de actividades en los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP pueden mostrar actividades *in vitro* de 0,1 % o superior, 1 % o superior, 2 % o superior, 3 % o superior, 4 % o superior, 5 % o superior, 6 % o superior, 7 % o superior, 8 % o superior, 9 % o superior, 10 % o superior, 20 % o superior, 30 % o superior, 40 % o superior, 50 % o superior, 60 % o superior, 70 % o superior, 80 % o superior, 90 % o superior, y 100 % o superior, a uno o más receptores, específicamente dos o más receptores, y más específicamente los tres de los receptores entre el glucagón, receptores de GLP-1 y GIP, comparado con los ligandos nativos de los receptores correspondientes (glucagón nativo, GLP-1 nativo y GIP nativo), pero no se limita particularmente a ello.

El procedimiento para medir las actividades *in vitro* del agonista triple se puede referir al ejemplo experimental 1 de la presente invención, pero no se limita particularmente a ello.

Asimismo, el agonista triple se caracteriza por tener uno o más, dos o más, y específicamente las tres de las siguientes actividades de i) a iii),

específicamente una actividad o actividades significantes de las mismas:

i) activación de un receptor del GLP-1; ii) activación de un receptor del glucagón; y iii) activación de un receptor del GIP.

En particular, la activación de los receptores puede incluir, por ejemplo,
5 aquellos casos en los cuales las actividades *in vitro* del péptido son 0,1 % o superior, 1 % o superior, 2 % o superior, 3 % o superior, 4 % o superior, 5 % o superior, 6 % o superior, 7 % o superior, 8 % o superior, 9 % o superior, 10 % o superior, 20 % o superior, 30 % o superior, 40 % o superior, 50 % o superior, 60 % o superior, 70 % o superior, 80 % o superior, 90 % o superior, y 100 % o superior,
10 superior, comparado con los ligandos nativos de los receptores correspondientes, pero no se limita particularmente a ello.

Además, el agonista triple puede ser uno que tenga una vida media *in vitro* incrementada relativa a algún GLP-1 nativo, glucagón nativo, y GIP nativo, pero no se limita particularmente a ello.

15 El análogo del glucagón anterior puede ser uno que no ocurre naturalmente, pero no se limita particularmente a ello.

Específicamente, el péptido aislado puede ser un análogo del glucagón nativo, pero no se limita particularmente a ello.

El análogo del glucagón nativo según la presente invención puede
20 incluir péptidos que tienen al menos una diferencia en la secuencia del aminoácido comparado con la del glucagón nativo; péptidos que se modificaron mediante modificación de la secuencia del glucagón nativo; y miméticos del glucagón nativo.

Sin embargo, el glucagón nativo puede tener la siguiente secuencia de
25 aminoácido, pero no se limita particularmente a ello:

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: 118)

Específicamente, el péptido aislado puede ser un análogo del glucagón nativo con una variación seleccionada del grupo que consiste en sustitución, 5 adición, eliminación, modificación y una combinación de los mismos, en al menos un aminoácido de la secuencia del glucagón nativo, pero no se limita particularmente a ello.

Además, la sustitución del aminoácido puede abarcar tanto una sustitución a un aminoácido como una sustitución a un compuesto no nativo.

10 Además, la adición se puede llevar a cabo en el extremo N-terminal y/o extremo C-terminal de un péptido. Sin embargo, la longitud del aminoácido para adición no está particularmente limitada, pero se pueden añadir 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, y 11 o más aminoácidos, y en un sentido amplio, la adición puede incluir 15 la adición de un polipéptido, pero no se limita particularmente a ello.

Más específicamente, el análogo del glucagón pueden ser aquellos donde 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 aminoácidos seleccionados del 20 grupo compuesto de aminoácidos en posiciones 1, 2, 3, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28, y 29 en la secuencia de aminoácidos del glucagón nativo se sustituyen con otros aminoácidos, y además, pueden ser aquellos donde 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, o 11 o más aminoácidos se añaden de 25 manera independiente o adicional al extremo C-terminal del mismo, pero no se

limita particularmente a ello.

Incluso más específicamente, el análogo del glucagón pueden ser aquellos donde 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, o 19 aminoácidos seleccionados del grupo compuesto de aminoácidos en posiciones 1, 2, 3, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28, y 29 en la secuencia de aminoácidos del glucagón nativo se sustituyen con otros aminoácidos, y además, pueden ser aquellos donde 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, o 11 o más aminoácidos se añaden de manera independiente o adicional al extremo C-terminal del mismo, pero no se limita particularmente a ello.

Incluso más específicamente, el análogo del glucagón pueden ser aquellos donde 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, o 17 aminoácidos seleccionados del grupo compuesto de aminoácidos en posiciones 1, 2, 3, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 28, y 29 en la secuencia de aminoácidos del glucagón nativo se sustituyen con otros aminoácidos, y además, pueden ser aquellos donde 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, o 11 o más aminoácidos se añaden de manera independiente o adicional al extremo C-terminal del mismo, pero no se limita particularmente a ello.

Incluso más específicamente, el análogo del glucagón pueden ser aquellos donde 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, o 14

aminoácidos seleccionados del grupo compuesto de aminoácidos en posiciones 1, 2, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28, y 29 en la secuencia de aminoácidos del glucagón nativo se sustituyen con otros aminoácidos, y además, pueden ser aquellos donde 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, o 11 o más aminoácidos se añaden de manera independiente o adicional al extremo C-terminal del mismo, pero no se limita particularmente a ello.

Los aminoácidos que se introducirán en el glucagón nativo anterior se pueden seleccionar del grupo que consiste en tirosina, ácido α -metil-glutámico, Aib, metionina, ácido glutámico, histidina, lisina, leucina, isoleucina, glutamina, valina, glicina, alanina, cisteína, serina, alanina, ácido aspártico, y arginina, pero no se limitan particularmente a los mismos.

Por ejemplo, la(s) secuencia(s) de aminoácido que será(n) añadida(s) puede(n) ser de al menos una secuencia de aminoácido derivada de un GLP-1 nativo, GIP nativo o exendina-4 nativa de la secuencia del aminoácido.

El análogo de glucagón o el agonista triple pueden incluir un puente intramolecular (por ejemplo, una reticulación covalente o una reticulación no covalente), y específicamente, está en una forma que incluye un anillo, por ejemplo, está en una forma donde se forma un anillo entre el aminoácido 16 y el aminoácido 20 del análogo del glucagón o el agonista triple, pero no se limita particularmente a ello.

El ejemplo no limitante del anillo puede incluir un puente lactama (o un anillo lactama).

Además, el análogo del glucagón o el agonista triple incluye todos aquellos que están modificados para incluir un anillo, o incluir un aminoácido

capaz de formar un anillo en una posición deseada.

Por ejemplo, el análogo del glucagón o el agonista triple pueden ser uno en el cual el par de aminoácido de los aminoácidos 16 y 20 se sustituye con ácido glutámico o lisina, lo cual puede formar un anillo, respectivamente, pero el análogo del glucagón o el agonista triple no se limitan a ello.

El anillo se puede formar entre cadenas laterales de aminoácidos dentro del análogo del glucagón o el agonista triple; por ejemplo, pueden estar en la forma de un anillo lactama entre una cadena lateral de lisina y una cadena lateral de ácido glutámico, pero el anillo no se limita particularmente a ello.

Ejemplos del análogo del glucagón preparado por una combinación de estos procedimientos pueden incluir péptidos, cuyas secuencias de aminoácido difieren de aquella del glucagón nativo en al menos un aminoácido, y en la cual se quita el carbono α en el extremo N-terminal del mismo, mientras tienen actividades en un receptor del glucagón, un receptor del GLP-1 y un receptor del GIP, etc., pero no se limitan a ello, y se pueden preparar análogos del glucagón nativo aplicable a la presente invención mediante la combinación de diversos procedimientos para la preparación de análogos.

Además, con respecto al agonista triple de la presente invención, se puede sustituir una parte de los aminoácidos con otros aminoácidos o compuestos no naturales para evitar el reconocimiento por parte de peptidasa para aumentar la vida media *in vivo* del agonista triple, pero el agonista triple no se limita particularmente a ello.

Específicamente, el péptido puede ser un péptido donde se aumentó la vida media *in vivo* evitando el reconocimiento por parte de las peptidasas

mediante la sustitución de la segunda secuencia de aminoácido entre las secuencias de aminoácido del agonista triple, pero se incluye sin limitación cualquier sustitución o modificación de aminoácidos para evitar el reconocimiento por parte de las peptidasas *in vivo*.

5 Además, dicha modificación para preparar análogos del glucagón nativo puede incluir todas las modificaciones mediante el uso de aminoácidos del tipo L o D y/o aminoácidos no naturales; y/o una modificación de la secuencia nativa, por ejemplo, una modificación de un grupo funcional de la cadena lateral, una unión covalente intramolecular (por ejemplo, una formación de un
10 anillo entre cadenas laterales), metilación, acilación, ubiquitinización, fosforilación, aminohexanación, biotinilación, etc.

Además, la modificación también puede incluir todos aquellos en los cuales se añade uno o más aminoácidos al amino y/o carboxilo terminal del glucagón nativo.

15 Durante la sustitución o adición de aminoácidos se pueden usar no solo los 20 aminoácidos que comúnmente se encuentran en proteínas humanas, sino también los aminoácidos atípicos o que no ocurren naturalmente. Las fuentes comerciales de aminoácidos atípicos pueden incluir Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., y Genzyme Pharmaceuticals. Los péptidos que incluyen estos
20 aminoácidos y secuencias de péptidos típicas pueden ser sintetizarse y adquirirse en proveedores comerciales, por ejemplo, American Peptide Company, Bachem (Estados Unidos), o Anygen (Corea).

Los derivados de aminoácidos se pueden obtener de la misma manera, y como tal ejemplo, se puede usar ácido imidazol-4.

25 Además, el péptido según la presente invención puede estar en la

forma de una variante donde el amino y/o el carboxilo terminal, *etc.* del péptido esté químicamente modificado o protegido por grupos orgánicos, o se pueden agregar aminoácidos a la terminal del péptido, para que lo protejan de las peptidasas *in vivo* mientras aumenta su estabilidad.

5 En particular, en el caso de un péptido químicamente sintetizado, sus extremos C y N terminal se cargan eléctricamente y por lo tanto el extremo C y N-terminal del péptido se puede acetilar y/o amidar, pero el péptido no se limita particularmente a ello.

 Además, el péptido según la presente invención puede incluir todos
10 aquellos en la forma de un péptido en sí, una sal del mismo (por ejemplo, un sal del mismo farmacéuticamente aceptable), o un solvato del mismo. Además, el péptido puede estar en cualquier forma farmacéuticamente aceptable.

 El tipo de sal no está particularmente limitado. Sin embargo, se prefiere que sea una sal segura y eficaz para un sujeto, por ejemplo, un mamífero, pero
15 no se limita particularmente a ello.

 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que se puede usar eficazmente para el uso previsto dentro del alcance de la decisión fármaco-médica, sin provocar toxicidad excesiva, irritación, reacciones alérgicas, *etc.*

20 Como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal derivada de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables, ácidos orgánicos, o bases. Ejemplos de sales apropiadas pueden incluir ácido clorhídrico, ácido brómico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fumárico, ácido maleico,
25 ácido fosfórico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido succínico,

ácido p-toluenosulfónico, ácido tartárico, ácido acético, ácido cítrico, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido malónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido bencensulfónico, etc. Ejemplos de las sales derivadas de bases apropiadas pueden incluir metales alcalinos tales como el sodio, potasio, etc.; metales alcalinotérreos tales como el magnesio; amonio, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un complejo formado entre el péptido según la presente invención o una sal del mismo y una molécula de solvente.

En una realización específica, X puede ser un péptido que incluye una secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General 1 a continuación.

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (Fórmula General 1, SEQ ID NO: 103)

En la Fórmula General 1 anterior,

Xaa1 es histidina (His, H), 4-imidazoacetilo (CA), o tirosina (Tyr, Y);

Xaa2 es glicina (Gly, G), ácido α -metil-glutámico, o Aib;

Xaa3 es ácido glutámico (Glu, E) o glutamina (Gln, Q);

Xaa7 es treonina (Thr, T) o isoleucina (Ile, I);

Xaa10 es leucina (Leu, L), tirosina (Tyr, Y), lisina (Lys, K), cisteína (Cys, C) o valina (Val, V);

Xaa12 es lisina (Lys, K), serina (Ser, S) o isoleucina (Ile, I);

Xaa13 es glutamina (Gln, Q), tirosina (Tyr, Y), alanina (Ala, A) o cisteína (Cys, C);

Xaa14 es leucina (Leu, L), metionina (Met, M), o tirosina (Tyr, Y);

Xaa15 es cisteína (Cys, C), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E) o leucina (Leu, L);

Xaa16 es glicina (Gly, G), ácido glutámico (Glu, E) o serina (Ser, S);

5 Xaa17 es glutamina (Gln, Q), arginina (Arg, R), isoleucina (Ile, I), ácido glutámico (Glu, E), cisteína (Cys, C), o lisina (Lys, K);

Xaa18 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), arginina (Arg, R), o histidina (His, H);

10 Xaa19 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), cisteína (Cys, C), o valina (Val, V);

Xaa20 es lisina (Lys, K), glutamina (Gln, Q), o arginina (Arg, R);

Xaa21 es ácido glutámico (Glu, E), glutamina (Gln, Q), leucina (Leu, L), cisteína (Cys, C), o ácido aspártico (Asp, D);

Xaa23 es isoleucina (Ile, I) o valina (Val, V);

15 Xaa24 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), cisteína (Cys, C), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), o ácido glutámico (Glu, E);

Xaa27 es valina (Val, V), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), o metionina (Met, M);

20 Xaa28 es cisteína (Cys, C), lisina (Lys, K), alanina (Ala, A), asparagina (Asn, N), o ácido aspártico (Asp, D);

Xaa29 es cisteína (Cys, C), glicina (Gly, G), glutamina (Gln, Q), treonina (Thr, T), ácido glutámico (Glu, E), o histidina (His, H);

Xaa30 es cisteína (Cys, C), glicina (Gly, G), lisina (Lys, K), o histidina (His, H), o está ausente;

25 R1 es cisteína (Cys, C), GKKNDWKHNIT (SEQ ID NO: 106), m-

SSGAPPPS-n (SEQ ID NO: 107), o m-SSGQPPPS-n (SEQ ID NO: 108), o está ausente;

en la que,

m es -Cys-, -Pro-, o-Gly-Pro-;

5 n es -Cys-, -Gly-, -Ser-, o-His-Gly-, o está ausente.

Por ejemplo, el agonista triple puede ser uno que incluye una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1 a 102; y una que (fundamentalmente) consiste en una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1 a 102, pero no se limita a ello.

Además, aunque en la presente invención se describe como "un péptido que consiste en un SEQ ID NO particular", no excluye una mutación que puede ocurrir mediante la adición de una secuencia insignificante ascendente o descendente de la secuencia del aminoácido de correspondiente SEQ ID NO, o una mutación que puede ocurrir naturalmente, o una mutación silenciosa de la misma, en tanto que el péptido tiene una acción igual o que corresponde a aquella del péptido que consiste en una secuencia de aminoácido del correspondiente SEQ ID NO, e incluso cuando la adición de la secuencia o mutación está presente, ésta obviamente pertenece al alcance de la presente invención.

Lo anterior puede aplicarse en otras realizaciones o aspectos de la presente invención, pero no se limita a ello.

Específicamente, en la Fórmula General 1 anterior, Xaa14 puede ser leucina o metionina, y Xaa15 puede ser cisteína, ácido aspártico, o leucina.

25 Ejemplos del péptido puede ser un péptido que incluye una secuencia

de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1 a 12, 14 a 17, y 21 a 102 o un péptido que (fundamentalmente) consiste en el mismo, pero se limitan particularmente a ello.

El péptido puede activar significativamente al menos un receptor del glucagón, receptor del GLP-1 y receptor del GIP, pero no se limita particularmente a ello. Específicamente, el péptido puede ser uno que significativamente active el receptor del GLP-1, o además el receptor del glucagón y/o el receptor del GIP, pero no se limita particularmente a ello.

Incluso más específicamente, el péptido puede ser:

10 en la Fórmula General 1 anterior,

Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;

Xaa7 es treonina;

Xaa10 es tirosina, cisteína, o valina;

Xaa12 es lisina o isoleucina;

15 Xaa13 es tirosina, alanina, glutamina, o cisteína;

Xaa14 es leucina, cisteína, o metionina;

Xaa15 es cisteína, leucina, ácido glutámico, o ácido aspártico;

Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, cisteína, ácido glutámico, o lisina;

20 Xaa18 es alanina, glutamina, arginina, o histidina;

Xaa19 es alanina, glutamina, valina, o cisteína;

Xaa20 es lisina, arginina, o glutamina;

Xaa21 es ácido glutámico, glutamina, leucina, cisteína, o ácido aspártico;

25 Xaa23 es isoleucina valina;

Xaa24 es cisteína, alanina, glutamina, asparagina, ácido glutámico, o ácido aspártico; y

Xaa27 es leucina o lisina, pero no se limita particularmente a ello.

Incluso, más específicamente,

5 En la Fórmula General 1 anterior,

Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;

Xaa7 es treonina;

Xaa10 es tirosina, cisteína, o valina;

Xaa12 es lisina o isoleucina;

10 Xaa13 es tirosina, alanina, o cisteína;

Xaa14 es leucina o metionina;

Xaa15 es cisteína o ácido aspártico;

Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, cisteína, o lisina;

Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;

15 Xaa19 es alanina, glutamina, o cisteína;

Xaa20 es lisina o glutamina;

Xaa21 es ácido glutámico, cisteína, o ácido aspártico;

Xaa23 es valina;

Xaa24 es alanina, glutamina, cisteína, asparagina, o ácido aspártico; y

20 Xaa27 es leucina o lisina, pero no se limita particularmente a ello.

Incluso, más específicamente,

En la Fórmula General 1 anterior,

Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;

Xaa7 es treonina;

25 Xaa10 es tirosina o cisteína;

- Xaa12 es lisina o isoleucina;
- Xaa13 es tirosina, alanina, o cisteína;
- Xaa14 es leucina o metionina;
- Xaa15 es cisteína o ácido aspártico;
- 5 Xaa16 es ácido glutámico;
- Xaa17 es arginina, isoleucina, cisteína, o lisina;
- Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;
- Xaa19 es alanina, glutamina, o cisteína;
- Xaa20 es lisina o glutamina;
- 10 Xaa21 es ácido glutámico o ácido aspártico;
- Xaa23 es valina;
- Xaa24 es glutamina, asparagina, o ácido aspártico;
- Xaa27 es leucina; y
- Xaa28 es cisteína, alanina, asparagina, o ácido aspártico.
- 15 Específicamente,
- en la Fórmula General 1 anterior,
- Xaa1 es histidina o 4-imidazoacetilo;
- Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;
- Xaa3 es glutamina;
- 20 Xaa7 es treonina;
- Xaa10 es tirosina;
- Xaa12 es isoleucina;
- Xaa13 es alanina o cisteína;
- Xaa14 es metionina;
- 25 Xaa15 es ácido aspártico;

- Xaa16 es ácido glutámico;
 Xaa17 es isoleucina o lisina;
 Xaa18 es alanina o histidina;
 Xaa19 es glutamina o cisteína;
 5 Xaa20 es lisina;
 Xaa21 es ácido aspártico;
 Xaa23 es valina;
 Xaa24 es asparagina;
 Xaa27 es leucina;
 10 Xaa28 es alanina o asparagina;
 Xaa29 es glutamina o treonina; y
 Xaa30 es cisteína o lisina, o está ausente.
 Más específicamente,
 en la Fórmula General 1 anterior,
 15 Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;
 Xaa3 es glutamina;
 Xaa7 es treonina;
 Xaa10 es tirosina, cisteína, o valina;
 Xaa12 es lisina;
 20 Xaa13 es tirosina;
 Xaa14 es leucina;
 Xaa15 es ácido aspártico;
 Xaa16 es glicina, ácido glutámico, o serina;
 Xaa17 es glutamina, arginina, cisteína, o lisina;
 25 Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;

Xaa19 es alanina o glutamina;

Xaa20 es lisina o glutamina;

Xaa21 es ácido glutámico, cisteína, o ácido aspártico;

Xaa23 es valina;

5 Xaa24 es alanina, glutamina, o cisteína;

Xaa27 es leucina o lisina; y

Xaa29 es glicina, glutamina, treonina, o histidina;

pero no se limita particularmente a ello.

Estos péptidos pueden corresponder a un caso donde el péptido tiene
10 niveles de activación significantes tanto en el receptor del GLP-1 y el receptor
del glucagón, o niveles de activación más altos comparados con aquel en el
receptor del GIP; un caso donde el péptido tiene niveles de activación
significantes en todo el receptor del GLP-1, receptor del glucagón, y receptor
del GIP; o un caso donde el péptido tiene niveles de activación significantes
15 tanto en el receptor del GLP-1 y receptor del GIP y niveles de activación más
altos comparados con aquel en el receptor del glucagón; pero no se limitan
particularmente a los mismos.

Cuando el péptido tiene niveles de activación significantes tanto en el
receptor del GLP-1 como en el receptor del GIP, y también niveles de
20 activación más altos comparados con aquel en el receptor del glucagón, es
posible proporcionar un péptido con mayor capacidad mejorada para controlar
los niveles de glucosa en sangre además del efecto de reducir el peso corporal,
mientras cuando el péptido tiene niveles de activación significantes en todo el
receptor del GLP-1, receptor del glucagón, y receptor del GIP, existe una
25 ventaja en que el efecto de reducción de peso corporal se puede maximizar,

pero los efectos no se limitan particularmente a los mismos.

Ejemplos del péptido pueden incluir un péptido que abarca una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 8, 9, 21 a 37, 39, 42, 43, 49 a 61, 64 a 83, 85, 86, 88, 89, 91 a 93, y 95 a 102; o un péptido que (fundamentalmente) consiste en lo mismo, pero no se limita particularmente a ello.

En una realización específica, el péptido puede incluir una secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General 2 a continuación.

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-
 10 Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-
 Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31- Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-
 Xaa40 (Fórmula General 2, SEQ ID NO: 104)

En la Fórmula General 2 anterior,

- Xaa1 es 4-imidazoacetilo, histidina, o tirosina;
- 15 Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;
- Xaa10 es tirosina o cisteína;
- Xaa13 es alanina, glutamina, tirosina, o cisteína;
- Xaa14 es leucina, metionina, o tirosina;
- Xaa15 es ácido aspártico, ácido glutámico, o leucina;
- 20 Xaa16 es glicina, ácido glutámico, o serina;
- Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, ácido glutámico, cisteína, o lisina;
- Xaa18 es alanina, glutamina, arginina, o histidina;
- Xaa19 es alanina, glutamina, cisteína, o valina;
- 25 Xaa20 es lisina, glutamina, o arginina;

Xaa21 es cisteína, ácido glutámico, glutamina, leucina, o ácido aspártico;

Xaa23 es isoleucina valina;

Xaa24 es cisteína, alanina, glutamina, asparagina, o ácido glutámico;

5 Xaa28 es lisina, cisteína, asparagina, o ácido aspártico;

Xaa29 es glicina, glutamina, cisteína, o histidina;

Xaa30 es cisteína, glicina, lisina, o histidina;

Xaa31 es prolina o cisteína; y

Xaa40 es cisteína o está ausente.

10 Más específicamente, en la Fórmula General 2 anterior,

Xaa13 es alanina, tirosina, o cisteína;

Xaa15 es ácido aspártico o ácido glutámico;

Xaa17 es glutamina, arginina, cisteína, o lisina;

Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;

15 Xaa21 es cisteína, ácido glutámico, glutamina, o ácido aspártico;

Xaa23 es isoleucina valina;

Xaa24 es cisteína, glutamina, o asparagina;

Xaa28 es cisteína, asparagina, o ácido aspártico;

Xaa29 es glutamina, cisteína, o histidina; y

20 Xaa30 es cisteína, lisina, o histidina.

Ejemplos del péptido pueden incluir un péptido que abarca una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 21, 22, 42, 43, 50, 64 a 77, y 95 a 102; más específicamente, un péptido que incluye una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 21, 22, 42, 43, 50, 64 a 77, y 96 a 102; o un péptido que

25

(fundamentalmente) consiste en lo mismo, pero no se limita particularmente a ello.

En una realización específica, el péptido puede incluir una secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General 3 a continuación.

5 Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (Fórmula General 3, SEQ ID NO: 105)

En la Fórmula General 3 anterior,

10 Xaa1 es histidina o tirosina;
 Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;
 Xaa13 es alanina, tirosina o cisteína;
 Xaa17 es arginina, cisteína, o lisina;
 Xaa18 es alanina o arginina;
 15 Xaa19 es alanina o cisteína;
 Xaa21 es ácido glutámico o ácido aspártico;
 Xaa24 es glutamina o asparagina,
 Xaa28 es cisteína o ácido aspártico;
 Xaa29 es cisteína, histidina, o glutamina;
 20 Xaa30 es cisteína o histidina;
 Xaa31 es prolina o cisteína; y
 Xaa40 es cisteína o está ausente.

Ejemplos del péptido pueden incluir un péptido que abarca una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID
 25 NOS: 21, 22, 42, 43, 50, 64 a 77, 75 a 77, y 96 a 102; o un péptido que

(fundamentalmente) consiste en lo mismo, pero no se limita particularmente a ello.

Además, en la Fórmula General 1 anterior, R1 puede ser cisteína, GKKNWVWKNIT (SEQ ID NO: 106), CSSGQPPPS (SEQ ID NO: 109),
 5 GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 110), GPSSGAPPPSC (SEQ ID NO: 111),
 PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 112), PSSGAPPPSG (SEQ ID NO: 113),
 PSSGAPPPSHG (SEQ ID NO: 114), PSSGAPPPSS (SEQ ID NO: 115),
 PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 116), o PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 117), o está ausente, pero no se limita particularmente a ello.

10 Además, el péptido de la presente invención se puede sintetizar mediante un procedimiento conocido en la técnica, según su longitud, por ejemplo, mediante un sintetizador de péptido automático, y se puede producir mediante tecnología de ingeniería genética.

Específicamente, el péptido de la presente invención se puede preparar
 15 mediante un procedimiento de síntesis estándar, un sistema de expresión recombinante, o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. Por consiguiente, el péptido de la presente invención se puede sintetizar mediante muchos procedimientos, por ejemplo, los procedimientos que se describen a continuación:

20 (a) un procedimiento para sintetizar un péptido mediante un procedimiento gradual de fase sólida o fase líquida o mediante un montaje de fragmento, seguido por aislamiento y purificación del producto final del péptido;
 o

(b) un procedimiento para expresar una formación del ácido nucleico
 25 que codifica un péptido en una célula huésped y recupera el producto de

expresión del cultivo de la célula huésped; o

(c) un procedimiento para llevar a cabo una expresión libre de células *in vitro* de una formación del ácido nucleico que codifica un péptido y recupera el producto de expresión partir de allí; o

- 5 un procedimiento para obtener fragmentos de péptido mediante alguna combinación de los procedimientos (a), (b) y (c), obtener el péptido mediante la unión de los fragmentos de péptido y luego recuperar el péptido.

En el conjugado anterior, F es un material que puede aumentar la vida media de X, por ejemplo., un péptido que tiene actividades en un receptor del glucagón, receptor del GLP-1 y receptor del GIP, y corresponde a una
10 constitución de una fracción que constituye el conjugado de la presente invención.

La F y la X pueden estar ligadas mutuamente mediante una unión química covalente o una unión química no covalente; o F y X pueden estar
15 ligadas mutuamente a través de L mediante una unión química covalente, una unión química no covalente, o una combinación de la misma.

El material que puede aumentar la vida media de X puede ser un material biocompatible, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en un polímero, ácido graso, colesterol, albúmina y un fragmento de los
20 mismos, un material de unión de albúmina, un polímero de unidades de repetición de secuencias de aminoácido particulares, un anticuerpo, un fragmento del anticuerpo, un material de unión del FcRn, un tejido conectivo *in vivo*, un nucleótido, fibronectina, transferrina, un sacárido, heparina, y elastina, pero no se limita particularmente a ello.

25 La elastina puede ser tropoelastina humana, que es un precursor

soluble, y puede ser una secuencia determinada de tropoelastina o un polímero de determinadas unidades de repetición de éstos, por ejemplo, incluye todos los polipéptidos análogos de elastina, pero no se limita particularmente a los mismos.

5 Ejemplos del polímero puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), propilenglicol, un copolímero de propilenglicol - etilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol de polivinilo, polisacárido, dextrano, polivinil éter etílico, un polímero biodegradable, un polímero lípido, quitinas, ácido hialurónico, un oligonucleótido y una combinación de los mismos, pero no
10 se limitan particularmente a ello.

El polietilenglicol abarca todas las formas de homopolímero de etilenglicol, copolímeros PEG, y polímeros PEG sustituidos por monometil (mPEG), pero no se limita particularmente a ello.

Además, el material biocompatible puede incluir poliaminoácidos tales
15 como polilisina, poli-ácido aspártico, y poli-ácido glutámico, pero no se limita a ello.

Además, el ácido graso puede ser uno que tenga una afinidad de unión con albúmina *in vivo*, pero no se limita particularmente a ello.

En otra realización más específica, el material de unión FcRn puede ser
20 una región Fc de inmunoglobulina, y más específicamente, una región IgG Fc, pero no se limita particularmente a ello.

Al menos un aminoácido de la cadena lateral dentro del péptido de la presente invención puede adjuntarse al material biocompatible con el fin de aumentar la solubilidad y/o vida media *in vivo*, y/o aumentar la biodisponibilidad
25 de la misma. Estas modificaciones pueden reducir la depuración de péptidos y

proteínas terapéuticas.

El polímero biocompatible puede ser soluble (anfipático o hidrófilo) y/o no tóxico y/o farmacéuticamente aceptable.

F puede estar directamente conectada con X (por ejemplo, a es 0 en la
5 Fórmula Química 1) o puede estar conectada mediante un conector (L).

Específicamente, L puede ser un péptido conector o un péptido no conector, pero no se limita a ello.

Cuando L es un péptido conector, éste puede incluir uno o más aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 1000 aminoácidos, pero no se limita
10 particularmente a ello. En la presente invención, se pueden usar varios péptidos conectores conocidos para unir entre F y X (por ejemplo, se incluyen [GS]*x* conector, [GGGS]*x* conector, y [GGGGS]*x* conector, etc., en las que *x* es un número natural de al menos 1), pero los péptidos conectores no se limitan a ello.

15 En la presente invención, el "péptido no conector" incluye un polímero biocompatible al cual se conectan al menos dos unidades de repetición. Las unidades de repetición están conectadas unas con otras mediante una unión covalente en vez de una unión de péptido. El péptido no conector puede ser una constitución que establece una fracción del conjugado de la presente
20 invención y corresponde a L en la Fórmula Química 1 anterior.

En La de la Fórmula Química 1, *a* puede ser 1 o mayor, y cada L puede ser independiente una de otra cuando *a* es 2 o mayor.

Como se usa en el presente documento, el término "péptido no conector" se puede usar indistintamente con "polímero no péptido".

25 Además, en una realización específica, el conjugado puede ser uno en

el cual F y X estén conectados covalentemente entre sí mediante un péptido no conector que tiene dos grupos terminales reactivos que están conectados a X, específicamente fármaco péptido, y F, específicamente región Fc de inmunoglobulina, respectivamente.

5 Específicamente el péptido no conector puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en un ácido graso, un sacárido, un polímero, un compuesto de peso molecular bajo, un nucleótido, y una combinación de los mismos.

Aunque no esté particularmente limitado, el péptido no conector puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, propilenglicol, 10 un copolímero de propilenglicol - etilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol de polivinilo, un polisacárido, dextrano, polivinil éter etílico, un polímero biodegradable tales como ácido poliláctico (PLA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), polímero lípido, quitinas, ácido hialurónico, un oligonucleótido y una combinación de los mismos. En otra realización más específica, el 15 polímero no péptido puede ser polietilenglicol, pero no se limita a ello. Además, los derivados de los materiales anteriores ya conocidos en la técnica y los derivados se pueden producir fácilmente al nivel de tecnología en la técnica que pertenece al alcance de la presente invención.

El péptido no conector que se usará en la presente invención puede ser 20 cualquier polímero que tenga resistencia a la peptidasa *in vivo*, sin limitación. El peso molecular del polímero no péptido puede estar en un intervalo de 1 kDa a 100 kDa, y específicamente, 1 kDa a 20 kDa, pero no se limita a ello. Además, el péptido no conector de la presente invención, que está conectado al polipéptido correspondiente a F puede incluir no solo un único tipo de un 25 polímero, sino también una combinación de diferentes tipos de polímeros.

En una realización específica, ambos extremos del péptido no conector pueden estar respectivamente conectados a un grupo amino o grupo tiol de F, por ejemplo una región Fc de inmunoglobulina, o un grupo amino o grupo tiol de X.

5 Específicamente, el polímero no péptido puede incluir un grupo reactivo que puede estar conectado a F (por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina) y X en ambos extremos del mismo, respectivamente, y específicamente, un grupo reactivo que puede estar conectado a un grupo amino ubicado en el extremo N o lisina, o un grupo tiol de cisteína de X, o un
10 grupo amino ubicado en el extremo N o lisina, o un grupo tiol de cisteína de F (por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina), pero el grupo reactivo no se limita a ello.

Además, el grupo reactivo del polímero no péptido que puede estar conectado con la región Fc de inmunoglobulina y X se puede seleccionar del
15 grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo maleimida, y un derivado de succinimida, pero no se limita a ello.

En el anterior, los ejemplos del grupo aldehído pueden incluir un grupo propanal o un grupo butanal, pero no se limita a ello.

En el anterior, se pueden usar como un derivado de succinimida,
20 valerianato de succinidimilo, butirato de etilo de succinidimilo, propionato de metilo de succinidimilo, butanoato de succinidimilo, propanoico de succinidimilo, N-hidroxisuccinimida, hidroxilo de succinidimilo, carboximetil de succinidimilo o carbonato de succinidimilo, pero el derivado de succinimida no se limita a ello.

25 El péptido no conector se puede conectar a X y F mediante estos

grupos reactivos, pero los grupos reactivos no se limitan particularmente a ello.

Además, el producto final producido a través de alquilación reactiva mediante una unión aldehído es más estable que aquella conectada mediante una unión amida. El grupo reactivo aldehído reacciona selectivamente con un extremo N-terminal en una condición de pH bajo mientras puede formar una unión covalente con un residuo de lisina en un pH alto (por ejemplo, pH 9,0).

Los grupos reactivos en ambos extremos del péptido no conector pueden ser los mismos o diferentes unos de otros, por ejemplo, se puede proporcionar un grupo reactivo de maleimida en un extremo, mientras que en el otro extremo se puede proporcionar un grupo aldehído, un grupo propanal o un grupo butanal. Sin embargo, en tanto que F, específicamente una región Fc de inmunoglobulina, se pueda conectar a X, y los grupos reactivos no están particularmente limitados.

Por ejemplo, el péptido no conector puede tener un grupo maleimida como un grupo reactivo en un extremo mientras tiene un grupo aldehído, un grupo propanal o un grupo butanal, etc., en el otro extremo.

Cuando un polietilenglicol que tiene un grupo hidroxilo reactivo en ambos extremos del mismo se usa como el polímero no péptido, el grupo hidroxilo se puede activar a varios grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o se puede usar un polietilenglicol que tenga un grupo reactivo modificado disponible comercialmente para preparar el conjugado de proteína de acción prolongada de la presente invención.

En una realización específica, el polímero no péptido puede ser uno que pueda estar conectado a un residuo de cisteína de X, y más específicamente, al grupo -SH de cisteína, pero no se limita a ello.

Cuando se usa aldehído-PEG-maleimida, el grupo maleimida se puede conectar al grupo -SH de X mediante una unión tioéter, y el grupo aldehído se puede conectar a F, específicamente al -NH₂ de la Fc de inmunoglobulina mediante alquilación reductiva, pero no se limita a ello, y lo anterior es
5 meramente una realización.

Además, en el conjugado anterior, un grupo reactivo del polímero no péptido puede conectarse al -NH₂ ubicado en el extremo N-terminal de la Fc de inmunoglobulina, pero es meramente una realización.

En la presente invención, “región Fc de inmunoglobulina,” se refiere a
10 una región que incluye la cadena pesada de la región constante 2 (CH2) y/o la cadena pesada de la región constante 3 (CH3), excluyendo la cadena pesada y la cadena ligera de las regiones variables de una inmunoglobulina. La región Fc de inmunoglobulina puede ser una constitución que establece una fracción de un conjugado de proteína de la presente invención.

15 La región Fc de inmunoglobulina puede incluir una región bisagra en la región constante de la cadena pesada, pero no se limita a ello. Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser una región Fc extendida que incluye una parte o la totalidad de la región 1 constante de la cadena pesada (CH1) y/o la región 1 constante de la cadena ligera (CL1),
20 excluyendo las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina, en tanto que la región Fc de inmunoglobulina tiene un efecto sustancialmente igual o mejorado comparado con el del tipo nativo. Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser una región en la cual se quita una parte bastante larga de la secuencia del aminoácido que
25 corresponde a CH2 y/o CH3.

Por ejemplo, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser 1) un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3, y un dominio CH4; 2) un dominio CH1 y un dominio CH2; 3) un dominio CH1 y un dominio CH3; 4) un dominio CH2 y un dominio CH3; 5) una combinación entre uno o dos o más dominios entre un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4 y una región bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región bisagra); y 6) un dímero entre cada dominio de la región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera, pero no se limita a ello.

Además, en una realización específica, la región Fc de inmunoglobulina puede estar en una forma dimérica y una molécula de X puede estar covalentemente conectada a una región Fc en forma de dímero, donde la Fc de inmunoglobulina y X pueden estar conectadas entre sí mediante un polímero no péptido. Además, también es posible que dos moléculas de X estén simétricamente conectadas a la región Fc en forma de dímero. No obstante, la conexión no se limita a ello.

Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención no solo incluye una secuencia de aminoácido nativo, sino también una secuencia derivada del mismo. Un derivado de una secuencia de aminoácido se refiere a una secuencia de aminoácido que tiene una diferencia en al menos un residuo de aminoácido debido a la eliminación, inserción, sustitución conservadora o no conservadora, o una combinación de ello.

Por ejemplo, los residuos del aminoácido en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331, que se conocen por estar en la conjugación de una Fc de inmunoglobulina, se pueden usar como sitios aptos para la

modificación.

Además, son posibles otros derivados varios, incluido uno que tiene una eliminación de una región capaz de formar un enlace disulfuro, o una eliminación de algunos residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal del Fc nativo o una adición de un residuo de metionina en el extremo N-terminal del Fc nativo. Además, para quitar las funciones efectoras, puede ocurrir una eliminación en un sitio de unión de complemento, tal como un sitio de unión C1q y un sitio de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Las técnicas para preparar dichos derivados de secuencias de la región Fc de inmunoglobulina se divulgan en las publicaciones de la patente internacional N.º WO 97/34631, WO 96/32478, *etc.*

Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que no cambian totalmente la acción de las proteínas o péptidos, son conocidos en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Los intercambios que ocurren más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly, en ambas direcciones. Dependiendo de los casos, la región Fc se puede modificar por fosforilación, sulfatación, acilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, aminación, *etc.*

Los derivados Fc descritos anteriormente muestran una actividad biológica idéntica a aquella de la región Fc de la presente invención y posiblemente haya mejorado la estabilidad estructural contra el calor, pH, *etc.*

Además, la región Fc de inmunoglobulina se puede obtener a partir de formas nativas aisladas *in vivo* de humanos o animales tales como vacas,

cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas, conejillos de indias, etc., o puede ser una región Fc de inmunoglobulina recombinante obtenida a partir de las células o microorganismos de animales transformados o derivados de los mismos. En el presente documento, la región Fc se puede obtener a partir de

5 una inmunoglobulina nativa aislando toda la inmunoglobulina de un cuerpo animal o humano vivo y tratando la inmunoglobulina asilada con peptidasa. Cuando toda la inmunoglobulina se trata con papaína, ésta se divide en regiones Fab y Fc, y cuando toda la inmunoglobulina se trata con pepsina, ésta se divide en los fragmentos pF'c y F(ab)₂. Fc o pF'c se pueden aislar usando

10 una cromatografía de exclusión por tamaño, etc. En otra realización más específica, la región Fc de inmunoglobulina es una la región Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene a partir de un microorganismo que expresa una región Fc derivada de un humano.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede estar en la forma de

15 glicanos naturales, glicanos aumentados o reducidos comparados con el tipo nativo, o en una forma desglicosilada. El aumento, reducción, o remoción de los glicanos Fc de inmunoglobulina se puede alcanzar mediante procedimientos convencionales tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética mediante

20 el uso de un microorganismo. La región Fc de inmunoglobulina obtenida a partir de la remoción de glicanos de la región Fc muestra una disminución significativa en la afinidad de la unión al C1q y una citotoxicidad por anticuerpos o citotoxicidad por complementos, y por lo tanto no induce respuestas *in vivo* inmunes innecesarias. En este sentido, una región Fc de inmunoglobulina en

25 una región Fc de inmunoglobulina desglicosilada o glicosilada puede ser una

forma más apta para cumplir con el objetivo original de la presente invención como un transportador del fármaco.

Como se usa en el presente documento, el término "desglicosilación" se refiere a eliminación enzimática de fracciones de azúcar de una región Fc, y el
5 término "aglicosilación" se refiere a una región Fc no glicosilada producida en procariontes, más específicamente, *E. coli*.

Asimismo, la región Fc de inmunoglobulina puede derivar de humanos u otros animales, entre ellos vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas y conejillos de indias. En otra realización más específica, deriva de los
10 humanos.

Además, la región Fc de inmunoglobulina (Ig) puede derivar de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, o una combinación o híbridos de los mismos. En otra realización más específica, deriva de IgG o IgM, que están entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, e incluso en otra realización más específica,
15 deriva de IgG, que se conoce por potenciar la vida media de las proteínas de unión de ligandos. Incluso en otra realización más específica, la región Fc de inmunoglobulina está en una región Fc IgG4, y en la realización más específica, la región Fc IgG4 Fc es una región Fc aglicosilada derivada del humano IgG4, pero no se limita a ello.

En particular, como se usa en el presente documento, el término
20 "combinación" significa que los polipéptidos que codifican una única cadena de la región Fc de inmunoglobulina del mismo origen están conectados a una única cadena de polipéptido de un origen diferente para formar un dímero o multidímero. Es decir, un dímero o multidímero puede estar formado a partir de
25 dos o más fragmentos seleccionados del grupo compuesto de los fragmentos

IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc, y IgE Fc.

Además, el conjugado anterior puede tener una propiedad de acción prolongada mejorada del efecto en comparación con el GLP-1 nativo, GIP o glucagón, o en comparación con la X donde la F no está modificada, y estos
5 conjugados incluyen aquellos incorporados mediante nanopartículas biodegradables además de aquellos descritos anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica el conjugado, un vector que incluye el polinucleótido y un transformante que incluye el polinucleótido o un vector que incluye el
10 polinucleótido.

El conjugado es el mismo que se explica anteriormente.

El polinucleótido puede ser uno que codifique un conjugado en la forma de una proteína de fusión.

Además, el polinucleótido asilado que codifica el conjugado incluye,
15 dentro del alcance de la presente invención, una secuencia de polinucleótido que tiene una secuencia para identificar a la secuencia correspondiente al 75 % o superior, específicamente 85 % o superior, más específicamente 90 % o superior e incluso más específicamente 95 % o superior.

Como se usa en el presente documento, el término "homología" indica
20 la similitud de secuencia con una secuencia de aminoácido natural o una secuencia de ácido nucleico natural, y la comparación de la homología se puede realizar con una observación a simple vista o usando un programa de comparación disponible comercialmente. Mediante el uso de un programa informático disponible comercialmente, la homología entre dos o más
25 secuencias puede expresarse como un porcentaje (%), y se puede calcular la

homología (%) entre secuencias adyacentes.

Como se usa en el presente documento, el término "vector recombinante" se refiere a una construcción de ADN en la cual el polinucleótido que codifica la proteína meta, por ejemplo, el conjugado, está operativamente
5 conectado a una secuencia de regulación apropiada para permitir la expresión de la proteína meta, el conjugado, en una célula huésped.

La secuencia de regulación incluye un promotor que puede iniciar transcripción, cualquier secuencia operativa para regular la transcripción, una secuencia que codifica un dominio de enlace del ribosoma ARNm apropiado, y
10 una secuencia para regular la terminación de la transcripción y traducción. El vector recombinante, luego de haberse transformado en una célula huésped adecuada, se puede replicar o funcionar independientemente del genoma huésped, o se puede integrar al mismo genoma huésped.

El vector recombinante que se usa en la presente invención no estará
15 particularmente limitado en tanto que el vector se replique en la célula huésped, y se pueda construir usando un vector conocido en la técnica. Entre los ejemplos del vector usado convencionalmente se pueden incluir plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos naturales o recombinantes. Los vectores que se usan en la presente invención no están particularmente limitados, pero se
20 puede usar cualquier vector de expresión conocido en la técnica.

El vector recombinante se usa para la transformación de una célula huésped para producir el conjugado de la presente invención. Además, estas células transformadas, como una parte de la presente invención, se pueden usar para amplificar fragmentos de ácido nucleico y vectores, o pueden ser
25 células cultivadas o líneas celulares usadas en la producción recombinante del

conjugado de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a un proceso para introducir un vector recombinante incluyendo un polinucleótido que codifica una proteína meta en una célula huésped, de ese modo permite la expresión de la proteína codificada por el polinucleótido en la célula huésped. Para el polinucleótido transformado no importa si está insertado en el cromosoma de la célula huésped y ubicado allí o fuera del cromosoma, en tanto que se pueda expresar en la célula huésped, y ambos casos están incluidos.

Además, el polinucleótido incluye ADN y ARN que codifican la proteína meta. El polinucleótido se puede introducir de cualquier forma en tanto que se pueda introducir en una célula huésped y se pueda expresar allí. Por ejemplo, el polinucleótido se puede introducir en una célula huésped en la forma de un casete de expresión, que es la construcción de un gen que incluye todos los elementos esenciales que se requieren para la propia expresión. El casete de expresión convencionalmente puede incluir un promotor operativamente conectado al polinucleótido, una señal de terminación de transcripción, un dominio de enlace del ribosoma, y una señal de terminación de traducción. El casete de expresión puede estar en la forma de un vector expresión capaz de autorreplicación. Además, el polinucleótido se puede introducir en una célula huésped cuando está operativamente conectado a una secuencia esencial para su expresión en la célula huésped, pero no se limita a ello.

Además, según se usa en el presente documento, el término "operativamente conectado" se refiere a una conexión funcional entre una secuencia promotora, la cual inicia y media la transcripción del polinucleótido

que codifica la proteína meta, por ejemplo, un conjugado de la presente invención, y la secuencia de gen anterior.

Un huésped apropiado para usar en la presente invención no puede limitarse particularmente en tanto que pueda expresar el polinucleótido de la presente invención. Entre los ejemplos del huésped apropiado se pueden
5 incluir la bacteria que pertenece al género de *Escherichia* tal como *E. coli*; la bacteria que pertenece al género de *Bacillus* tal como *Bacillus subtilis*; la bacteria que pertenece al género de *Pseudomonas* tal como *Pseudomonas putida*; levaduras tales como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, y
10 *Schizosaccharomyces pombe*; células de insecto tales como *Spodoptera frugiperda* (Sf9), y células animales tales como CHO, COS, y BSC.

Incluso otro aspecto de la presente invención proporciona una composición que contenga el conjugado.

El conjugado es el mismo que se explica anteriormente.

15 Específicamente, la composición puede ser una composición farmacéutica, y más específicamente, una composición farmacéutica para prevenir o tratar el síndrome metabólico.

Según se usa en el presente documento, el término "prevención" se refiere a todas las actividades que inhiben o retrasan el síndrome metabólico mediante la administración del conjugado anterior o de la composición que
20 contiene el conjugado, y el término "tratamiento" se refiere a todas las actividades que mejoran o ventajosamente cambian los síntomas del síndrome metabólico mediante la administración del conjugado anterior o de la composición que contiene el conjugado.

25 Según se usa en el presente documento, el término "administración" se

refiere a la introducción de una sustancia particular en un sujeto mediante un procedimiento adecuado, y la vía de administración de la composición puede ser cualquier vía convencional que haga llegar la composición a la meta *in vivo*, por ejemplo, la administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intradérmica, administración oral, administración tópica, administración intranasal, administración intrapulmonar, administración intrarrectal, etc.

Según se usa en el presente documento, el término "síndrome metabólico" se refiere a un síntoma en el cual diversos trastornos que ocurren debido a un trastorno metabólico ocurren solos o en combinación. En particular, los ejemplos de trastornos que pertenecen al síndrome metabólico pueden incluir intolerancia a la glucosa, hipercolesterolemia, dislipidemia, obesidad, diabetes, hipertensión, arteriosclerosis debido a la dislipidemia, aterosclerosis, y cardiopatía coronaria, pero no se limitan a los mismos.

Según se usa en el presente documento, el término "obesidad" se refiere a un trastorno médico con acumulación de grasa corporal en exceso y generalmente una persona se define como obesa cuando su índice de masa corporal (IMC; valor de masa corporal (kg) sobre la altura corporal al cuadrado (m)) es 25 o superior. Generalmente el motivo principal de la obesidad es el desequilibrio energético causado por la ingesta excesiva de alimentos en comparación con el consumo energético durante un largo periodo de tiempo. La obesidad, un trastorno metabólico que afecta todo el cuerpo, aumenta la posibilidad de desarrollar diabetes e hiperlipidemia, aumenta el riesgo de incidencia de disfunción sexual, artritis y enfermedades cardiovasculares, y en algunos casos se asocia con el desarrollo del cáncer.

La composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. El transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable puede que no ocurra naturalmente.

5 Según se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a las propiedades de tener una cantidad suficiente para mostrar un efecto terapéutico y no generar efectos secundarios, y se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica basada en factores conocidos en el campo médico, tales como el tipo de trastorno, edad, peso
10 corporal, estado de salud, sexo, sensibilidad a los fármacos de un paciente, vía de administración, método de administración, frecuencia de la administración, duración del tratamiento, un fármaco o varios deben mezclarse o administrarse de manera simultánea, etc.

La composición farmacéutica de la presente invención que contiene un
15 péptido de la presente invención también puede incluir un transportador farmacéuticamente aceptable. El transportador farmacéuticamente aceptable puede incluir, para la administración oral, un aglutinante, un lubricante, un disgregante, un excipiente, un agente solubilizante, un dispersante, un agente estabilizante, un agente de suspensión, un agente colorante, un agente
20 saborizante, etc.; para inyecciones, un agente amortiguador, un agente de conservación, un analgésico, un agente solubilizante, un agente isotónico, un agente estabilizante, etc., que se pueden combinar para su uso; y para las administraciones tópicas, una base, un excipiente, un lubricante, un agente de conservación, etc.

25 El tipo de formulación de la composición según la presente invención se

puede preparar diversamente mediante la combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable descrito anteriormente. Por ejemplo, para la administración oral, la composición se puede formular en tabletas, píldoras, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, *etc.* Para inyecciones, la
5 composición se debe formular en ampollas de dosis unitarias o contenedores de dosis múltiples. La composición también se puede formular en soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, *etc.*

Asimismo, los ejemplos de transportadores, excipientes y diluyentes
10 aptos pueden incluir, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, caucho de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metil para-hidroxibenzoato, propil parahidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, *etc.*
15 Además, la composición también puede incluir un diluyente, un anticoagulante, un lubricante, un humectante, un agente saborizante, un conservante, *etc.*

Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar en cualquier tipo de formulación seleccionada del grupo que consiste en tabletas, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, suspensiones,
20 medicación líquida para uso interno, emulsiones, jarabes, soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, formulaciones liofilizadas y supositorios.

Además, la composición se puede formular como una dosis por unidad apta para el cuerpo del paciente, y está específicamente formulada en una preparación útil para fármacos de proteínas según el procedimiento típico en el
25 campo farmacéutico para que se administre mediante una vía oral o parenteral,

tales como la piel, de manera intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, pulmonar, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, intragástrica, tópica, sublingual, vaginal o rectal, pero no se limita a ello.

5 Además, el conjugado se puede usar mezclándose con diversos transportadores farmacéuticamente aceptados aprobados como fármacos farmacéuticos tales como la salina fisiológica o disolventes orgánicos. Para aumentar la estabilidad o absorbencia, se pueden usar como fármacos farmacéuticos los carbohidratos tales como la glucosa, la sacarosa o dextrano,
10 los antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el glutatión, los agentes quelantes, las proteínas de peso molecular bajo o demás estabilizadores.

La dosis de administración y la frecuencia de la composición farmacéutica de la presente invención están determinadas por el tipo de ingredientes activos, junto con diversos factores tales como el trastorno a tratar,
15 la vía de administración, la edad, el género y el peso corporal del paciente, y la gravedad del trastorno.

La dosis efectiva total de la composición de la presente invención se puede administrar en un paciente en una única dosis o se puede administrar durante un largo periodo de tiempo en dosis múltiples según un protocolo de
20 tratamiento fraccionado. En la composición farmacéutica de la presente invención, el contenido de los ingredientes activos puede variar según la gravedad del trastorno. Específicamente, la dosis diaria total del conjugado de la presente invención puede ser de aproximadamente 0,0001 mg a 500 mg por kg de peso corporal de un paciente. No obstante, la dosis efectiva del
25 conjugado se determina considerando diversos factores, entre ellos, la edad del

paciente, el peso corporal, las condiciones de salud, el género, la gravedad del trastorno la dieta y la tasa de excreción, además de la vía de administración y la frecuencia del tratamiento de la composición farmacéutica. En este sentido, aquellos expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la dosis efectiva
5 apta para el uso particular de la composición farmacéutica de la presente invención. La composición farmacéutica según la presente invención no está particularmente limitada a la formulación, vía y modo de administración, en tanto que muestra los efectos de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención muestra una
10 duración *in vivo* excelente de la eficacia y medición, y por lo tanto, el número y la frecuencia de la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención puede reducirse significativamente.

Incluso otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un trastorno clave, el cual incluye administrar el
15 conjugado o una composición que contiene el conjugado a un sujeto que necesite de la misma. El trastorno clave puede ser el síndrome metabólico.

El conjugado o la composición que contiene el conjugado son las mismas que se explicaron anteriormente.

El trastorno clave puede ser el síndrome metabólico.

20 Según se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un sujeto del que se sospecha que tiene un síndrome metabólico, y el sujeto del que se sospecha que tiene un síndrome metabólico se refiere a mamíferos, incluidos los humanos, las ratas, ganado vacuno, *etc.*, que tienen o poseen riesgo de desarrollar el síndrome metabólico, pero se incluye sin limitación
25 cualquier sujeto que se pueda tratar con el conjugado de la presente invención

o la composición que contiene el conjugado.

El procedimiento de la presente invención puede incluir administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que contiene el conjugado. La dosis diaria total de la composición se puede
5 determinar dentro del juicio clínico apropiado de un médico, y la composición se puede administrar una vez o varias veces en dosis divididas por día. Sin embargo, a todos los fines de la presente invención, la dosis efectiva terapéuticamente específica de la composición para cualquier paciente particular se aplica preferentemente de manera distinta, dependiendo de varios
10 factores entre ellos el tipo y grado de respuesta que se debe alcanzar, las composiciones específicas incluyen si ocasionalmente también se usan otros agentes, la edad del paciente, el peso corporal, la condición de salud, el género y la dieta, el tiempo y la vía de administración, la tasa de secreción de la composición, la duración del tratamiento, demás fármacos usados en
15 combinación o simultáneamente con las composiciones específicas, y factores conocidos en el campo médico.

Incluso otro aspecto de la presente invención proporciona el uso del conjugado o una composición que contiene el conjugado en la preparación de un medicamento.

20 El conjugado o la composición que contiene el conjugado es la misma que se explicó anteriormente.

El medicamento puede ser para prevenir o tratar el síndrome metabólico.

A continuación en el presente documento, se describirá la presente
25 invención en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. No obstante,

estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos, y la invención no está destinada a limitarse por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de agonistas triples

Los agonistas triples que muestran las actividades de todos los GLP-1, y los receptores del glucagón que se prepararon y sus secuencias de aminoácido se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

SEQ ID NO	Secuencia	Información
1	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFI AWLVKGC	
2	HXQGTFTSDVSSYLDGQAQKEFI AWLVKGC	
3	HXQGTFTSDVSSYLLGQAAKQFI AWLVKGGGPSSGAPPPSC	
4	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFI AWLVKGC	
5	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFI AWLVKGGGPSSGAPPPSC	
6	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFV AWLLKGC	
7	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFV AWLLKGC	
8	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFV AWLLKGC	
9	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFV AWLLAGC	
10	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFV AWLLAGGGPSSGAPPPSC	
11	CAGEGTFTSDLSKYLDSRRQQLF VQWLKAGGPSSGAPPPSHG	
12	CAGEGTFISDLSKYMDEQAVQLF VEWLMAGGPSSGAPPPSHG	
13	CAGEGTFISDYSIQLDEIAVQDFV EWLLAQKPSSGAPPPSHG	
14	CAGQGTFTSDYSIQLDEIAVRDFV EWLKNGGPSSGAPPPSHG	
15	CAGQGTFTSDLSKQMDEEAVRLF IEWLKNGGPSSGAPPPSHG	

SEQ ID NO	Secuencia	Información
16	CAGQGTFTSDLSKQMDSEAQQLF IEWLKNGGPSSGAPPPSHG	
17	CAGQGTFTSDLSKQMDEERAREF IEWLLAQKPSSGAPPPSHG	
18	CAGQGTFTSDLSKQMDSERAREF IEWLKNTGPSSGAPPPSHG	
19	CAGQGTFTSDLSIQYDSEHQ RDF IEWLKDTGPSSGAPPPSHG	
20	CAGQGTFTSDLSIQYEEEAQQDF VEWLKDTGPSSGAPPPSHG	
21	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFV QWLLDHHPSSGQPPPS	Formación del anillo
22	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFV QWLLDHHPSSGQPPPS	Formación del anillo
23	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFV QWLLAQKGKKNDWKHNIT	Formación del anillo
24	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFV QWLKNGGPSSGAPPPS	Formación del anillo
25	HXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFV QWLLDGGPSSGAPPPS	
26	HXQGTFTSDCSKYLDSRAAQDFV QWLLDGGPSSGAPPPS	
27	HXQGTFTSDYSKYLDERACQDFV QWLLDQGGPSSGAPPPS	
28	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRAQEFV CWLLAQKGKKNDWKHNIT	
29	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAA <u>K</u> EFV QWLLNTC	Formación del anillo
30	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAQ <u>K</u> EFV QWLLDTC	Formación del anillo
31	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAC <u>K</u> EFV QWLLAQ	Formación del anillo
32	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAC <u>K</u> DFV QWLLDGGPSSGAPPPS	Formación del anillo
33	HXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFV NWLLAQKC	Formación del anillo
34	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFV NWLLAQKC	Formación del anillo
35	HXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFV NWLLNTKC	Formación del anillo
36	HXQGTFTSDYSKYLC <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFV QWLLNGGPSSGAPPPSG	Formación del anillo

SEQ ID NO	Secuencia	Información
37	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRQ <u>K</u> EFV QWLLNGGPSSGAPPPSG	Formación del anillo
38	CAXQGTFTSDKSSYLDERAAQDF VQWLLDGGPSSGAPPPSS	
39	HXQGTFTSDYSKYLDGQHAQCF VAWLLAGGGPSSGAPPPS	
40	HXQGTFTSDKSKYLDERACQDFV QWLLDGGPSSGAPPPS	
41	HXQGTFTSDKSKYLDECAAQDFV QWLLDGGPSSGAPPPS	
42	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFV QWLLDHHPPSSGQPPPS	Formación del anillo
43	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFV QWLLDHHCSSGQPPPS	Formación del anillo
44	HGQGTFTSDCSKQLDGGQAAQEF VAWLLAGGPSSGAPPPS	
45	HGQGTFTSDCSKYM DGQAAQDF VAWLLAGGPSSGAPPPS	
46	HGQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> QHAQEF VAWLLAGGPSSGAPPPS	
47	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQEF VAWLLAGGPSSGAPPPS	
48	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQDF VNWLLAGGPSSGAPPPS	
49	CAXQGTFTSDYSICM <u>D</u> <u>E</u> IHQ <u>K</u> DF VNWLLNTK	Formación del anillo
50	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFV QWLLDHHPPSSGQPPPS	Formación del anillo
51	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFV QWLLNTC	Formación del anillo
52	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFV QWLLDTC	Formación del anillo
53	HXEGTFTSDYSIAM <u>D</u> <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFV NWLLAQC	Formación del anillo
54	HXEGTFTSDYSIAM <u>D</u> <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFV DWLLAEC	Formación del anillo
55	HXQGTFTSDYSIAM <u>D</u> <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFV NWLLAQC	Formación del anillo
56	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFV NWLLAQC	Formación del anillo
57	HXQGTFTSDYSIAM <u>D</u> <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFV NWLLNTC	Formación del anillo

SEQ ID NO	Secuencia	Información
58	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFV QWLLNTKC	Formación del anillo
59	CAXQGTFTSDYSICMD <u>E</u> KHQ <u>K</u> DF VNWLLNTK	Formación del anillo
60	CAXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> KHC <u>K</u> DF VNWLLNTK	Formación del anillo
61	CAXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IAC <u>K</u> DFV NWLLNTK	Formación del anillo
62	CAXQGTFTSDKSKYLDERAAQDF VQWLLDGGPSSGAPPPS	
63	CAXQGTFTSDCSKYLDERAAQDF VQWLLDGGPSSGAPPPS	
64	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CAAK <u>K</u> EFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
65	HXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
66	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> DFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
67	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CAAK <u>K</u> DFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
68	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KAA <u>K</u> EFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
69	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> RAA <u>K</u> EFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
70	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> DFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
71	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> RAC <u>K</u> DFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
72	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> RAA <u>K</u> DFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
73	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EF VQWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
74	CAXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EF VQWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
75	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAA <u>K</u> EFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
76	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> DFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
77	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAA <u>K</u> DFV QWLLDHPSSGQPPPS	Formación del anillo
78	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFV QWLLDTKC	Formación del anillo

SEQ ID NO	Secuencia	Información
79	H X E G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V N W L L A Q K C	Formación del anillo
80	H X E G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V D W L L A E K C	Formación del anillo
81	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R Q <u>K</u> E F V Q W L L N T C	Formación del anillo
82	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R Q <u>K</u> E F V Q W L L D T C	Formación del anillo
83	C A X E G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V N W L L A Q C	Formación del anillo
84	C A X E G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V D W L L A E C	Formación del anillo
85	C A X Q G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V N W L L A Q C	Formación del anillo
86	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R Q <u>K</u> E F V N W L L A Q C	Formación del anillo
87	C A X Q G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V N W L L N T C	Formación del anillo
88	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R Q <u>K</u> E F V Q W L L N T K C	Formación del anillo
89	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R Q <u>K</u> E F V Q W L L D T K C	Formación del anillo
90	C A X E G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V N W L L A Q K C	Formación del anillo
91	C A X E G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V D W L L A E K C	Formación del anillo
92	C A X Q G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V N W L L A Q K C	Formación del anillo
93	C A X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R Q <u>K</u> E F V N W L L A Q K C	Formación del anillo
94	C A X Q G T F T S D Y S I A M D <u>E</u> I H Q <u>K</u> D F V N W L L N T K C	Formación del anillo
95	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R A <u>K</u> E F V Q W L L C H H P S S G Q P P P S	Formación del anillo
96	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R A <u>K</u> E F V Q W L L D H C P S S G Q P P P S	Formación del anillo
97	Y X Q G T F T S D Y S K Y L D <u>E</u> K R A <u>K</u> E F V Q W L L D C H P S S G Q P P P S	Formación del anillo
98	Y X Q G T F T S D Y S K A L D <u>E</u> K A A <u>K</u> E F V N W L L D H H P S S G Q P P P S C	Formación del anillo
99	Y X Q G T F T S D Y S K A L D <u>E</u> K A A <u>K</u> D F V N W L L D H H P S S G Q P P P S C	Formación del anillo

SEQ ID NO	Secuencia	Información
100	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E <u>K</u> A A <u>K</u> E F V Q W L L D Q H P S S G Q P P P S C	Formación del anillo
101	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E <u>K</u> A A <u>K</u> E F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	Formación del anillo
102	Y X Q G T F T S D Y S K A L D E <u>K</u> A A <u>K</u> D F V N W L L D Q H P S S G Q P P P S C	Formación del anillo

En las secuencias descritas en la tabla 1, el aminoácido representado por X representa ácido aminoisobutírico (Aib), que es un aminoácido no natural, y los aminoácidos subrayados representan la formación de un anillo entre los aminoácidos subrayados. Además, en la tabla 1, CA representa 4-imidazoacetilo y Y representa tirosina.

Ejemplo 2: Preparación de conjugados de acción prolongada de agonistas triples

Para la pegilación del residuo de cisteína de los agonistas triples (SEQ ID NOS: 21, 22, 42, 43, 50, 77, y 96) del ejemplo 1 usando PEG (10 kDa) que tiene un grupo maleimida y un grupo aldehído en ambos extremos, respectivamente, por ejemplo, maleimida-PEG-aldehído (10 kDa, NOF, Japón), los agonistas triples y el maleimida-PEG-aldehído se hicieron reaccionar en un radio molar de 1 : 1 a 3, en una concentración de proteína de 1 mg/ml a 5 mg/ml a temperatura baja durante 0,5 a 3 horas. En particular, la reacción se llevó a cabo en un ambiente en el cual de 20 % a 60 % de isopropanol se añadió a Buffer Tris 50 Mm (pH 7,5). Luego de finalizar la reacción, los reactivos se aplicaron a SP sepharose HP (GE Healthcare, Estados Unidos) para purificar los agonistas triples, que es monopegilado en el residuo de cisteína del mismo.

Luego, los agonistas triples monopegilados purificados y una Fc de

inmunoglobulina se hicieron reaccionar en un radio molar de 1 : 1 a 5 en una concentración de proteína de 10 mg/ml a 50 mg/ml a 4 °C a 8 °C durante 12 horas a 18 horas. La reacción se llevó a cabo en un ambiente en el cual 10 mM a 50 mM de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3), por ejemplo, un agente reductor, y 10 % a 30 % de isopropanol se añadieron a 100 mM de manteca de fosfato de potasio (pH 6,0). Luego de finalizar la reacción, los reactivos se aplicaron a la columna de purificación de Butyl sepharose FF (GE Healthcare, Estados Unidos) y columna de purificación Source ISO (GE Healthcare, Estados Unidos) para purificar el conjugado incluyendo los agonistas triples y la Fc de inmunoglobulina.

Luego de la preparación, la pureza analizada mediante la cromatografía en fase inversa, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio iónico mostraron ser del 95 % o superior.

En particular, el conjugado en el cual el agonista triple de SEQ ID NO: 21 y una Fc de inmunoglobulina se conectaron mediante PEG se denominó “el conjugado que incluye el agonista triple de SEQ ID NO: 21 y una Fc de inmunoglobulina” o “conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 21”, y se pueden usar indistintamente en la presente invención.

En particular, el conjugado en el cual el agonista triple de SEQ ID NO: 22 y una Fc de inmunoglobulina se conectaron mediante PEG se denominó “el conjugado que incluye el agonista triple de SEQ ID NO: 22 y una Fc de inmunoglobulina” o “conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 22”, y se pueden usar indistintamente en la presente invención.

En particular, el conjugado en el cual el agonista triple de SEQ ID NO: 42 y una Fc de inmunoglobulina se conectaron mediante PEG se denominó “el

conjugado que incluye el agonista triple de SEQ ID NO: 42 y una Fc de inmunoglobulina” o “conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 42”, y se pueden usar indistintamente en la presente invención.

En particular, el conjugado en el cual el agonista triple de SEQ ID NO: 43 y una Fc de inmunoglobulina se conectaron mediante PEG se denominó “el conjugado que incluye el agonista triple de SEQ ID NO: 43 y una Fc de inmunoglobulina” o “conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 43”, y se pueden usar indistintamente en la presente invención.

En particular, el conjugado en el cual el agonista triple de SEQ ID NO: 50 y una Fc de inmunoglobulina se conectaron mediante PEG se denominó “el conjugado que incluye el agonista triple de SEQ ID NO: 50 y una Fc de inmunoglobulina” o “conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 50”, y se pueden usar indistintamente en la presente invención.

En particular, el conjugado en el cual el agonista triple de SEQ ID NO: 77 y una Fc de inmunoglobulina se conectaron mediante PEG se denominó “el conjugado que incluye el agonista triple de SEQ ID NO: 77 y una Fc de inmunoglobulina” o “conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 77”, y se pueden usar indistintamente en la presente invención.

En particular, el conjugado en el cual el agonista triple de SEQ ID NO: 96 y una Fc de inmunoglobulina se conectaron mediante PEG se denominó “el conjugado que incluye el agonista triple de SEQ ID NO: 96 y una Fc de inmunoglobulina” o “conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 96”, y se pueden usar indistintamente en la presente invención.

Ejemplo experimental 1: Medición de las actividades *in vitro* de los agonistas triples y conjugados de acción prolongada del mismo

Las actividades de los agonistas triples y los conjugados de acción prolongada del mismo preparados en los ejemplos 1 y 2 se midieron mediante un método de medición de actividad celular *in vitro* que usa líneas celulares, donde un receptor del GLP-1, un receptor del glucagón (GCG), y un receptor del GIP se transforman, respectivamente.

Cada una de las líneas de células anteriores es una en la cual los genes del receptor del GLP-1 humano, el receptor del GCG humano, y el receptor del GIP humano se transformaron en células derivadas del ovario de hámster chino (CHO), respectivamente, y se pueden expresar allí, y por lo tanto son aptas para la medición de las actividades del GLP-1, GCH y GIP. Por lo tanto, la actividad para cada parte se midió usando la respectiva línea celular transformada.

Para la medición de las actividades del GLP-1 de los agonistas triples y los conjugados de acción prolongada preparados en los ejemplos 1 y 2, el GLP-1 humano estuvo sujeto a una dilución en serie de 4 veces de 50 nM a 0,000048 nM, y los agonistas triples y los conjugados de acción prologada del mismo preparados en los ejemplos 1 y 2 estuvieron sujetos a una dilución en serie de 4 veces desde 400 nM a 0,00038 nM. La solución del cultivo se quitó de las células CHO cultivadas, en la cual se expresó el receptor del GLP-1 humano, y se añadió cada uno de los materiales diluidos en serie a las células CHO en una cantidad de 5 μ l, respectivamente. Luego, la solución amortiguadora que contiene anticuerpo AMPc se añadió allí en una cantidad de 5 μ l y se cultivó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, la mezcla de detección que contiene un amortiguador de lisis celular se añadió allí en una cantidad de 10 μ l y se cultivó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Los

lisados celulares, luego de completar la reacción, se aplicaron al conjunto AMPc LANCE (PerkinElmer, Estados Unidos) para calcular el valor EC_{50} mediante AMPc acumulado, y los valores se compararon entre sí. Las potencias relativas comparadas con el GLP-1 humano se muestran en las
5 tablas 2 y 3 a continuación.

Para la medición de las actividades del GCG de los agonistas triples y los conjugados de acción prolongada preparados en los ejemplos 1 y 2 el GCG humano estuvo sujeto a una dilución en serie de 4 veces de 50 nM a 0,000048 nM, y los agonistas triples y los conjugados de acción prologada del mismo
10 preparados en los ejemplos 1 y 2 estuvieron sujetos a una dilución en serie de 4 veces desde 400 nM a 0,00038 nM. La solución del cultivo se quitó de las células CHO cultivadas, en la cual se expresó el receptor del GCG humano, y se añadió cada uno de los materiales diluidos en serie a las células CHO en una cantidad de 5 μ l, respectivamente. Luego, la solución amortiguadora que
15 contiene anticuerpo AMPc se añadió allí en una cantidad de 5 μ l y se cultivó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, la mezcla de detección que contiene un amortiguador de lisis celular se añadió allí en una cantidad de 10 μ l y se cultivó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Los lisados celulares, luego de completar la reacción, se aplicaron al conjunto AMPc LANCE
20 (PerkinElmer, Estados Unidos) para calcular el valor EC_{50} mediante AMPc acumulado, y los valores se compararon entre sí. Las potencias relativas comparadas con el GCG humano se muestran en las tablas 2 y 3 a continuación.

Para la medición de las actividades del GIP de los agonistas triples y los
25 conjugados de acción prolongada preparados en los ejemplos 1 y 2, el GIP

humano estuvo sujeto a una dilución en serie de 4 veces de 50 nM a 0,000048 nM, y los agonistas triples y los conjugados de acción prolongada del mismo preparados en los ejemplos 1 y 2 estuvieron sujetos a una dilución en serie de 4 veces desde 400 nM a 0,00038 nM. La solución del cultivo se quitó de las células CHO cultivadas, en la cual se expresó el receptor del GIP humano, y se añadió cada uno de los materiales diluidos en serie a las células CHO en una cantidad de 5 µl, respectivamente. Luego, la solución amortiguadora que contiene anticuerpo AMPc se añadió allí en una cantidad de 5 µl y se cultivó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, la mezcla de detección que contiene un amortiguador de lisis celular se añadió allí en una cantidad de 10 µl y se cultivó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Los lisados celulares, luego de completar la reacción, se aplicaron al conjunto AMPc LANCE (PerkinElmer, Estados Unidos) para calcular el valor EC₅₀ mediante AMPc acumulado, y los valores se compararon entre sí. Las potencias relativas comparadas con el GIP humano se muestran en las tablas 2 y 3 a continuación.

[Tabla 2] Radio de potencia relativa de los agonistas triples

SEQ ID NO	Actividad <i>in vitro</i> comparada con el péptido nativo (%)		
	vs. GLP-1	vs. Glucagón	vs. GIP
1	3,2	< 0,1	< 0,1
2	5,9	< 0,1	< 0,1
3	1,8	< 0,1	< 0,1
4	8,5	< 0,1	< 0,1
5	42,1	< 0,1	< 0,1
6	17,0	< 0,1	< 0,1
7	13,7	< 0,1	< 0,1

	Actividad <i>in vitro</i> comparada con el péptido nativo (%)		
SEQ ID NO	vs. GLP-1	vs. Glucagón	vs. GIP
8	14,2	0,10	< 0,1
9	32,1	0,13	< 0,1
10	46,0	< 0,1	< 0,1
11	1,4	< 0,1	< 0,1
12	0,4	< 0,1	< 0,1
13	< 0,1	< 0,1	< 0,1
14	28,0	< 0,1	< 0,1
15	79,2	< 0,1	< 0,1
16	2,1	< 0,1	< 0,1
17	0,2	< 0,1	< 0,1
18	< 0,1	< 0,1	< 0,1
19	< 0,1	< 0,1	< 0,1
20	< 0,1	< 0,1	< 0,1
21	17,8	267	22,7
22	20,1	140	59,7
23	4,01	9,3	< 0,1
24	41,2	9,3	< 0,1
25	82,6	0,1	< 0,1
26	64,5	0,2	< 0,1
27	83,1	0,8	0,9
28	17,2	1,6	< 0,1
29	38,5	6,0	< 0,1
30	142	0,7	0,8

	Actividad <i>in vitro</i> comparada con el péptido nativo (%)		
SEQ ID NO	vs. GLP-1	vs. Glucagón	vs. GIP
31	135	2,2	2,4
32	151	1,7	8,8
33	24,5	< 0,1	10,4
34	19,1	0,92	0,6
35	7,5	< 0,1	1,3
36	37,4	0,39	0,2
37	236	6,21	2,2
38	2,3	-	-
39	13,9	0,53	< 0,1
40	75,2	< 0,1	< 0,1
41	34,3	< 0,1	< 0,1
42	33,9	205,8	7,8
43	12,6	88,4	3,70
44	1,3	< 0,1	< 0,1
45	6,6	< 0,1	< 0,1
46	1,4	< 0,1	< 0,1
47	2,4	< 0,1	< 0,1
48	1,5	< 0,1	< 0,1
49	29,8	< 0,1	3,3
50	67,4	50,5	2,7
51	14,4	2,0	0,1
52	44,1	7,5	0,3
53	161	8,4	1,3

	Actividad <i>in vitro</i> comparada con el péptido nativo (%)		
SEQ ID NO	vs. GLP-1	vs. Glucagón	vs. GIP
54	30,6	1,4	0,1
55	27,1	0,7	2,4
56	57,9	4,9	0,8
57	11,7	< 0,1	0,3
58	39,1	2,6	0,2
59	40,3	< 0,1	4,0
60	106,2	< 0,1	8,2
61	59,8	< 0,1	2,8
62	5,2	< 0,1	< 0,1
63	15,3	< 0,1	< 0,1
64	64,6	60,1	92,9
65	95,4	25,2	11,6
66	15,8	172	17,2
67	28,5	46,2	39,8
68	27,9	8,8	107
69	24,3	9,6	62,8
70	15,1	71,3	64,4
71	90,1	12,7	94,7
72	11,5	1,0	1,6
73	22,6	5,4	3,0
74	12,9	0,9	1,0
75	35,1	8,5	18,0
76	10,3	47,6	11,7

	Actividad <i>in vitro</i> comparada con el péptido nativo (%)		
SEQ ID NO	vs. GLP-1	vs. Glucagón	vs. GIP
77	38,7	12,2	35,5
78	51,0	14,0	0,12
79	41,5	4,9	1,4
80	8,1	0,0	0,1
81	7,8	0,3	< 0,1
82	9,5	1,1	< 0,1
83	47,3	1,3	0,4
84	4,2	< 0,1	< 0,1
85	4,3	< 0,1	0,3
86	28,4	0,4	0,2
87	0,9	< 0,1	< 0,1
88	9,6	0,3	< 0,1
89	7,1	0,7	< 0,1
90	7,4	< 0,1	< 0,1
91	31,9	16,8	0,3
92	0,8	< 0,1	0,4
93	5,7	0,3	0,7
94	0,5	< 0,1	< 0,1
95	2,1	0,4	< 0,1
96	34,4	194,8	5,2
97	10,5	62,8	2,6
98	28,1	8,2	47,1
99	20,9	14,9	57,7

	Actividad <i>in vitro</i> comparada con el péptido nativo (%)		
SEQ ID NO	vs. GLP-1	vs. Glucagón	vs. GIP
100	42,2	12,7	118,5
101	23,2	13,9	40,1
102	23,3	29,5	58,0

[Tabla 3] Radio de potencia relativa de los conjugados de acción prolongada de los agonistas triples

Conjugados de acción prolongada	Actividad <i>in vitro</i> comparada con el péptido nativo (%)		
	vs. GLP-1	vs. Glucagón	vs. GIP
21	0,1	1,6	0,2
22	0,1	0,9	0,5
42	3,1	23,1	1,2
43	2,1	13,5	0,6
50	15,4	6,9	0,7
77	6,7	1,7	6,6
96	0,3	4,0	0,3

- 5 Los conjugados de acción prolongada de los agonistas triples preparados anteriormente tienen la función de los agonistas triples que pueden accionar todos los receptores del GLP-1, los receptores del GIP y los receptores del glucagón, y por lo tanto los conjugados de acción prolongada de agonistas triples se pueden usar como un material terapéutico para tratar

pacientes con síndrome metabólico incluida la diabetes y la obesidad.

Ejemplo experimental 2: Medición de las actividades *in vitro* de los conjugados de acción prolongada de los agonistas triples

En este experimento, se usaron ratones con obesidad inducida mediante una dieta rica en grasas, estos animales son muy utilizados como modelos de animales obesos. El peso corporal de los ratones antes de la administración era de un rango de aproximadamente 40 g a 60 g. Los ratones estaban alojados en grupo durante el experimento y se les otorgó acceso al agua *ad libitum*. No se proporcionaba luz entre las 6 a.m. y 6 p.m.

Los grupos de prueba alimentados con una dieta rica en grasas incluía: Grupo 1, con un excipiente (una inyección cada 2 días) - grupo de control; grupo 2, el conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 42 a 1,44 nmol/kg (una inyección cada 2 días); grupo 3, el conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 42 a 2,88 nmol/kg (una inyección cada 2 días); grupo 4, el conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 43 a 1,44 nmol/kg (una inyección cada 2 días); grupo 5, el conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 43 a 2,88 nmol/kg (una inyección cada 2 días); grupo 6, el conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 50 a 1,44 nmol/kg (una inyección cada 2 días); grupo 7, el conjugado de acción prolongada de SEQ ID NO: 50 a 2,88 nmol/kg (una inyección cada dos días). El experimento finalizó el día 28, y los cambios en el peso corporal de los ratones en cada grupo se midieron con intervalos de 2 días durante el progreso del experimento. Luego de la finalización del experimento, la cantidad de grasa mesentérica se midió mediante una autopsia. Se realizó un análisis estadístico para comparar entre el grupo de control y los grupos de prueba mediante el análisis de varianza con

un factor (ANOVA).

Como resultado de la medición de cambios en el peso corporal, según se puede confirmar en la FIG. 1, todos los grupos que se administraron con una dosis alta del conjugado de acción prolongada de SEQ ID NOS: 42, 43, y 50 mostraron una disminución en el peso corporal del 56,9 %, 57,0 %, y 63,5 %, respectivamente, comparada con aquella antes de la administración.

Además, como resultado de la medición de cambios en el peso corporal, según se puede confirmar en la FIG. 2, todos los grupos que se administraron con una dosis alta del conjugado de acción prolongada de SEQ ID NOS: 42, 43, y 50 mostraron una disminución significativa en la grasa corporal, comparado con el grupo que se administró con un excipiente.

A partir de lo anterior, un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención será capaz de entender que la presente invención se puede realizar de otras formas específicas sin modificar los conceptos técnicos o características esenciales de la presente invención. En este sentido, las realizaciones ejemplares divulgadas en el presente documento son sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención. Por el contrario, la presente invención está destinada a cubrir no sólo las realizaciones ejemplares, sino también varias alternativas, modificaciones, equivalentes y otras realizaciones que pueden estar incluidas dentro del espíritu y alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado representado por la Fórmula Química 1 a continuación:
[Fórmula Química 1]
5 X - La - F
en la que,
X es un péptido que tiene actividades en un receptor del glucagón, un péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y un receptor polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP);
10 L es un conector;
a es 0 o un entero positivo, con la condición que cuando a es 2 o mayor, cada L es independiente una de otra; y
F es un material que puede aumentar la vida media de X.
- 15 2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que X es un análogo del glucagón nativo con una variación seleccionada del grupo que consiste en sustitución, adición, eliminación, modificación y una combinación de los mismos, en al menos un aminoácido de la secuencia del glucagón nativo.
- 20 3. El conjugado de la reivindicación 2, en el que la secuencia del aminoácido con adición deriva de una secuencia del aminoácido GLP-1 nativo, una secuencia del aminoácido GIP nativo, o una secuencia del aminoácido exendina-4 nativo.
- 25 4. El conjugado de la reivindicación 1, en el que X es un péptido que

comprende una secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General 1 a continuación:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-

5 Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-Xaa30-R1 (Fórmula General 1, SEQ ID NO: 103)

en el que, en la Fórmula General 1,

Xaa1 es histidina (His, H), 4-imidazoacetilo (CA), o tirosina (Tyr, Y);

Xaa2 es glicina (Gly, G), ácido α -metil-glutámico, o ácido aminoisobutírico (Aib);

10 Xaa3 es ácido glutámico (Glu, E) o glutamina (Gln, Q);

Xaa7 es treonina (Thr, T) o isoleucina (Ile, I);

Xaa10 es leucina (Leu, L), tirosina (Tyr, Y), lisina (Lys, K), cisteína (Cys, C) o valina (Val, V);

Xaa12 es lisina (Lys, K), serina (Ser, S) o isoleucina (Ile, I);

15 Xaa13 es glutamina (Gln, Q), tirosina (Tyr, Y), alanina (Ala, A) o cisteína (Cys, C);

Xaa14 es leucina (Leu, L), metionina (Met, M), o tirosina (Tyr, Y);

Xaa15 es cisteína (Cys, C), ácido aspártico (Asp, D), ácido glutámico (Glu, E) o leucina (Leu, L);

20 Xaa16 es glicina (Gly, G), ácido glutámico (Glu, E) o serina (Ser, S);

Xaa17 es glutamina (Gln, Q), arginina (Arg, R), isoleucina (Ile, I), ácido glutámico (Glu, E), cisteína (Cys, C), o lisina (Lys, K);

Xaa18 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), arginina (Arg, R), o histidina (His, H);

25 Xaa19 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), cisteína (Cys, C), o valina

(Val, V);

Xaa20 es lisina (Lys, K), glutamina (Gln, Q), o arginina (Arg, R);

Xaa21 es ácido glutámico (Glu, E), glutamina (Gln, Q), leucina (Leu, L),
cisteína (Cys, C), o ácido aspártico (Asp, D);

5 Xaa23 es isoleucina (Ile, I) o valina (Val, V);

Xaa24 es alanina (Ala, A), glutamina (Gln, Q), cisteína (Cys, C),
asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), o ácido glutámico (Glu, E);

Xaa27 es valina (Val, V), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), o metionina
(Met, M);

10 Xaa28 es cisteína (Cys, C), lisina (Lys, K), alanina (Ala, A), asparagina
(Asn, N), o ácido aspártico (Asp, D);

Xaa29 es cisteína (Cys, C), glicina (Gly, G), glutamina (Gln, Q), treonina
(Thr, T), ácido glutámico (Glu, E), o histidina (His, H);

Xaa30 es cisteína (Cys, C), glicina (Gly, G), lisina (Lys, K), o histidina
15 (His, H), o está ausente; y

R1 es cisteína (Cys, C), GKKNDWKHNIT (SEQ ID NO: 106), m-
SSGAPPPS-n (SEQ ID NO: 107), o m-SSGQPPPS-n (SEQ ID NO: 108), o está
ausente;

en la que:

20 m es -Cys-, -Pro-, o -Gly-Pro-; y

n es -Cys-, -Gly-, -Ser-, o -His-Gly-, o está ausente.

5. El conjugado de la reivindicación 4,
en el que Xaa14 es leucina o metionina; y

25 Xaa15 es cisteína, ácido aspártico, o leucina.

6. El conjugado de la reivindicación 4,
 en el que, en la Fórmula General 1,
 Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;
 Xaa7 es treonina,
 5 Xaa10 es tirosina, cisteína, o valina;
 Xaa12 es lisina o isoleucina;
 Xaa13 es tirosina, alanina, glutamina, o cisteína;
 Xaa14 es leucina, cisteína, o metionina;
 Xaa15 es cisteína, leucina, ácido glutámico, o ácido aspártico;
 10 Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, cisteína, ácido glutámico, o
 lisina;
 Xaa18 es alanina, glutamina, arginina, o histidina;
 Xaa19 es alanina, glutamina, valina, o cisteína;
 Xaa20 es lisina, arginina, o glutamina;
 15 Xaa21 es ácido glutámico, glutamina, leucina, cisteína, o ácido
 aspártico;
 Xaa23 es isoleucina valina;
 Xaa24 es cisteína, alanina, glutamina, asparagina, ácido glutámico, o
 ácido aspártico; y
 20 Xaa27 es leucina o lisina.

7. El conjugado de la reivindicación 4, en el que X es un péptido que
 comprende una secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General
 2 a continuación:
 25 Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-

Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-
 Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31- Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-
 Xaa40 (Fórmula General 2, SEQ ID NO: 104)

en el que, en la Fórmula General 2,

- 5 Xaa1 es 4-imidazoacetilo, histidina, o tirosina;
 Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;
 Xaa10 es tirosina o cisteína;
 Xaa13 es alanina, glutamina, tirosina, o cisteína;
 Xaa14 es leucina, metionina, o tirosina;
- 10 Xaa15 es ácido aspártico, ácido glutámico, o leucina;
 Xaa16 es glicina, ácido glutámico, o serina;
 Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, ácido glutámico, cisteína, o
 lisina;
 Xaa18 es alanina, glutamina, arginina, o histidina;
- 15 Xaa19 es alanina, glutamina, cisteína, o valina;
 Xaa20 es lisina, glutamina, o arginina;
 Xaa21 es cisteína, ácido glutámico, glutamina, leucina, o ácido
 aspártico;
 Xaa23 es isoleucina valina;
- 20 Xaa24 es cisteína, alanina, glutamina, asparagina, o ácido glutámico;
 Xaa28 es lisina, cisteína, asparagina, o ácido aspártico;
 Xaa29 es glicina, glutamina, cisteína, o histidina;
 Xaa30 es cisteína, glicina, lisina, o histidina;
 Xaa31 es prolina o cisteína; y
- 25 Xaa40 es cisteína o está ausente.

8. El conjugado de la reivindicación 4,
en el que, en la Fórmula General 1,
Xaa2 es glicina, ácido α -metil-glutámico, o Aib;
Xaa7 es treonina;
- 5 Xaa10 es tirosina, cisteína, o valina;
Xaa12 es lisina o isoleucina;
Xaa13 es tirosina, alanina, o cisteína;
Xaa14 es leucina o metionina;
Xaa15 es cisteína o ácido aspártico;
- 10 Xaa17 es glutamina, arginina, isoleucina, cisteína, o lisina;
Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;
Xaa19 es alanina, glutamina, o cisteína;
Xaa20 es lisina o glutamina;
Xaa21 es ácido glutámico, cisteína, o ácido aspártico;
- 15 Xaa23 es valina;
Xaa24 es alanina, glutamina, cisteína, asparagina, o ácido aspártico; y
Xaa27 es leucina o lisina.
9. El conjugado de la reivindicación 7,
en el que, en la Fórmula General 2,
- 20 Xaa13 es alanina, tirosina, o cisteína;
Xaa15 es ácido aspártico o ácido glutámico;
Xaa17 es glutamina, arginina, cisteína, o lisina;
Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;
- 25 Xaa21 es cisteína, ácido glutámico, glutamina, o ácido aspártico;

- Xaa23 es isoleucina valina;
- Xaa24 es cisteína, glutamina, o asparagina;
- Xaa28 es cisteína, asparagina, o ácido aspártico;
- Xaa29 es glutamina, cisteína, o histidina; y
- 5 Xaa30 es cisteína, lisina, o histidina.
10. El conjugado de la reivindicación 4,
- en el que, en la Fórmula General 1,
- Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;
- 10 Xaa7 es treonina;
- Xaa10 es tirosina o cisteína;
- Xaa12 es lisina o isoleucina;
- Xaa13 es tirosina, alanina, o cisteína;
- Xaa14 es leucina o metionina;
- 15 Xaa15 es cisteína o ácido aspártico;
- Xaa16 es ácido glutámico;
- Xaa17 es arginina, isoleucina, cisteína, o lisina;
- Xaa18 es alanina, arginina, o histidina;
- Xaa19 es alanina, glutamina, o cisteína;
- 20 Xaa20 es lisina o glutamina;
- Xaa21 es ácido glutámico o ácido aspártico;
- Xaa23 es valina;
- Xaa24 es glutamina, asparagina, o ácido aspártico;
- Xaa27 es leucina; y
- 25 Xaa28 es cisteína, alanina, asparagina, o ácido aspártico.

11. El conjugado de la reivindicación 4,
en el que, en la Fórmula General 1,
Xaa1 es histidina o 4-imidazoacetilo;
Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;
5 Xaa3 es glutamina;
Xaa7 es treonina;
Xaa10 es tirosina;
Xaa12 es isoleucina;
Xaa13 es alanina o cisteína;
10 Xaa14 es metionina;
Xaa15 es ácido aspártico;
Xaa16 es ácido glutámico;
Xaa17 es isoleucina o lisina;
Xaa18 es alanina o histidina;
15 Xaa19 es glutamina o cisteína;
Xaa20 es lisina;
Xaa21 es ácido aspártico;
Xaa23 es valina;
Xaa24 es asparagina;
20 Xaa27 es leucina;
Xaa28 es alanina o asparagina;
Xaa29 es glutamina o treonina; y
Xaa30 es cisteína o lisina, o está ausente.
- 25 12. El conjugado de la reivindicación 4,

en el que X es un péptido que comprende una secuencia de aminoácido representada por la Fórmula General 3 a continuación:

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-Glu-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-

5 Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (Fórmula General 3, SEQ ID NO: 105)

en el que, en la Fórmula General 3,

Xaa1 es histidina o tirosina;

Xaa2 es ácido α -metil-glutámico o Aib;

10 Xaa13 es alanina, tirosina, o cisteína;

Xaa17 es arginina, cisteína, o lisina;

Xaa18 es alanina o arginina;

Xaa19 es alanina o cisteína;

Xaa21 es ácido glutámico o ácido aspártico;

15 Xaa24 es glutamina o asparagina;

Xaa28 es cisteína o ácido aspártico;

Xaa29 es cisteína, histidina, o glutamina;

Xaa30 es cisteína o histidina;

Xaa31 es prolina o cisteína; y

20 Xaa40 es cisteína o está ausente.

13. El conjugado de la reivindicación 4, en el que R1 es cisteína, GKKNDWKHNIT (SEQ ID NO: 106), CSSGQPPPS (SEQ ID NO: 109), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 110), GPSSGAPPPSC (SEQ ID NO: 111),
25 PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 112), PSSGAPPPSG (SEQ ID NO: 113),

PSSGAPPPSHG (SEQ ID NO: 114), PSSGAPPPSS (SEQ ID NO: 115), PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 116), o PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 117), o está ausente.

5 14. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en las Fórmulas Generales 1 a 3, el aminoácido 16 y el aminoácido 20 del extremo N-terminal juntos forman un anillo.

15 15. El conjugado de la reivindicación 1, en el que X es un péptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1 a 102.

15 16. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en el que F se selecciona del grupo que consiste en un polímero, ácido graso, colesterol, albúmina y un fragmento de los mismos, un material de unión de albúmina, un polímero de unidades de repetición de secuencias de aminoácido particulares, un anticuerpo, un fragmento del anticuerpo, un material de unión del FcRn, un tejido conjuntivo *in vivo*, un nucleótido, fibronectina, transferrina, un sacárido, heparina, y elastina.

20

17. El conjugado de la reivindicación 16, en el que el polímero se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, propilenglicol, un copolímero de propilenglicol - etilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol de polivinilo, polisacárido, dextrano, polivinil éter etílico, un polímero biodegradable, un polímero lípido, quitinas, ácido hialurónico, un

25

oligonucleótido y una combinación de los mismos.

18. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que F es una región Fc de inmunoglobulina.

5

19. El conjugado de la reivindicación 18, en el que F es una región Fc IgG.

20. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que L es un péptido, ácido graso, un sacárido, un polímero, un compuesto de peso molecular bajo, un nucleótido, y una combinación de los mismos.

10

21. El conjugado de la reivindicación 20, en el que el polímero se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, propilenglicol, un copolímero de propilenglicol - etilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol de polivinilo, polisacárido, dextrano, polivinil éter etílico, un polímero biodegradable, un polímero lípido, quitinas, ácido hialurónico, un oligonucleótido y una combinación de los mismos.

15

22. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que L es polietilenglicol.

20

23. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar el síndrome metabólico que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

25

24. La composición farmacéutica de la reivindicación 23, en la que el síndrome metabólico comprende intolerancia a la glucosa, hipercolesterolemia, dislipidemia, obesidad, diabetes, hipertensión, arteriosclerosis debido a la dislipidemia, aterosclerosis, arteriosclerosis, o cardiopatía coronaria.

RESUMEN**CONJUGADO DE ACCIÓN PROLONGADA DEL AGONISTA TRIPLE
RECEPTOR DEL GLUCAGÓN /GLP-1/GIP**

5

La presente invención se refiere a un conjugado de acción prolongada de un agonista triple que tiene actividades en cada uno del receptor de glucagón, GLP-1, y GIP, y uso del mismo.

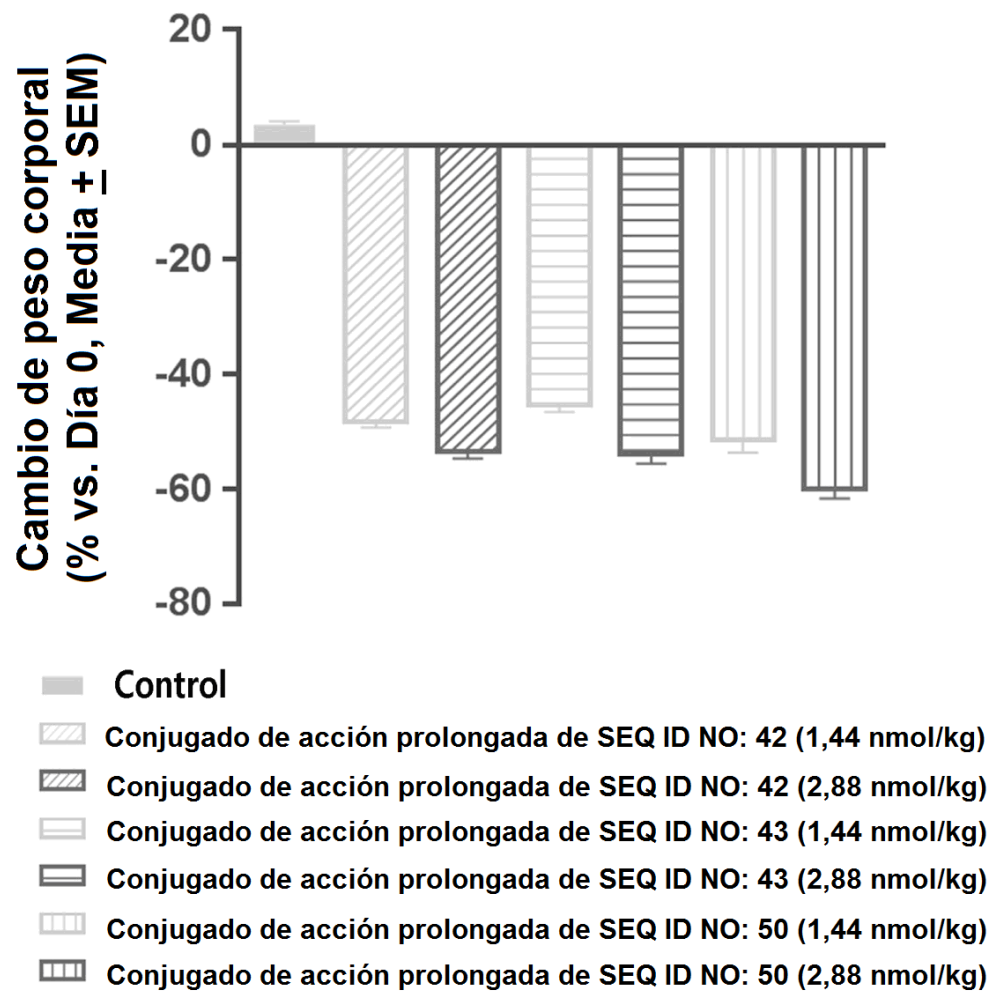
[Dibujo representativo]

10

FIG. 1

[DIBUJOS]

[FIG. 1



[FIG. 2]

