

MEMORIA DESCRIPTIVA

Campo técnico

La presente divulgación pertenece al campo técnico de la medicina, específicamente a un polipéptido representado por la fórmula I, un agonista dual del receptor de GIP y GLP-1, una composición farmacéutica y el uso de la misma para evitar y/o tratar enfermedades asociadas con trastornos metabólicos.

Estado del arte

La obesidad y diabetes son crecientes problemas de salud globales que se asocian con diferentes enfermedades como las enfermedades cardiovasculares (CVDs), la apnea de sueño primaria obstructiva, accidentes cerebrovasculares, enfermedades arteriales periféricas, complicaciones microvasculares, osteoartritis, *etc.* Por tanto, desarrollar una nueva terapia y fármaco terapéutico para la obesidad, diabetes y complicaciones de las mismas es de la mayor importancia para mejorar la salud humana.

El péptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP) es un péptido regulador gastrointestinal compuesto de 42 aminoácidos que juega un rol fisiológico en la homeostasis de la glucosa estimulando la secreción de insulina desde las células β pancreáticas en presencia de la glucosa y protegiendo las células β pancreáticas. El péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1) es un péptido compuesto de 37 aminoácidos que estimula la secreción de insulina, protege las células β pancreáticas e inhibe la secreción de glucagón, el vaciado gástrico y la ingesta de alimentos, llevando por tanto a la pérdida de peso corporal. Los GIP y GLP-1 son secretados por células K y células L del endotelio del intestino delgado, respectivamente y se les conoce como incretinas. Las señales del receptor de incretina juegan un rol fisiológicamente relevante clave en la homeostasis de la glucosa.

Los GIP y GLP-1 producen efectos fisiológicos correspondientes enlazándose a receptores específicos de los mismos y se enlazan al receptor del GIP (GIPR) y receptor del GLP-1 (GLP-1R) respectivamente. Los dos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. En la fisiología normal, los GIP y

GLP-1 son secretados por los intestinos después de las comidas y las incretinas mejoran las respuestas fisiológicas a los alimentos, incluyendo la inducción de la saciedad, así como promoviendo la secreción de insulina, protegiendo a las células β pancreáticas y permitiendo la distribución de los nutrientes. Se ha descubierto que los pacientes con diabetes de tipo 2 muestran deterioro en la respuesta ante la incretina.

A pesar de que tanto el GIP como el GLP-1 tienen una potencial actividad antidiabética, se ha descubierto que la administración del análogo de GLP-1 tiene un efecto limitado debido a efectos secundarios como la náusea y vómito y por tanto es frecuente que su administración no logre un control glucémico completo ni pérdida de peso corporal. El GIP por sí solo tiene una capacidad muy limitada para disminuir la glucosa en pacientes con diabetes de tipo 2. Tanto el GIP nativo como el GLP-1 nativo pueden ser rápidamente inactivados por la proteasa DPP IV presente y por tanto solo pueden ser usados para el control metabólico de corto plazo.

Generalmente un paciente diabético puede desarrollar tolerancia al GIP e incluso el GIP sobre el nivel fisiológico puede tener poco efecto hipoglucemiante. Sin embargo, el caso del GLP-1 es diferente y la mayoría de los pacientes diabéticos mantienen la sensibilidad al GLP-1. La relación entre el GIP y GLP-1 es similar a la de las dos otras importantes hormonas, insulina y leptina. Los pacientes diabéticos son sensibles a la insulina, pero los pacientes obesos son resistentes a la leptina. Por tanto, aunque el campo del GLP-1 se encuentra en alza y el GLP-1 se ha convertido en la clase más importante de fármacos hipoglucemiantes, el desarrollo del GIP ha sido muy lento. Los estudios han demostrado que si el azúcar en sangre se reduce a un cierto nivel, puede recuperarse la sensibilidad al GIP, lo que indica que la coactivación del GLP-1R/GIPR puede ejercer un efecto hipoglucemiante sinérgico y que el agonista dual del receptor de GIP y GLP-1 puede producir un mucho mejor efecto hipoglucemiante y de estimulación de la secreción de insulina.

El documento del anterior estado del arte WO 2016111971 A1 muestra un agonista dual de GIP/GLP, LY3298176. El LY3298176 cuenta principalmente con la secuencia de aminoácidos del GIP y la lisina en la posición 20 es modificada por medio de la modificación del fármaco GLP-1. En la actualidad, LY3298176 se encuentra en medio de un ensayo clínico de fase II de eficacia hipoglucémica y de

pérdida de peso corporal y los resultados han demostrado que la eficacia y tolerabilidad mejoran cuando la dosis inicial es baja y el incremento de dosis subsecuente es pequeño. Además, que después de solo 8 semanas de tratamiento, los pacientes con diabetes de tipo 2 muestran reducciones significativas en A1C y peso corporal.

Este es un problema importante que requiere de una solución urgente en el arte para desarrollar un agonista dual del receptor de GIP y GLP-1 con una nueva estructura que proporcione un nuevo método de tratamiento seguro y efectivo para la obesidad, la diabetes y las complicaciones de las mismas.

Resumen de la invención

Problemas que resolverá la invención

En vista de los problemas existentes en el arte anterior; por ejemplo, las muchas limitaciones en las perspectivas de aplicación terapéutica de la administración de GIP o GLP-1 solos como fármaco antidiabético, la presente divulgación muestra un compuesto con una nueva estructura representada por la fórmula I, que cuenta tanto con la actividad agonista del GLP-1R como la actividad agonista del GIPR. Como agonista dual del receptor de GLP-1 y GIP, el compuesto muestra un excelente efecto hipoglucemiante y tiene buenas perspectivas de aplicación clínica.

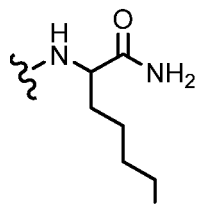
Solución a los problemas

La presente divulgación proporciona primero un compuesto representado por la fórmula I o una sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o un profármaco del mismo farmacéuticamente aceptables:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-A₄₀

I;

donde, A₄₀ es la siguiente estructura que se conecta a Ser por medio de un enlace peptídico:



A_{40} es

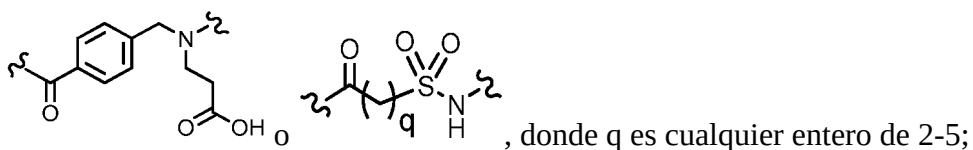
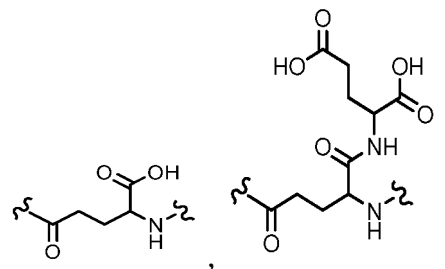
R_1 es $-(Z_1)_m-(Z_2)_n-C(=O)-(CH_2)_6-C(=O)-Z_3$;

m es 0 o 1;

si está presente, Z_1 es $-C(=O)-(CH_2)_r-(Z_4)_p-NH-$, donde p es cualquier entero de 4-8, siendo cada Z_4 independientemente $-O-CH_2-CH_2-$ o $-NH-C(=O)-CH_2-$ y r es 1 o 2;

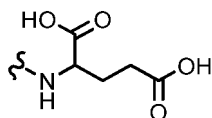
n es cualquier entero de 0-2;

si está presente, cada Z_2 es independientemente



o es cualquier entero de 14-18, preferiblemente 18;

y Z_3 es un hidroxilo o

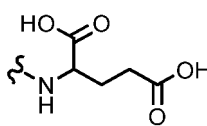


En la presente divulgación, la secuencia de aminoácidos desde la posición 1 a la 39 (Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser) en el compuesto representado por la fórmula se muestra en SEQ ID NO:1.

En una implementación, la presente divulgación muestra el compuesto o la sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación, donde,

R_1 es $-C(=O)-(CH_2)_o-C(=O)-Z_3$;

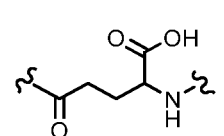
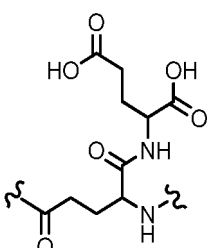
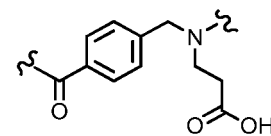
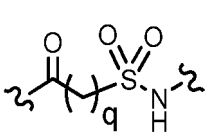
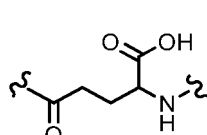
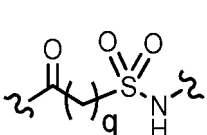
o es cualquier entero de 14 a 18, preferentemente 18;

y Z_3 es un hidroxilo o , preferentemente hidroxilo.

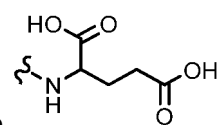
En una implementación, la presente divulgación muestra el compuesto o sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación, donde,

R_1 es $-Z_1-Z_2-C(=O)-(CH_2)_o-C(=O)-Z_3$;

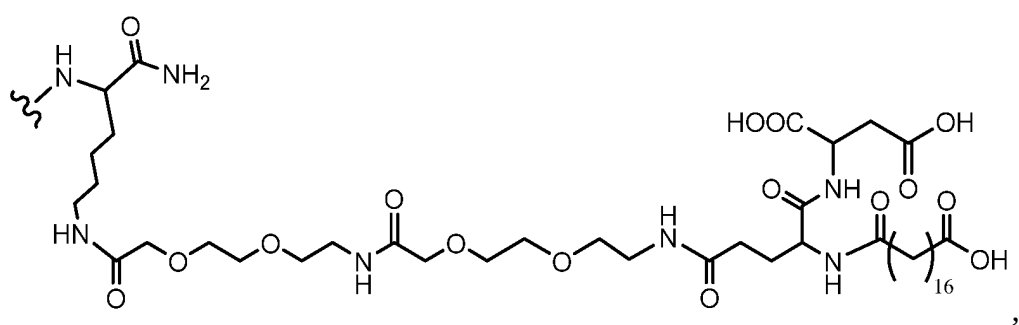
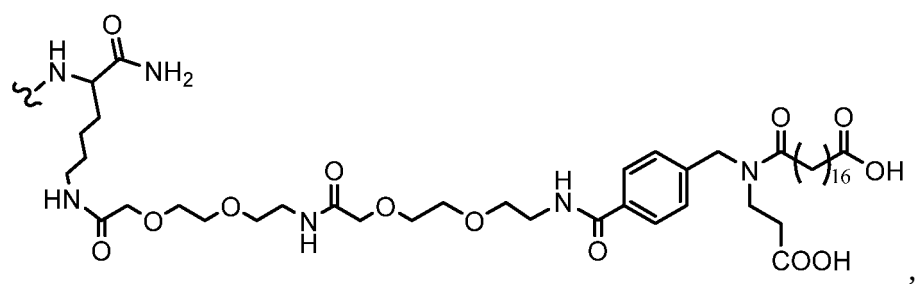
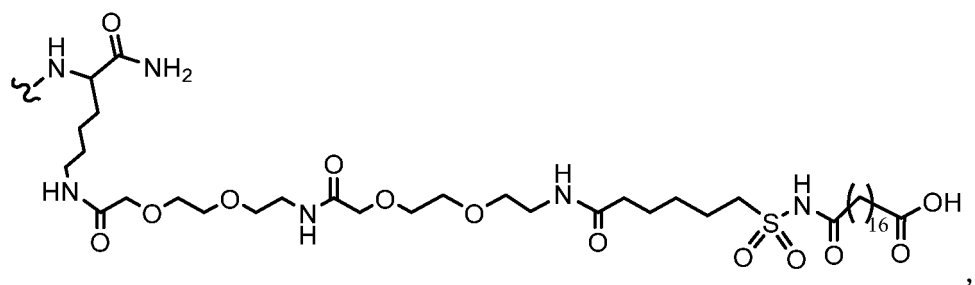
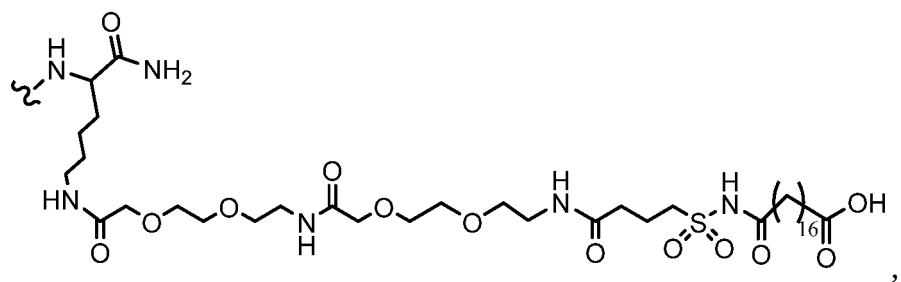
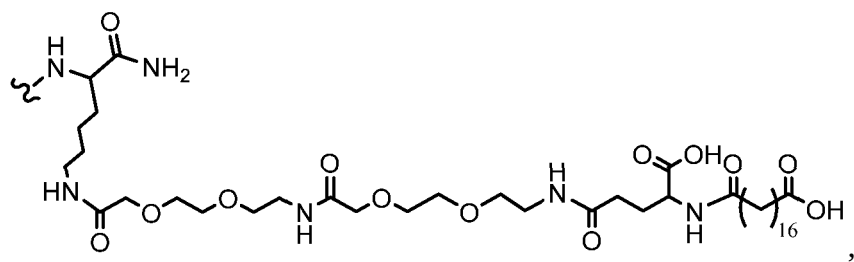
Z_1 es $-C(=O)-CH_2-(Z_4)_7-NH-$, donde cada Z_4 es independientemente $-O-CH_2-CH_2-$ o $-NH-C(=O)-CH_2-$, preferiblemente $-(Z_4)_7-$ es $-(O-CH_2-CH_2)_3-(NH-C(=O)-CH_2)-(O-CH_2-CH_2)_3-$ o $-(O-CH_2-CH_2)_7-$;

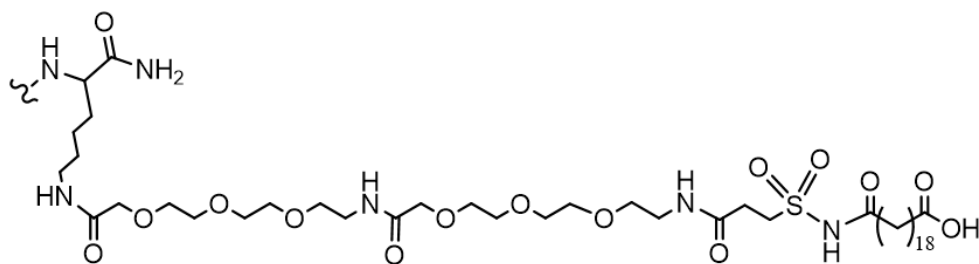
Z_2 es , ,  o , preferiblemente  o , donde q es cualquier entero del 2 al 5, preferiblemente 2;

o es cualquier entero de 14 a 18;

y Z_3 es hidroxilo o , preferiblemente hidroxilo.

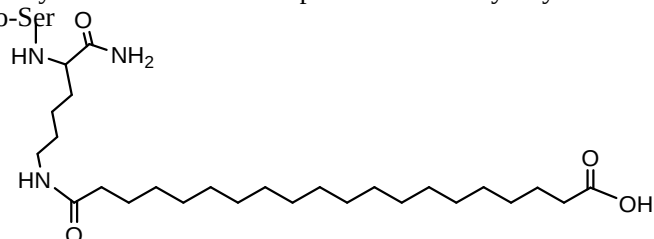
en una implementación, la presente divulgación muestra el compuesto o la sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación, donde A_{40} es seleccionado desde una estructura representada por uno de los siguientes:





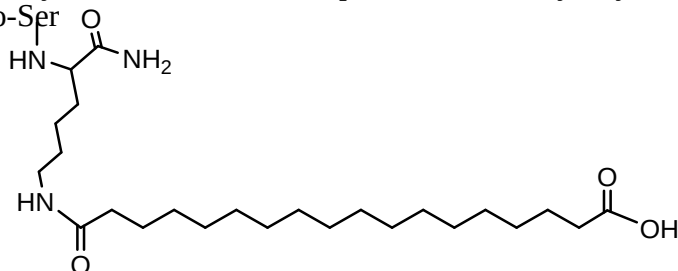
La presente divulgación además muestra un compuesto representado por cualquiera de las siguientes fórmulas I-1 - I-14 o una sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptables:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



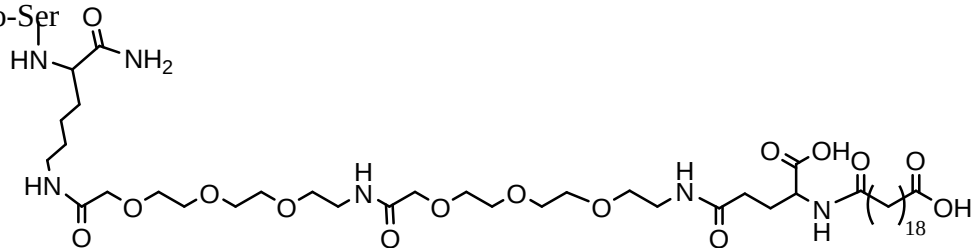
I-1,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



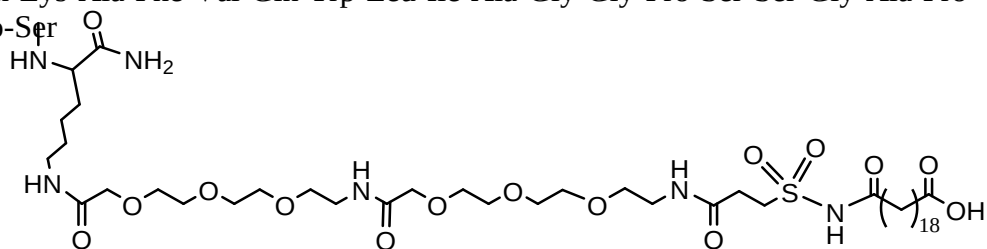
I-2,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



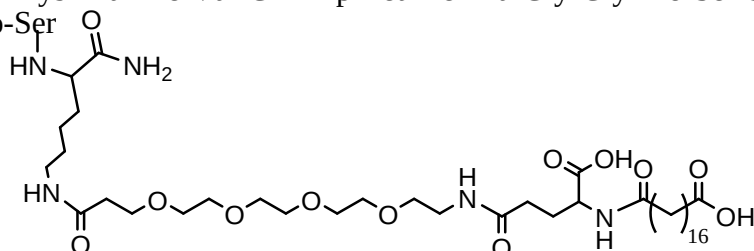
I-3,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



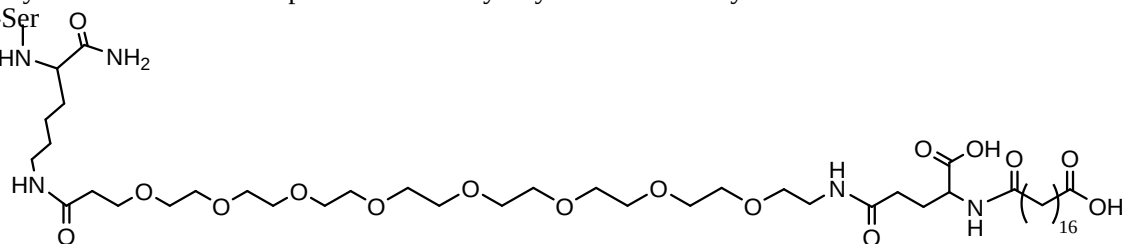
I-4,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



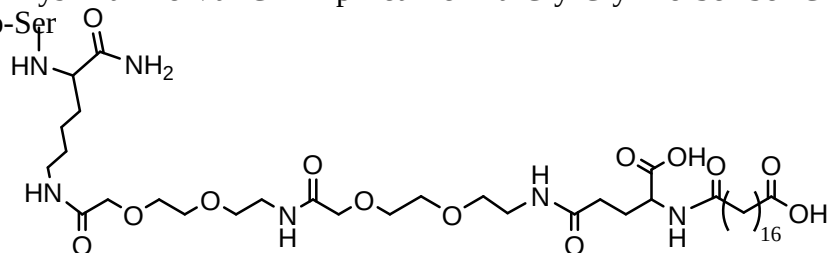
I-5,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



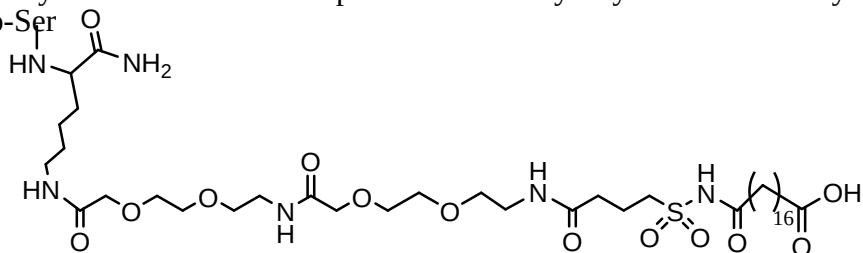
I-6,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



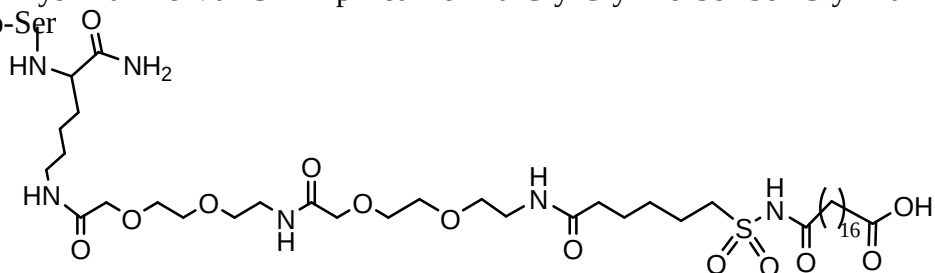
I-7,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



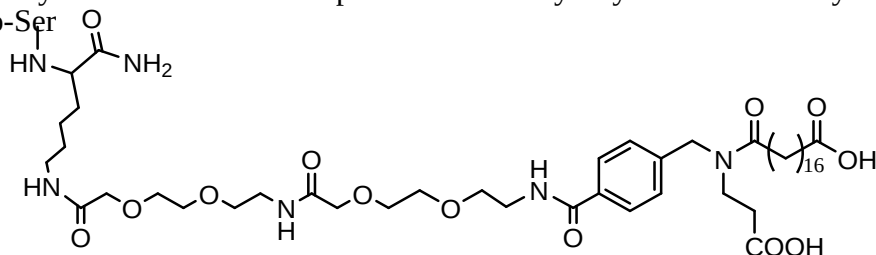
I-8,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser O



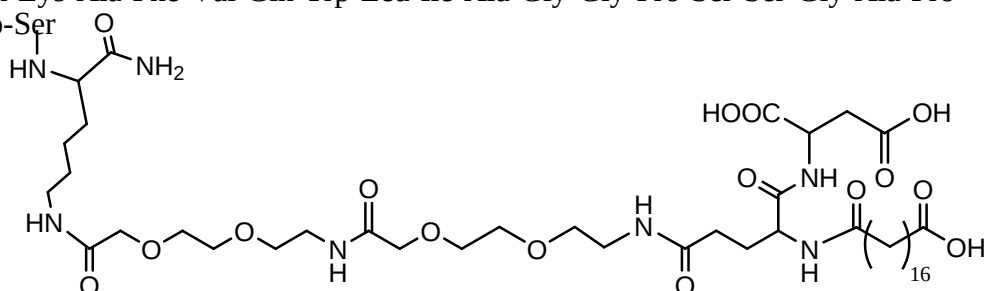
I-9,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser O



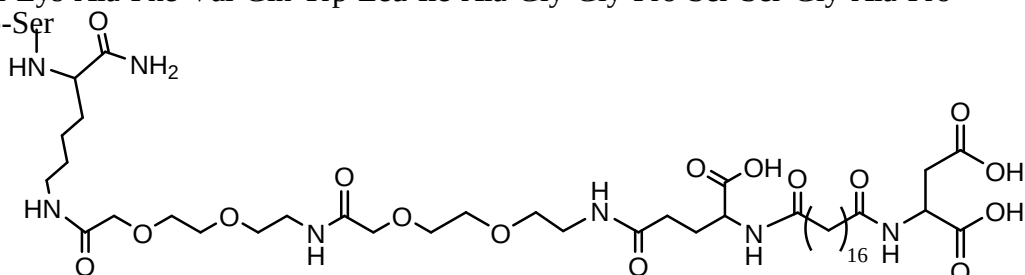
I-10,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser O



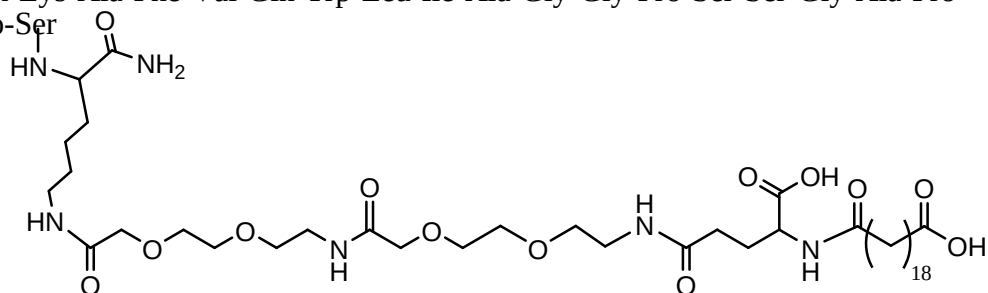
I-11,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser O



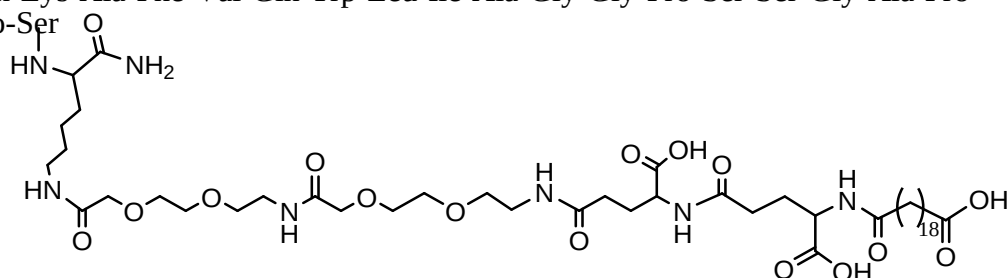
I-12,

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



I-13,

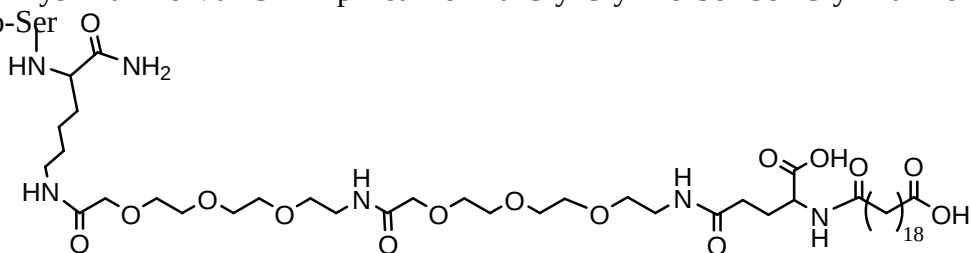
Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



I-14.

La presente divulgación además muestra al agonista dual del receptor de GIP y GLP-1, donde el agonista dual del receptor de GIP y GLP-1 es un compuesto representado por la fórmula I-3 o una sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptables:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



I-3.

La longitud y estructura específicas de la cadena lateral grasa del péptido en la presente divulgación no afecta el efecto de disminución del azúcar en sangre sino que afecta principalmente el índice metabólico del compuesto en el organismo, es decir, el tiempo de liberación sostenida de la molécula del fármaco en el organismo, es decir, que afecta el tiempo efectivo total de la eficacia. Específicamente, los compuestos I-1, I-2, I-3, I-4, I-5, I-6, I-7, I-8, I-9, I-10, I-11, I-12, I-13 e I-14 tienen

efectos hipoglucemiantes comparables y los índices metabólicos en el organismo también son similares. Los documentos del estado del arte anterior WO 2016111971 A1 y WO 2006097537 A2 muestran el efecto de la cadena lateral grasa en el metabolismo del agente activo del agonista del GLP y el contenido de las patentes mencionadas anteriormente se toman como parte de la divulgación actual a modo de referencia.

La presente divulgación muestra además una composición farmacéutica que involucra el compuesto o sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la presente divulgación o el agonista dual del receptor de GIP o GLP-1 de acuerdo con la presente divulgación;

opcionalmente, la composición farmacéutica incluye además uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables.

La presente divulgación también muestra el uso del compuesto o la sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo, farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la presente divulgación, el agonista dual del receptor de GIP y GLP-1 de acuerdo con la presente divulgación o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación para la preparación de un fármaco para prevenir y/o tratar enfermedades asociadas con trastornos metabólicos;

opcionalmente, las enfermedades asociadas con los trastornos metabólicos son la diabetes, complicaciones de la diabetes, obesidad o complicaciones de la obesidad.

En una implementación, la presente divulgación muestra el compuesto o la sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo, farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la presente divulgación, el agonista dual del receptor de GIP y GLP-1 de acuerdo con la presente divulgación o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación para la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con trastornos metabólicos;

opcionalmente, las enfermedades asociadas con los trastornos metabólicos son la diabetes, complicaciones de la diabetes, obesidad o complicaciones de la obesidad.

La presente divulgación además muestra un método para la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con trastornos metabólicos que comprende la administración de una cantidad efectiva profiláctica y/o terapéuticamente del compuesto o la sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo, farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con la presente divulgación, el agonista dual del receptor de GIP y GLP-1 de acuerdo con la presente divulgación o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación con respecto a un sujeto;

opcionalmente, las enfermedades asociadas con trastornos metabólicos son la diabetes, complicaciones de la diabetes, obesidad o complicaciones de la obesidad.

Efectos de la invención

La presente divulgación muestra un compuesto con una novedosa estructura representada por la fórmula I, donde el residuo de lisina del mismo en la posición 40 es modificado con el grupo R_1 . Se descubrió en la presente divulgación por medio de experimentación que el compuesto representado por la fórmula I tiene las actividades polipéptidicas de GIP y GLP-1 y es un agonista dual del receptor de GIP y GLP-1. En comparación con el compuesto LY3298176 con el residuo de lisina modificado en la posición 20, el compuesto representado por la fórmula I muestra valor EC_{50} menor o equivalente.

La posición de conexión de la cadena lateral tiene un efecto significativo en el efecto hipoglucemiante del compuesto. El compuesto representado por la fórmula I, como agonista dual del receptor de GIP y GLP-1, muestra un efecto hipoglucemiante significativo y un efecto de pérdida de peso corporal en el modelo de ratones con diabetes tipo 2 (db/db), muestra un fármaco terapéutico con grandes perspectivas de aplicación clínica para la prevención y tratamiento de enfermedades asociadas con trastornos metabólicos y puede ser usado para la prevención y tratamiento de la diabetes, complicaciones de la diabetes, obesidad o complicaciones de la obesidad.

En una implementación, la presente divulgación muestra un compuesto representado por la fórmula I-3. Se descubrió en los experimentos celulares en la presente divulgación que en comparación con el agonista dual del receptor de GIP y GLP-1 LY3298176, el compuesto representado por la fórmula I-3 tiene menores valores de EC_{50} comparado tanto con GIPR como con GLP-1R y en comparación con el producto comercializado Semaglutida, el compuesto representado por la fórmula I-3 tiene un valor EC_{50} significativamente menor comparado con GIPR, lo que indica que el compuesto representado por la fórmula I-3 tiene un efecto de activación significativamente mejor tanto en GIPR como en GLP-1R y la actividad del compuesto representado por la fórmula I-3 como un agonista dual del receptor de GIP y GLP-1, es mejor que el de los compuestos desarrollados actualmente. Adicionalmente, el compuesto representado por la fórmula I-3 puede reducir efectivamente el contenido de azúcar en sangre y el contenido de hemoglobina glicosilada en el ratón del modelo de diabetes tipo 2 (db/db), controlar el aumento del peso corporal en ratones y también muestra un mejor efecto en la secreción de insulina en ratones. Adicionalmente, el compuesto representado por la fórmula I-3 es más efectiva que el compuesto LY3298176 para la reducción del azúcar en sangre y controlar el peso corporal en ratones del modelo de diabetes tipo 2. El compuesto representado por la fórmula I-3 muestra importantes posibilidades de aplicación clínica para la prevención y tratamiento de enfermedades asociadas con trastornos metabólicos como la diabetes, complicaciones de la diabetes, obesidad y complicaciones de la obesidad.

En una implementación, el compuesto representado por la fórmula I-3 (BG128) puede producir disminuciones agudas en el peso corporal y la ingesta de alimentos en ratones del modelo de diabetes tipo 2 (db/db), que permanecen relativamente estables en el periodo posterior a la administración. Después de la primera administración, el compuesto representado por la fórmula I-3 reduce significativamente la glucosa sanguínea no en ayunas y la glucosa sanguínea en ayunas en ratones db/db y reduce los contenidos de hemoglobina glicosilada en la sangre periférica. Además, el efecto del compuesto representado por la fórmula I-3 en la glucosa sanguínea no en ayunas, insulina sérica y velocidad de pérdida de peso corporal de ratones es mejor que aquella del fármaco Tirzepatida a igual dosis.

En una implementación, el compuesto representado por la fórmula I-3 (BG128) tiene un efecto terapéutico obvio en los ratones del modelo C57BL/6 con diabetes inducida por STZ-HFD combinada con NASH y cada grupo de dosis de BG128 puede reducir significativamente la glucosa sanguínea en ayunas, la insulina y % de HbA1c en la sangre periférica y tiene un cierto efecto protector en los ratones del modelo. Adicionalmente, el compuesto representado por la fórmula I-3 mejora la función hepática y los indicadores bioquímicos clínicos relacionados con lípidos en sangre, reduce el puntaje NAS hepático y la tasa de fibrosis además de retardar significativamente el progreso de la NASH y el proceso de fibrosis. El compuesto representado por la fórmula I-3 tiene mejor efecto en comparación con el fármaco positivo Tirzepatida a igual dosis.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra el espectro de masas del compuesto BG128;

La FIG. 2 muestra el espectro de masas del compuesto BGM125;

La FIG. 3 muestra los niveles de azúcar en sangre en ratones db/db inyectados subcutáneamente con BG121 (30 nmol/kg), BG128 (30 nmol/kg), BG128 (10 nmol/kg) y control solvente (Control), 1, 3, 6, 24, 48 y 72 h después de la administración; **, $P < 0.01$ [BG121 (30 nmol/kg), BG128 (30, 10 nmol/kg) VS Control];

La FIG. 4 muestra los niveles de azúcar en sangre determinados en ratones db/db inyectados subcutáneamente con BG121 (30 nmol/kg), BG128 (30 nmol/kg), BG128 (10 nmol/kg) y control solvente (Control) cada 3 días, el día 7, 13, 19 y 25 después de la primera administración; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ [BG121 (30 nmol/kg) VS Control]; #, $P < 0.05$ [BG128 (30 nmol/kg) VS Control];

La FIG. 5 muestra los pesos corporales de ratones db/db inyectados subcutáneamente con BG121 (30 nmol/kg), BG128 (30 nmol/kg), BG128 (10 nmol/kg) y control solvente (Control) cada 3 días, el día 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 22 después de la primera administración;

La FIG. 6 muestra el contenido de hemoglobina glicosilada sérica determinado en ratones db/db inyectados subcutáneamente con BG121 (30 nmol/kg), BG128 (30

nmol/kg), BG128 (10 nmol/kg) y control solvente (Control) cada 3 días el día 25 después de la primera administración; *, $P < 0.05$;

La FIG. 7 muestra los contenidos de insulina determinados en ratones db/db inyectados subcutáneamente con BG121 (30 nmol/kg), BG128 (30 nmol/kg), BG128 (10 nmol/kg) y control solvente (Control) cada 3 días el día 25 después de la primera administración; ***, $P < 0.001$, $P < 0.01$;

La FIG. 8 muestra los cambios en el peso corporal de los animales en el grupo db/db-ND, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg durante el experimento;

La FIG. 9 muestra los cambios en las tasas de aumento de peso corporal de los animales en el grupo db/db-ND, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 10 muestra los cambios en la ingesta de alimentos de animales en el grupo de db/db-ND, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 11 muestra los cambios en la glucosa sanguínea no en ayunas de los animales en el grupo de db/db-ND, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 12 muestra los cambios en la glucosa sanguínea en ayunas de los animales en el grupo de db/db-ND, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg; ANOVA de dos vías: *** $p < 0.001$ vs. grupo de db/db-ND; ** $p < 0.01$ vs. grupo de db/db-ND; * $p < 0.05$ vs. grupo de db/db-ND y en la FIG. 12, los histogramas mostrados en cada punto de tiempo a los 0 días, 7 días, 13 días, 19 días, 25 días y 31 días representan secuencialmente al grupo de b/db-ND, grupo Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo BG128-0.05 mg/kg, grupo BG128-0.15 mg/kg y grupo BG128-0.5 mg/kg de izquierda a derecha;

La FIG. 13 muestra los cambios en las concentraciones séricas de insulina de los animales en el grupo de db/db-ND, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg; prueba T: * $p < 0.05$ vs. el grupo de db/db-ND;

La FIG. 14 muestra el porcentaje de HbA1C en la sangre entera con anticoagulantes de los animales en el grupo de db/db-ND, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg; ANOVA de una vía: *** $p < 0.001$ vs. grupo de db/db-ND; # $p < 0.05$ vs. Tirzepatida-0.15 mg/kg; & $p < 0.05$ vs. BG128-0.05 mg/kg; \$ $p < 0.05$ vs. BG128-0.15 mg/kg;

La FIG. 15 muestra los resultados de reducción porcentual de HbA1C de los animales en el grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg en comparación con el grupo modelo; ANOVA de una vía: *** $p < 0.001$ vs. grupo de db/db-ND, ## $p < 0.001$ vs. Tirzepatida-0.15 mg/kg;

La FIG. 16 muestra los cambios en el peso corporal de los animales en el grupo normal, grupo de modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg durante el experimento;

La FIG. 17 muestra los cambios en la ingesta de alimentos de los alimentos en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 18 muestra los cambios en la glucosa sanguínea en ayunas de los animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg y en la FIG. 18, los histogramas mostrados en cada punto de tiempo antes de la HFD, antes de la administración, a la semana 1, semana 2, semana 3, semana 4, semana 5, semana 6, semana 7 y punto de término representan secuencialmente al grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg de izquierda a derecha;

La FIG. 19 muestra los cambios en la insulina de los animales en el grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg; ANOVA de una vía: ** $p < 0.05$ vs. grupo del modelo; *** $p < 0.001$ vs. grupo del modelo;

La FIG. 20 muestra el cambio porcentual en el % de HbA1C en la sangre periférica de los animales en el grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg; ANOVA de una vía: * $p < 0.05$ vs. grupo del modelo;

La FIG. 21 muestra los cambios en la ALT y AST en la sangre de los animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 22 muestra los cambios en la TC y TG en la sangre de los animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 23 muestra los cambios en la lipoproteína de alta y baja densidad en la sangre de los animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 24 muestra fotos con tinción de HE (x400) de tejido hepático de los animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg; A: grupo de control normal; B: grupo del modelo; C: Tirzepatida -0.15 mg/kg; D: BG128-0.05 mg/kg; E: BG128-0.15 mg/kg; F: BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 25 muestra los cambios la infiltración de células inflamatorias y esteatosis de los animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 26 muestra los resultados de la escala NAS de los animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 27 muestra las imágenes con tinción de rojo sirius (x200) de los tejidos hepáticos de animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg; A: grupo de control normal; B: grupo del modelo; C: Tirzepatida -0.15 mg/kg; D: BG128-0.05 mg/kg; E: BG128-0.15 mg/kg; F: BG128-0.5 mg/kg;

La FIG. 28 muestra los porcentajes de fibrosis de los tejidos hepáticos de los animales en el grupo normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg .

Descripción detallada de las implementaciones

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los términos utilizados en la presente divulgación tienen los siguientes significados.

En las reivindicaciones y/o especificación de la presente divulgación, las palabras “un”, “una” o “la/el” pueden hacer referencia a “uno/a”, pero también pueden hacer referencia a “uno/a o más”, “al menos un/a” y “uno/a o más de uno/a”.

Según se usa en las reivindicaciones y la descripción, las palabras “comprende”, “tiene”, “incluye” o “contiene” hacen referencia a una expresión inclusiva y abierta que no excluye elementos adicionales, no citados o etapas del método. Además, las palabras “comprende”, “tiene”, “incluye” o “contiene” también puede hacer referencia a una expresión cerrada, que excluye elementos adicionales, no citados o etapas del método.

En el documento de solicitud, el término “alrededor” hacer referencia a un valor que incluye la desviación estándar en el error causada por el dispositivo o método utilizado para determinar el valor.

El término “agonista” utilizado en el contexto de la presente divulgación hace referencia a una sustancia (ligando) que activa una vía de señalización a través del tipo de receptor objetivo. Por ejemplo, si un receptor de GLP-1 es un receptor objetivo, el agonista tiene actividad de activación del receptor de GLP-1 y puede tratarse de un polipéptido de GLP-1 o un análogo del mismo.

El término “EC₅₀” utilizado en el contexto de la presente divulgación, hace referencia a la concentración efectiva media y en la presente divulgación, la actividad agonista del compuesto es evaluada según su EC₅₀. Por ejemplo, con el receptor de GIP como objetivo, el EC₅₀ del compuesto en el receptor GIP es determinado y usado como datos de evaluación de la actividad agonista del compuesto en el receptor de GIP.

El término “tratar” utilizado en el contexto de la presente divulgación hace referencia a: poner en contacto (es decir administrar a) a un sujeto que padece una enfermedad con el compuesto de la presente divulgación o con la sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo, farmacéuticamente aceptables, o la composición farmacéutica de la presente divulgación que contiene al mismo (en adelante “la composición farmacéutica de la presente divulgación”), reduciendo por tanto los síntomas de la enfermedad en comparación con la situación de aquellos que no han entrado en contacto con éste, lo que no significa que los síntomas de la enfermedad deban ser totalmente suprimidos. Sufrir una enfermedad hacer referencia a: el organismo tiene síntomas de la enfermedad.

El término “prevenir” utilizado en el contexto de la presente divulgación hace referencia a: poner en contacto (es decir administrar a) a un sujeto que padece una enfermedad con el compuesto de la presente divulgación o con la sal, éster, solvato, isómero óptico, tautómero, compuesto etiquetado isotópicamente o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptable o la composición farmacéutica de la presente divulgación que contiene al mismo reduciendo con ello los síntomas después de sufrir de la enfermedad en comparación con la situación de aquellos que no han recibido el contacto, lo que no significa que los síntomas de la enfermedad pueda ser totalmente evitada.

Los términos “individuo”, “paciente” o “sujeto” utilizados en el contexto de la presente divulgación incluyen a mamíferos. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (como vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (como primates humanos y no humanos, como monos), conejos y roedores (como ratones y ratas).

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” utilizado en el contexto de la presente divulgación hace referencia a una cantidad efectiva para lograr el resultado terapéutico deseado a una dosis y por periodos de tiempo deseados. La cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto o la composición farmacéutica de la presente divulgación puede variar dependiendo de factores como el estado de la enfermedad, género, edad y peso de un individuo y la capacidad de un adyuvante

inmunológico o la composición farmacéutica para activar una respuesta deseada en un individuo.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” utilizado en el contexto de la presente divulgación hace referencia a una sal preparada a partir del compuesto de la presente divulgación con un ácido o base relativamente no tóxicos. Cuando el compuesto de la presente divulgación contiene un grupo funcional relativamente ácido (como un grupo carboxilo o de ácido sulfónico), puede obtenerse una sal de adición de base contactando la forma libre del compuesto con una cantidad suficiente de base, sea en una solución pura o un solvente inerte adecuado. Ejemplos no limitantes de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio, sales de potasio, sales de amonio, sales de calcio, sales de magnesio, sales de amina orgánicas o sales similares. Cuando el compuesto de la presente divulgación contiene un grupo funcional relativamente básico (como amino o guanidina), puede obtenerse una sal de adición de ácido contactando la forma libre del compuesto con una cantidad suficiente de ácido, sea en una solución pura o como solvente inerte adecuado. Ejemplos no limitantes de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a sales ácidas inorgánicas (como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, nitrato, carbonato, bicarbonato, fosfato, fosfato de monohidrógeno, fosfato de dihidrógeno, fosfito, sulfato, sales de bisulfato, *etc.*), sales ácidas orgánicas (como acetato, propionato, isobutirato, malonato, succinato, suberato, maleato, fumarato, citrato, tartrato, lactato, mandelato, benzoato, ftalato, mesilato, besilato, sales de glucoronato p-tosilato, *etc.*) y sales de aminoácidos (como sal de arginina, *etc.*). Para formas específicas de sales farmacéuticamente aceptables, revise Berge *et al.*, “Pharmaceutical Salts”, *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66:1-19.

El término “composición farmacéutica” utilizado en el contexto de la presente divulgación hace referencia a una composición farmacéuticamente aceptable que incluye uno o más de los compuestos representados por la fórmula I o formas farmacéuticamente aceptables de la misma (como una sal, hidrato, solvato, estereoisómero, tautómero, metabolito, profármaco, *etc.*) y otros componentes (tales como excipientes farmacéuticamente aceptables, *etc.*)

El término “excipiente farmacéuticamente aceptable” utilizado en el contexto de la presente divulgación hace referencia a un material auxiliar ampliamente usado en el campo de la producción farmacéutica. El objetivo principal de utilizar un excipiente es aportar una composición farmacéutica que sea segura de usar, estable en su naturaleza y/o que tenga una funcionalidad específica, además de proporcionar un método para disolver el ingrediente activo a una velocidad deseada después que el fármaco sea administrado al sujeto o promover la absorción efectiva del ingrediente activo en el sujeto que recibe la administración. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un relleno inerte o un ingrediente funcional que aporte algunas funciones a la composición farmacéutica, como estabilizar el valor del pH general de la composición o evitar la degradación de los ingredientes activos de la composición. Ejemplos no limitantes de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, agentes de suspensión, emulsificadores, diluyentes (o rellenos), agentes de granulación, adhesivos, agentes de desintegración, lubricantes, agentes anti-adhesivos, fluidificantes, agentes humectantes, agentes de gelificación, agentes retardantes de absorción, inhibidores de disolución, agentes de refuerzo, adsorbentes, tampón, agentes quelantes, preservantes, colorantes, agentes saborizantes y agentes endulzantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser preparadas usando cualquiera de los métodos conocidos para una persona versada en el arte, tales como procesos de mezclado convencional, disolución, granulación, emulsificación, triturado, encapsulamiento, incorporación y/o liofilización.

En la presente divulgación, el objetivo de utilizar una composición farmacéutica es promover su administración a un organismo y facilitar la absorción del ingrediente activo, ejerciendo por tanto actividad biológica. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo la administración por inyección (intraarterial, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea), administración por la mucosa, administración oral (preparación sólida oral y preparación líquida oral), administración rectal, administración por inhalación, administración por implantación, administración tópica (por ejemplo por el ojo), , *etc.* Ejemplos no

limitantes de preparaciones orales sólidas incluyen, pero sin limitarse a, polvos, cápsulas, pastillas, gránulos, comprimidos, *etc.* Ejemplos no limitantes de preparaciones líquidas para administración oral o por la mucosa incluyen, pero sin limitarse a suspensiones, tinturas, elíxires, soluciones, *etc.* Ejemplos no limitantes de preparaciones para administración tópica incluyen pero no se limitan a emulsiones, geles, ungüentos, cremas, parches pastas, espumas, lociones, gotas o sueros. Ejemplos no limitantes de preparaciones para administración parenteral incluyen pero no se limitan a soluciones para inyección, polvos secos para inyección, suspensiones para inyección, emulsiones para inyección, *etc.* La composición farmacéutica de la presente divulgación también puede ser formulada como de liberación controlada o forma farmacéutica de liberación retardada (como liposoma o microesfera).

En la presente divulgación, las vías de administración pueden ser variadas o ajustadas en cualquier manera adecuada para satisfacer las necesidades de la naturaleza del fármaco, la conveniencia del paciente y personal médico y otros factores relevantes.

El término “trastorno metabólico” utilizado en el contexto de la presente divulgación puede hacer referencia a trastornos del metabolismo de la glucosa como diabetes, complicaciones de la diabetes, obesidad y complicaciones de la obesidad. Ya que la asociación entre la obesidad, la diabetes y el metabolismo de la glucosa sanguínea son bien conocidos, estas condiciones pueden, pero no necesitan ser, separadas o mutuamente exclusivas. En algunas implementaciones, la diabetes o complicaciones de la diabetes incluyen la resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, aumento de la glucosa sanguínea en ayunas, la diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, hipertensión por diabetes gestacional, dislipidemia y/o una combinación de las mismas. En algunas implementaciones, las complicaciones de la obesidad incluyen la inflamación asociada con la obesidad, enfermedades de la vesícula asociadas con la obesidad, apnea del sueño asociada con la obesidad o puede ser seleccionada desde las siguientes condiciones relacionadas: dislipidemia aterogénica, dislipidemia, aumento de la presión sanguínea, hipertensión, estado protrombótico y estado proinflamatorio o una combinación de los mismos.

El compuesto o sal farmacéuticamente aceptables, hidrato, solvato, estereoisómero, tautómero, metabolito o profármaco del mismo o la composición farmacéutica que incluye aquella de la presente divulgación cuenta con una excelente actividad dual agonista de GIPR y GLP-1R, puede reducir efectivamente el azúcar en sangre y controlar el aumento de peso corporal del modelo de ratones con diabetes de tipo 2, se usa para evitar y/o tratar trastornos metabólicos y cuenta con buenos usos clínicos y médicos.

Las soluciones técnicas de la presente divulgación se describen en conjunto con ejemplos específicos a continuación. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustrar mejor la presente divulgación y no pretenden limitar el alcance de la misma. Los diferentes cambios y mejoras a las implementaciones específicas de la presente divulgación serán obvias para una persona versada en el arte sin perjuicio del espíritu y alcance de la presente divulgación.

Los compuestos de la presente divulgación pueden ser preparados por diferentes métodos sintéticos bien conocidos para una persona versada en el arte, incluyendo pero sin limitarse a las implementaciones específicas listadas más adelante, las implementaciones formadas por la combinación de las implementaciones específicas con otros métodos de síntesis química y las implementaciones alternativas equivalentes bien conocidas para una persona versada en el arte, en las cuales las implementaciones de preferencia incluyen pero no se limitan a los ejemplos de la presente divulgación. Los materiales de inicio conocidos usados en la presente divulgación pueden ser sintetizados por un método conocido en el arte o pueden ser comprados por medios comerciales convencionales.

La separación y purificación del compuesto de la presente divulgación pueden ser realizadas por métodos sintéticos bien conocidos para una persona versada en el arte, incluyendo pero sin limitarse a la cromatografía de columna (CC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), *etc.*

Los nombres de los aminoácidos y abreviaturas en inglés de los mismos en la presente divulgación se muestran en la siguiente table:

Nombres y abreviaturas de aminoácidos protegidos requeridos para la síntesis de fase sólida Fmoc

Nombre	Aminoácido protegido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una sola letra
Alanina	Fmoc-Ala-OH	Ala	A
Ácido aspártico	Fmoc-Asp (OtBu)-OH	Asp	D
Ácido Glutámico	Fmoc-Glu (OtBu)-OH	Glu	E
	Fmoc-Glu-OtBu		
Fenilalanina	Fmoc-Phe-OH	Phe	F
Glicina	Fmoc-Gly-OH	Gly	G
Isoleucina	Fmoc-Ile-OH	Ile	I
Lisina	Fmoc-Lys (Boc)-OH	Lys	K
	Fmoc-Lys (Alloc)-OH		
Leucina	Fmoc-Leu-OH	Leu	L
Prolina	Fmoc-Pro-OH	Pro	P
Glutamina	Fmoc-Gln (Trt)-OH	Gln	Q
Serina	Fmoc-Ser (tBu)-OH	Ser	S
Treonina	Fmoc-Thr (tBu)-OH	Thr	T
Valina	Fmoc-Val-OH	Val	V
Triptófano	Fmoc-Trp (Boc)-OH	Trp	W
Tirosina	Fmoc-Tyr (tBu)-OH	Tyr	Y
	Boc-Tyr (tBu)-OH		
Ácido 2-aminoisobutírico	Fmoc-Aib-OH	Aib	/

Ejemplo

Otros objetos, funcionalidades y ventajas de la presente divulgación se harán patentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se entiende que la descripción detallada y ejemplo particular (aunque indican las formas de implementación específicas de la presente divulgación) se muestran únicamente para propósitos de explicación, ya que diferentes cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la presente divulgación se volverán evidentes para una persona versada en el arte tras la lectura de la especificación detallada.

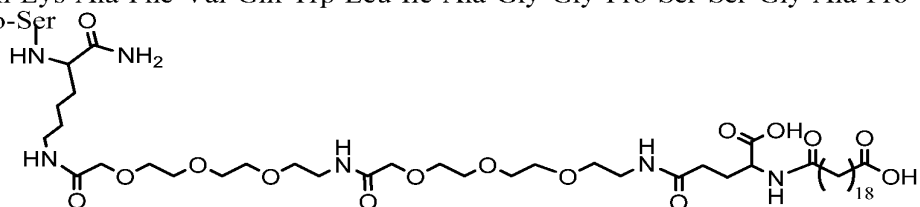
A menos que se indique específicamente, todos los reactivos y materiales usados en la presente divulgación son adquiridos comercialmente.

Ejemplo 1 Síntesis en fase sólida de compuesto objetivo BG128 por método

Fmoc

Estructura del compuesto de BG128:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser O



I-3

Etapa sintética:

Se utilizó resina amida de Rink MBHA con un aminoácido Fmoc, además de 20% piperidina/DMF para eliminar el Fmoc, se usó HOBT/DIC como reactivo de acoplamiento y DMF como solvente de reacción y se monitoreó la reacción por medio de un método de detección por ninhidrina.

(1) Los siguientes aminoácidos protegidos fueron acoplados secuencialmente a la resina amida de Rink MBHA:

Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Aib-OH y Boc-Tyr(tBu)-OH.

(2) Eliminación del grupo protector: se añadió una solución de 3 eq de Pd (PPh₃)₄ en CHCl₃ : AcOH : NMM (18 : 1 : 0.5) y se hizo reaccionar la mezcla por 2 h para luego ser enjuagada con cloroformo (6*30 ml) y lavada con una solución de HOAc (20%) en DCM (6*30 ml), DCM (6*30 ml) y DMF (6*30ml). El resultado por detección con nihidrina de la mezcla fue positivo. Posteriormente Fmoc-AEEEA-OH, Fmoc-AEEEA-OH, Fmoc-Glu-OtBu y ácido 20-(terc-butoxi)-20-

oxoicosanoico fueron condensados secuencialmente para obtener una resina completamente protegida de BG128.

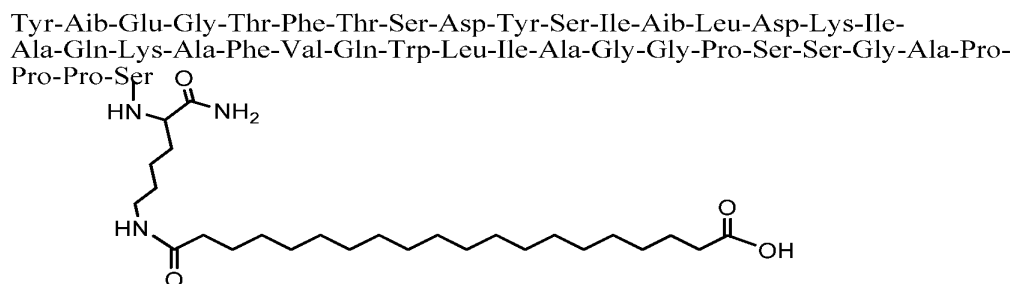
(3) Segmentación de la resina: se utilizó 95% TFA/2.5% agua/2.5TIS para luego utilizarse un MTBE frío para el precipitado y lavado. El producto crudo fue purificado por HPLC y liofilizado para obtener el compuesto objetivo BG128. El espectro MS del compuesto BG128 se muestra en la FIG. 1.

Las abreviaturas usadas son las siguientes:

DMF, N,N-dimetilformamida; Fmoc, 9-fluorenilmetiloxycarbonil; HOBT, N-hidroxibenzotriazol; DIC, N,N-diisopropilcarbodiimida; NMM, N-metilmorfolina; DCM, diclorometano; Fmoc-AEEEEA-OH, ácido [2-[2-[2-(Fmoc-amino)etoxi]etoxi]etoxi]acético; MTBE, éter metil-terbulítico; TFA, ácido trifluoroacético; TIS, triisopropilsilano.

Ejemplo 2 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-1 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-1:



I-1,

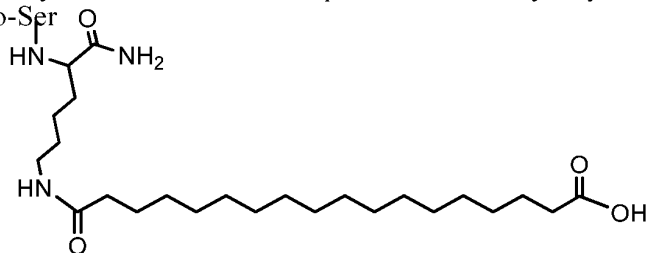
Etapas sintéticas:

el compuesto representado por la fórmula I-1 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación como se muestra en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), el ácido 20-(terc-butoxi)-20-oxoicosanoico fue condensado en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-1, MS:[M+3]³⁺ es 1508.4.

Ejemplo 3 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-2 por método Fmoc

La estructura del compuesto representado por la fórmula I-2:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



I-2,

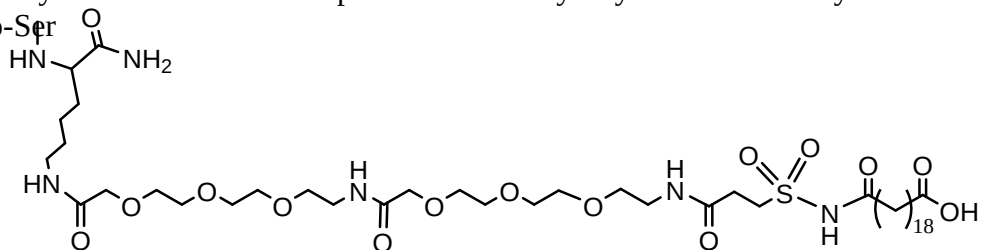
Etapa sintética:

el compuesto representado por la fórmula I-2 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), el ácido 18-(terc-butoxi)-18-oxooctadecanoico fue condensado en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-2, MS:[M+3]³⁺ es 1499.0.

Ejemplo 4 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-4 por método Fmoc

La estructura del compuesto representado por la fórmula I-4:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



I-4

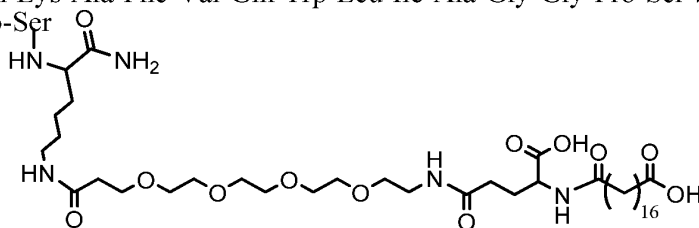
Etapa sintética:

el compuesto representado por la fórmula I-4 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AESEA-OH, Fmoc-AESEA-OH y ácido 3-(N-(20-(terc-butoxi)-20-oxoeicosanoil)sulfamoil)propiónico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-4, MS:[M+3]³⁺ es 1679.6.

Ejemplo 5 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-5 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-5:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



I-5

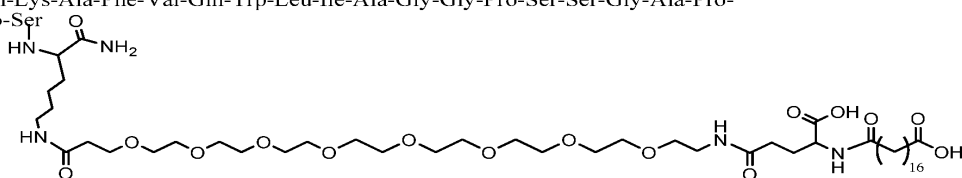
Etapas sintéticas:

el compuesto representado por la fórmula I-5 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-NH-PEG4-PA, Fmoc-Glu-OtBu y el ácido 18-(terc-butoxi)-18-oxooctadecanoico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-5, MS: $[M+3]^{3+}$ es 1626.5 y $[M+4]^{4+}$ es 1220.1.

Ejemplo 6 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-6 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-6:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



I-6

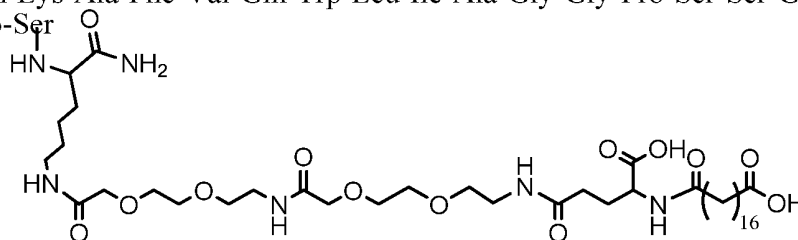
Etapas sintéticas:

el compuesto representado por la fórmula I-6 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-NH-PEG8-PA, Fmoc-Glu-OtBu y el ácido 18-(terc-butoxi)-18-oxooctadecanoico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y por el compuesto representado por la fórmula I-6, MS: $[M+3]^{3+}$ es 1683.2 y $[M+4]^{4+}$ es 1262.7.

Ejemplo 7 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-7 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-7:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



I-7

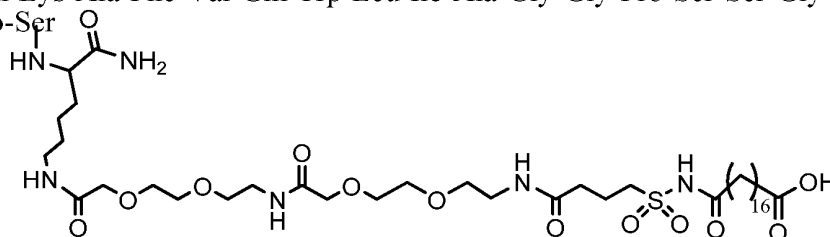
Etapa sintética:

el compuesto representado por la fórmula I-7 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-Glu-OtBu y el ácido 18-(terc-butoxi)-18-oxooctadecanoico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-7, MS:[M+3]³⁺ es 1638.8 y [M+4]⁴⁺ es 1229.4.

Ejemplo 8 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-8 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-8:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



I-8

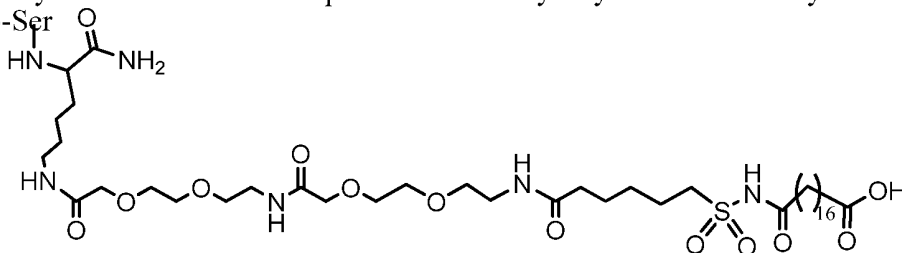
Etapa sintética:

el compuesto representado por la fórmula I-8 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-AEEA-OH y el ácido 4-(N-(18-(terc-butoxi)-18-oxoheptadecanoyl)sulfamoyl)butírico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-8, MS: [M-3]³⁻ es 1643.5.

Ejemplo 9 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-9 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-9:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



I-9

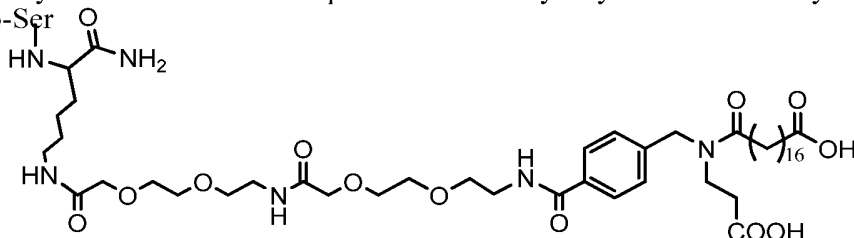
Etapas sintéticas:

el compuesto representado por la fórmula I-9 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-AEEA-OH y el ácido 6-(N-(18-((terc-butoxi))-18-oxoestearoil)sulfamoyl)hexanoico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-9, MS: $[M-3]^{3-}$ es 1652.9.

Ejemplo 10 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-10 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-10:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser



I-10

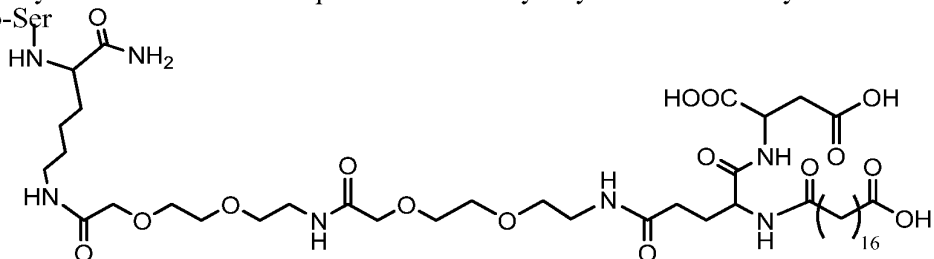
Etapas sintéticas:

el compuesto representado por la fórmula I-10 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-AEEA-OH y el ácido 4-((18-(terc-butoxi)-N-(3-(terc-butoxi)-3-oxopropil)-18-oxoestearamida)metil)benzoico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-10, MS: $[M+3]^{3+}$ es 1664.2.

Ejemplo 11 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmulaI-11 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-11:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



I-11

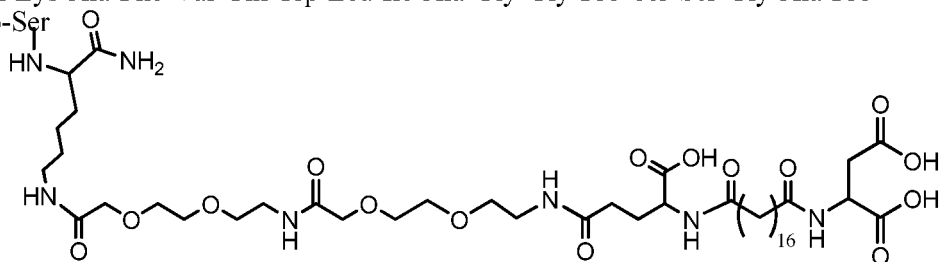
Etapa sintética:

el compuesto representado por la fórmula I-11 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-Glu-(Asp(OtBu)-OtBu)-OH y el ácido 18-(terc-butoxi)-18-oxooctadecanoico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-11, MS:[M+3]³⁺ es 1677.2.

Ejemplo 12 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmulaI-12 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-12:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Ile-
Ala-Gln-Lys-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-
Pro-Pro-Ser



I-12

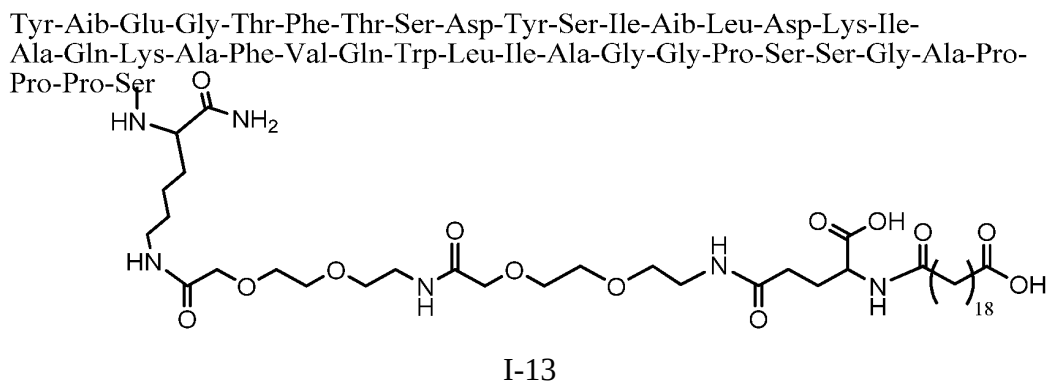
Etapa sintética:

el compuesto representado por la fórmula I-12 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-Glu-OtBu y el ácido Asp[(OtBu)-OtBu]-

octadecanedioico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-12, MS:[M+3]³⁺ es 1677.2.

Ejemplo 13 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-13 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-13:

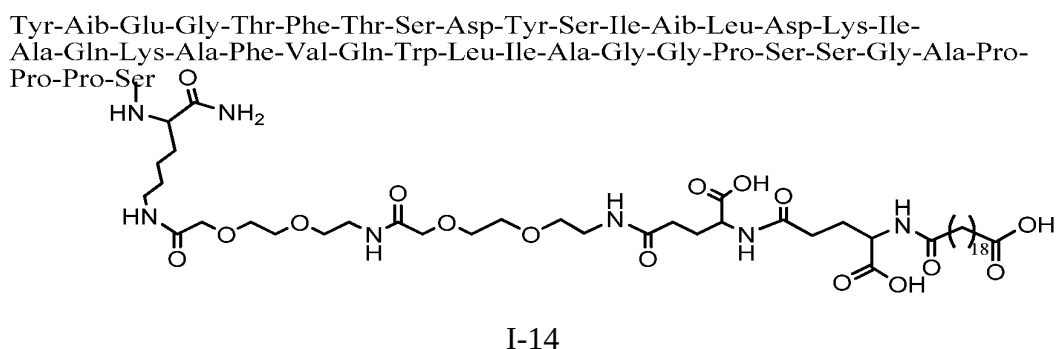


Etapa sintética:

el compuesto representado por la fórmula I-13 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-Glu-OtBu y el ácido 20-(terc-Butoxi)-20-oxoicosanoico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-13, MS:[M+3]³⁺ es 1648.1.

Ejemplo 14 Síntesis de fase sólida del compuesto representado por la fórmula I-14 por método Fmoc

Estructura del compuesto representado por la fórmula I-14:



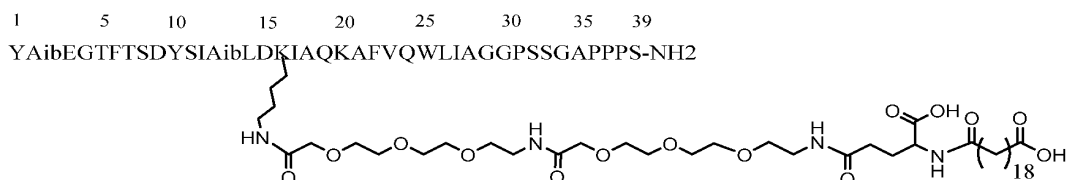
Etapa sintética:

el compuesto representado por la fórmula I-14 fue obtenido de acuerdo con el método de preparación mostrado en el ejemplo 1, donde en la etapa (2), Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-Glu-OtBu, Fmoc-Glu-OtBu y el ácido 20-

(terc-Butoxi)-20-oxoicosanoico fueron condensados secuencialmente en la cadena lateral y para el compuesto representado por la fórmula I-14, MS:[M+3]³⁺ es 1691.2.

Ejemplo comparativo 1 Síntesis de fase sólida de compuesto objetivo BGM125 por método Fmoc

Estructura del compuesto de BGM125:



y donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido en el compuesto BGM125 sea la mostrada en SEQ ID NO: 1.

Etapas sintéticas:

En la síntesis de péptidos de fase sólida del péptido objetivo se usó la resina amida de Rink MBHA con Fmoc, se usó 20% de piperidina/DMF para eliminar el Fmoc, se usó HOBT/DIC como reactivo de acoplamiento y DMF como solvente de reacción y la reacción fue monitoreada por un método de detección de ninhidrina:

(1) Los siguientes aminoácidos protegidos fueron acoplados secuencialmente a la resina amida de Rink MBHA:

Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Aib-OH y Boc-Tyr(tBu)-OH.

(2) Eliminación del grupo de protección: se añadió una solución de 3 eq de Pd(PPh₃)₄ en CHCl₃:AcOH:NMM (18:1:0.5) y se hizo reaccionar la mezcla por 2 h, luego se enjuagó con cloroformo (6*30 ml) y con una solución de HOAc (20%) en DCM (6*30 ml), DCM (6*30 ml) y DMF (6*30ml). El resultado de la detección con ninhidrina de la mezcla fue positivo y luego se condensó secuencialmente Fmoc-

AEEEA-OH, Fmoc-AEEEA-OH, Fmoc-Glu-OtBu y ácido 20-(terc-butoxi)-20-oxoicosanoico para obtener una resina totalmente protegida de BGM125.

(3) Segmentación de la resina: se usó 95% TFA/2.5% agua/2.5TIS y luego éter metil-terbulítico (MTBE) frío para el precipitado y enjuague. El producto crudo fue purificado por HPLC y liofilizado para obtener el compuesto objetivo BGM125. El compuesto objetivo BGM125 fue caracterizado por MS y el resultado se muestra en la FIG. 2.

Ejemplo experimental 1

1. Materiales del experimento:

1.1 Reactivos y equipo:

Kit de detección cAMP, Cisbio; 1M HEPES, Invitrogen; 1X HBSS, Invitrogen; Casein, Sigma; IBMX, Sigma; GIP(GIP), Tocris;

Célula huésped para línea celular GLP-1R: HEK293 preservada en BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.;

Célula huésped para línea celular GIP R: CHO preservada en BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.;

Placa OptiPlate-384, PerkinElmer; 384 Echo plate, Labcyte; EnVision, PerkinElmer; contador Honeycomb, Beckman;

1.2 Compuestos de prueba:

Tabla 1 Compuestos de prueba para experimento celular

Nombre/Nombre abreviado	BG121 (LY3298176)	BG128	BGM125	BGM134 (Semaglutida)
Especificación	2.69 mg	2.80 mg	2.80 mg	10 mg
Contenido	96.64%	95.61%	95.61%	95.61%
Característica	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco
Condición de preservación	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C
Fuente	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.	Comprado

2. Método experimental:

a) Preparación de placa del compuesto:

(1) Los compuestos a ser analizados para el GIPR objetivo fueron BG121, BG128, BGM125 y BGM134. Cada compuesto fue diluido en serie 4 veces para un total de 10 concentraciones en serie. La concentración de inicio fue de 5 μ M y se utilizó Bravo para completar la dilución. El compuesto de referencia GIP fue diluido en serie 4 veces para un total de 10 concentraciones en serie, siendo la concentración de inicio de 5 μ M y se utilizó Bravo para completar la dilución.

(2) Los compuestos a ser analizados para el GLP-1R objetivo fueron BG 121, BG128, BGM125 y BGM134. Cada compuesto fue diluido en serie 4 veces para un total de 10 concentraciones seriales. La concentración de inicio fue de 0.5 μ M y se utilizó Bravo para completar la dilución. El compuesto de referencia GLP-1 (7-37) fue diluido en serie 4 veces para un total de 10 concentraciones en serie, siendo la concentración de inicio de 2 μ M y se utilizó Bravo para completar la dilución.

b) Transferencia de compuestos:

(1) se transfirió 100 nL del compuesto a una placa OptiPlate-384 usando una pipeta Echo.

(2) La placa OptiPlate-384 fue centrifugada a 1000 rpm por 5 segundos.

c) Preparación de la suspensión celular

(1) Un tubo de criopreservación cada uno para las células GLP-1R y GIPR fue colocado rápidamente en agua tibia a 37°C para descongelar.

(2) La suspensión celular fue transferida a un tubo de centrífuga de 15 mL y se enjuagó cuidadosamente con 10 ml de HBSS.

(3) El tubo de centrífuga fue centrifugado a 1000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.

(4) Se desechó el sobrenadante.

(5) Las células del fondo fueron cuidadosamente dispersadas y enjuagadas con 10 ml de HBSS. La mezcla fue centrifugada para depositar las células y finalmente las células fueron nuevamente suspendidas con el buffer experimental.

(6) Se determinó la densidad y viabilidad celular usando Vi-cell.

(7) Las células de GLP-1R fueron diluidas con el buffer experimental a una concentración de 2.0×10^5 /mL.

(8) 100 nL de la suspensión celular diluida fueron transferidos a una placa OptiPlate-384.

(9) La suspensión fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente.

d) Adición del reactivo de detección:

(1) Se añadió 10 μ L de estándar cAMP diluido en gradiente 800 nM a un pocillo vacío de la placa OptiPlate-384.

(2) Se añadió 10 μ L de reactivo de detección cAMP.

(3) La placa OptiPlate-384 fue cubierta con película TopSeal-A e incubada a temperatura ambiente por 60 minutos. Se retiró la película Top Seal-A y se utilizó EnVision para leer el resultado.

3. Resultados experimentales:

Tabla 2 resultado experimental cAMP del receptor de GIP

No.	Nombre de muestra	EC ₅₀ (nM)
1	BG121 (LY3298176)	1.794
2	BG128	0.2785
3	BGM125	0.6839
4	BGM134 (Semaglutida)	> 50
Ref	GIP	0.1397

Tabla 3 resultado experimental cAMP del receptor de GLP-1

No.	Nombre de muestra	EC ₅₀ (nM)
1	BG121 (LY3298176)	0.2273
2	BG128	0.1097
3	BGM125	0.06922
4	BGM134 (Semaglutida)	0.01347
Ref	GLP-1	0.005069

En la Tabla 2 y Tabla 3 puede observarse que el compuesto en la presente divulgación cuenta con una alta actividad dual agonista sobre los receptores de GLP-1 y GIP, siendo la actividad agonista sobre el receptor de GIP mejor que aquella del agonista dual del receptor de LY3298176 existente y el agonista del receptor de GLP-1 semaglutida y que la actividad agonista sobre el receptor del GLP-1 es mejor que aquella de LY3298176.

Ejemplo experimental 2

1. Materiales del experimento:

1.1 Solvente

Nombre: solución de ácido cítrico;

Ingrediente: ácido cítrico 20 mM con un pH 7.0;

Condición de almacenamiento: 4°C;

Proveedor: Sangon Bioengineering (Shanghái) Co., Ltd.

1.2 Animales de experimentación

Germline: ratones BKS (ratones db/db); fuente: Gempharmatech Co., Ltd.; clave de licencia: SCXK (SU) 2018-0008; número de certificado: 202100117; grado: SPF; número: 32; género: machos; edad: 8 semanas (al inicio del modelamiento); identificación del animal: etiqueta en la oreja.

Condiciones de alimentación: temperatura: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; humedad: 40% - 70%; iluminación: iluminación artificial que simula los cambios entre día y noche; agua para beber: libre; alimentación: alimento de ratón del cual los ratones ayunaron durante la noche antes de determinar el azúcar en sangre en ayunas. Los ratones fueron libres de comer lo que deseaban el resto del tiempo.

1.3 Compuestos de prueba

Tabla 4 Compuestos de prueba para el experimento animal

Nombre/Nombre abreviado	BG121 (LY3298176)	BG128
Especificación	2.69 mg	2.80 mg
Contenido	96.64%	95.61%
Característica	Polvo blanco	Polvo blanco
Condición preservación	-20°C	-20°C
Fuente	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.

1.4 4. Método de preparación de la muestra

Formulación de la solución madre de BG121 (1mg/ml): se pesó una cierta cantidad de BG121, se añadió un volumen adecuado de solvente (ácido cítrico 20

mM, pH 7.0) y la mezcla fue sub-ensugada en un tubo de 100 μ L y congelada a -80°C para su uso posterior;

Formulación de solución madre de BG128 (1mg/ml): se pesó una cierta cantidad de BG128, se añadió un volumen adecuado de solvente (ácido cítrico 20 mM, pH 7.0) y la mezcla fue posteriormente sub-ensugada a un tubo de 100 μ L y congelada a -80°C para uso posterior;

BG121 (0.0144 mg/ml, para administración de 30 nmol/kg): se tomaron 90 μ L de la solución madre de 1 mg/mL y se añadió a un EP de 10 mL conjuntamente con 810 μ L del solvente. La mezcla fue homogéneamente mezclada en un mezclador con vórtice y luego se añadió 5333 μ L del solvente y la mezcla fue mezclada homogéneamente en un mezclador con vórtice y usada el mismo día;

BG128 (0.0151 mg/ml, para administración de 30 nmol/kg): se tomaron 90 μ L de la solución madre de 1 mg/mL y se añadieron a un EP de 10 mL conjuntamente con 810 μ L del solvente. La mezcla fue homogéneamente mezclada en un mezclador con vórtice y luego se añadió 5044 μ L del solvente y la mezcla fue mezclada homogéneamente en un mezclador con vórtice y usada el mismo día;

BG128 (0.0050 mg/ml, para administración de 10 nmol/kg): se tomaron 2 mL de BG128 (0.0144 mg/ml) y se añadió 4 mL del solvente. La mezcla fue mezclada homogéneamente en un mezclador con vórtice y usada el mismo día.

2. Diseño experimental y método:

2.1 Diseño experimental

32 ratones BKS-DB macho de grado SPF (ratones db/db) fueron alimentados de forma adaptativa por 1 semana. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos de acuerdo con su nivel de glucosa sanguínea en ayunas y peso corporal: grupo de control con solvente, grupo de BG121 (30 nmol/kg), grupo de BG128 (30 nmol/kg), grupo de BG128 (10 nmol/kg) y se les alimentó con alimento para reproducción. Durante el experimento, los experimentadores observaron los signos y condiciones de salud de los animales de experimentación. Cualquier manifestación anormal de los animales, como dolor, depresión, disminución de la actividad, *etc.*, debía ser registrada en los registros experimentales originales. Si las manifestaciones anormales de los animales de experimentación excedían las regulaciones en los documentos relevantes para el cuidado animal, el animal podía

recibir la eutanasia después de la notificación. El diseño experimental se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5 Agrupamiento de ratones

Número de grupo	Grupo	Número	Compuesto	Concentración (mg/mL)
1	Grupo de control solvente	8	Ácido cítrico	-
2	Grupo BG121 (30 nmol/kg)	8	BG121	0.0144
3	Grupo BG128 (30 nmol/kg)	8	BG128	0.0151
4	Grupo BG128 (10 nmol/kg)	8	BG128	0.0050

2.2 Método experimental

Método de modelamiento: los ratones db/db desarrollarían diabetes tipo 2 espontánea luego de ser alimentados por 6 semanas y luego desarrollarían síntomas como obesidad, resistencia a la insulina e hiperglucemia;

Modo de administración: se pretendía usar una inyección subcutánea por una vía clínica de administración, siendo el volumen de administración 10 mL/kg, una vez cada 3 días por 22 días consecutivos;

Determinación de la glucosa sanguínea en ayunas: de acuerdo con el agrupamiento animal anteriormente mencionado y la dosis de administración se determinó la glucosa sanguínea en ayunas de los ratones dos días antes de la primera administración, además de determinarse el peso corporal. Los ratones macho de 8 semanas con glucosa sanguínea en ayunas mayor a 16.8 mmol/L fueron agrupados aleatoriamente de acuerdo con su nivel de glucosa sanguínea. Los niveles de glucosa sanguínea en ayunas fueron determinados los días 7, 13, 19 y 25 después de la primera administración (cambiando el nido y en ayunas antes de la determinación de glucosa sanguínea en ayunas) y los ratones permanecieron en ayunas;

Determinación de la glucosa sanguínea no en ayunas: la glucosa sanguínea fue determinada en los puntos de tiempo 1, 3, 6, 24, 48 y 72 horas después de la primera administración;

Determinación de peso corporal: determinado dos veces por semana;

Determinación de ingesta de alimento: determinada dos veces por semana.

2.3 Determinación de bioquímica sanguínea

Después de 25 días de administración se recolectaron muestras sanguíneas recolectando los globos oculares y se determinaron los contenidos de insulina sérica y hemoglobina glicosilada de los ratones respectivamente.

2.4 Procesamiento estadístico

Todos los datos de determinación informados fueron calculados usando el software GraphPad prism8.0 para la media del grupo y desviación estándar.

3. Resultados experimentales:

3.1 Cambios en la glucosa sanguínea no en ayunas en ratones db/db después de una sola administración de BG121 y BG128

Los ratones db/db fueron inyectados por vía subcutánea con BG121 (30 nmol/kg), BG128 (30 nmol/kg) y BG128 (10 nmol/kg), respectivamente y se determinaron los cambios en la glucosa sanguínea no en ayunas 1, 3, 6, 24, 48 y 72 h después de la primera administración. Los resultados mostraron que el nivel de glucosa sanguínea en cada punto de tiempo después de la administración de BG121 (30 nmol/kg) era menor que aquella en el grupo de control con solvente (Control). La administración de BG128 (30 nmol/kg) y BG128 (10 nmol/kg) puede reducir la glucosa sanguínea en cada punto de tiempo después de la administración en forma dependiente de la dosis (FIG. 3).

3.2 Cambios en la glucosa sanguínea en ayunas después de la administración de BG121 y BG128

De acuerdo con el método experimental, se administró BG121, BG128 y el solvente como control por vía subcutánea a ratones db/db continuamente y se midieron los niveles de glucosa sanguínea el día 7, 13, 19 y 25 después de la primera administración. Los resultados mostraron que el día 25 después de la primera administración de BG121 (30 nmol/kg) y BG121 (10 nmol/kg), la glucosa sanguínea en ayunas era significativamente menor que la del grupo del solvente (Control) y el día 19 y 25 después de la primera administración. el BG128 (30 nmol/kg) puede reducir significativamente el nivel de glucosa sanguínea en ayunas y el efecto hipoglucémico es dependiente de la dosis (FIG. 4).

3.3 Los cambios en el peso corporal de los ratones db/db después de la administración de BG121 y BG128

De acuerdo con el método experimental, se administró BG121, BG128 y el control con solvente (Control) a ratones db/db continuamente y se determinó el peso corporal de los ratones el día 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 22 después de la primera administración. Los resultados mostraron que después de la administración el peso corporal de los ratones en el grupo de administración de BG128 (30 nmol/kg) era menor de aquel en el grupo de control con solvente en todos los puntos de tiempo, aunque no hubo diferencia significativa en el peso corporal entre el grupo de administración de BG128 (10 nmol/kg), grupo de administración BG121 (30 nmol/kg) y grupo de control con solvente. Los resultados mostraron que el peso corporal de los ratones en el grupo de administración de BG128 (30 nmol/kg) fue significativamente menor que en el grupo de control con solvente y el grupo de administración de BG121 (30 nmol/kg) (FIG. 5).

3.4 Efectos de BG121 y BG128 en la hemoglobina glicosilada en ratones db/db

De acuerdo con el método experimental, se determinó el contenido de hemoglobina glicosilada en la sangre de los ratones 25 días después de la administración. Los resultados mostraron que 25 días después de la administración el contenido de hemoglobina glicosilada en la sangre de los ratones en el grupo de administración de BG128 (30 nmol/kg) era menor que aquel del grupo de control con solvente, aunque no hubo diferencia significativa en los contenidos de hemoglobina glicosilada entre los grupos de administración BG128 (10 nmol/kg), BG121 (30 nmol/kg) y el grupo de control con solvente. Los resultados mostraron que el contenido de hemoglobina glicosilada de los ratones en el grupo de administración de BG128 (30 nmol/kg) era significativamente menor que en el grupo de administración BG121 (30 nmol/kg) y que el grupo de control con solvente (FIG. 6).

3.5 Efectos de BG121 y BG128 en la insulina sérica en ratones db/db

De acuerdo con el método experimental se determinó el contenido de insulina en la sangre de los ratones después de 25 días de administración. Los resultados mostraron que 25 días después de la administración los contenidos de insulina en la sangre de los ratones en los grupos de administración BG128 (30 nmol/kg) y BG128 (10 nmol/kg) eran significativamente menores que en el grupo de control con

solvente en forma dependiente de la dosis, aunque no hubo diferencia significativa en los contenidos de insulina entre el grupo de administración BG121 (30 nmol/kg) y el grupo de administración con solvente (FIG. 7). Por una parte, el experimento probó que el compuesto de la presente divulgación no afecta la secreción de insulina cuando disminuye el azúcar en sangre y también confirma que en comparación con BG121, BG128 tiene un mejor efecto sobre la insulina cuando disminuye el azúcar en sangre.

Ejemplo experimental 3: Prueba del efecto inhibitorio de BG128 en la hiperglucemia en ratones db/db

1. Materiales experimentales

1.1 Animales de experimentación

55 ratones db/db de grado SPF de 6 a 8 semanas de edad fueron comprados a Zhejiang Vital River Experimental Animal Technology Co., Ltd.

1.2 La información de la muestra de prueba y muestra de referencia se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 6 Información de la muestra de prueba y muestra de referencia

Nombre	Muestra de prueba (BG128)	Muestra de Control (Tirzepatida, BG121)
Contenido	89.8%	87.42%
Estado físico	Sólido blanco	Sólido blanco
Condición de preservación	A la sombra, sellado, almacenado a -20°C o inferior	A la sombra, sellado, almacenado a -20°C o inferior
Proveedor	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.

1.3 Formulación de la muestra de prueba y muestra de referencia

De acuerdo con el régimen de dosis de la tabla 7, se pesó una cierta cantidad de Tirzepatida y BG128 y se añadió el vehículo (pH = 7.0, buffer citrato de sodio 20 mM) a la formulación a la concentración correspondiente. La formulación se realizó una vez cada 7 días y la mezcla formulada fue sub-ensada y almacenada a 2°C-8°C en la oscuridad.

2. Método experimental

2.1 Agrupamiento experimental

Antes de la administración y de acuerdo con el peso corporal y glucosa sanguínea en ayunas se agrupó a los animales en los siguientes grupos: grupo de db/db-ND, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg, cada grupo con 11 animales.

Revise la Tabla 7 para mayores detalles.

2.2 Régimen de administración

El día de la primera administración fue registrado como d1 y la hora fue registrada por analogía. Tirzepatida y BG128 fueron administrados una vez cada tres días y los puntos de tiempo fueron d1, d4, d7, d10, d13, d16, d19, d22, d25 y d28, un total de 10 administraciones. Revise la Tabla 7 para mayores detalles.

Tabla 7 Agrupamiento del experimento y régimen de administración

Agrupamiento	Número	CPD	Régimen de administración	Punto de tiempo de administración
Grupo-1	11	Vehículo	Administración subcutánea a 10 mL/kg	d1, d4, d7, d10, d13, d16, d19, d22, d25 y d28
Grupo-2	11	Tirzepatida	Administración subcutánea a 10 mL/kg o 0.15 mg/kg	
Grupo-3	11	BG128	Administración subcutánea a 10 mL/kg o 0.05 mg/kg	
Grupo-4	11	BG128	Administración subcutánea a 10 mL/kg o 0.15 mg/kg	
Grupo-5	11	BG128	Administración subcutánea a 10 mL/kg o 0.5 mg/kg	

2.3 Indicadores de prueba

5 Pesaje: los animales fueron pesados antes de recibir la administración una vez cada tres días hasta el final del experimento.

2.3.1 Ingesta de alimento del animal

La ingesta de alimento de los animales fue registrada empezando a los tres días antes del agrupamiento para administración hasta el final del experimento. La cantidad restante fue pesada antes de la administración en cada punto de tiempo.

10 2.3.2 Azúcar en sangre del animal

1) Determinación de glucosa sanguínea no en ayunas: primera administración 0 h (pre), 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h;

2) Glucosa sanguínea en ayunas: las fechas de determinación fueron respectivamente d-1 (antes del agrupamiento), d7, d13, d19, d25 y d31. Los animales se mantuvieron en ayunas por 6 horas y se determinó la glucosa en sangre en ayunas antes de la administración.

2.3.3 Determinación de bioquímica sanguínea

3 días después de la última administración se pesó a los animales y se les mantuvo en ayuno por 6 horas y se determinó la glucosa sanguínea en ayunas.

20 Después de la anestesia se recolectó una parte de sangre entera sin anticoagulantes a través del plexo venoso orbital y se almacenó a temperatura ambiente por 30 minutos y centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos. El suero fue separado y congelado a -80°C para la determinación del contenido de insulina sérica. Una parte de la

sangre entera sin anticoagulantes fue recolectada para determinar el contenido de HbA1c. La insulina sérica fue determinada por el método Elisa.

2.4 Análisis de datos

Los datos fueron organizados en Excel 2017 y Prism6.0 y expresados como Media $\pm$ SEM (error estándar). Se utilizó el análisis de ANOVA de una vía para el análisis y se seleccionó el método de Tukey para comparar la significancia entre grupos cuando se compararon dos grupos. Además se usó la prueba T-test para la prueba de dos colas entre los dos grupos. Cuando $p < 0.05$, había una diferencia significativa entre los dos grupos y cuando había un número pequeño de datos de determinación dentro del grupo que tenían grandes diferencias se usó GraphPad Prism6.0 para analizar los datos, identificar los valores atípicos y eliminar los valores con grandes diferencias.

3. Resultados

3.1 Peso corporal e índice de aumento de peso corporal

Los resultados de los cambios en el peso corporal de los animales y el índice de aumento de peso corporal (FIG. 8 y FIG. 9) mostraron que durante la primera administración, el peso corporal de los animales en cada grupo de administración mostró una tendencia a una disminución significativa y que la disminución en el peso corporal en los grupos que recibieron diferentes dosis de BG128 estaba positivamente relacionada con la dosis de administración y que después del día 3, el peso corporal de los animales de cada grupo de administración volvía a un aumento estable. En la última etapa de administración no hubo diferencia significativa en los cambios en el peso de los animales en cada grupo ($p > 0.05$).

Como se puede observar en la FIG. 8 y FIG. 9, a igual dosis el índice de pérdida de peso corporal del grupo de administración de BG128 fue mejor que el del grupo de administración de Tirzepatida, es decir, que la eficacia de BG128 fue mejor que la del control positivo Tirzepatida.

3.2 Ingesta de alimentos

Los resultados de los cambios en la ingesta de alimento de los animales (FIG. 10) mostraron que en comparación con el grupo de grupo de db/db-ND, la ingesta de alimento de los animales en cada grupo de administración disminuyó significativamente después de la primera administración y que la disminución en la

ingesta de alimentos en los grupos que recibieron diferentes dosis de BG128 estuvo positivamente relacionada con la dosis de administración. Después del d4, la ingesta de alimento de los animales en cada grupo de administración volvió a aumentar, fluctuando hacia abajo y arriba dentro de un pequeño rango y permaneció relativamente estable.

En la FIG. 10 puede observarse que a igual dosis, la disminución de ingesta de alimentos del grupo de administración de BG128 fue significativamente mayor que la del grupo de control positivo de Tirzepatida.

3.3 Glucosa sanguínea no en ayunas después de la primera administración

Los resultados del monitoreo de la glucosa sanguínea no en ayunas de los animales (FIG. 11) mostró que después de la primera administración, la glucosa sanguínea no en ayunas de los animales en el grupo de administración positiva de Tirzepatida 0.15 mg/kg fue disminuyendo rápidamente dentro de las 6 horas posteriores a la primera administración y gradualmente se recuperó para incrementarse dentro de las 6 a 72 h. La glucosa sanguínea no en ayunas de los animales en el grupo de administración de BG128 fue disminuyendo rápidamente dentro de las 24h posteriores a la primera administración, la glucosa sanguínea no en ayunas en el grupo de dosis baja (0.05 mg/kg) y dosis media (0.15 mg/kg) fue recuperándose gradualmente para aumentar dentro de las 24 h a 72 h después de la administración y la glucosa sanguínea no en ayunas de los animales en el grupo de dosis alta (0.5 mg/kg) se mantuvo en un rango relativamente bajo dentro de las 24 h a 72 h después de la administración y comparado con el grupo de db/db-ND, el grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg y el grupo de cada dosis de BG128 mostraron un efecto significativo de supresión de la glucosa sanguínea dentro de las 72 h después de la primera administración y el efecto de supresión de azúcar en sangre de BG128 fue dependiente de la dosis y mejor al del grupo de administración positiva de Tirzepatida-0.15 mg/kg a igual dosis.

3.4 Glucosa sanguínea en ayunas

Los resultados de monitoreo de la glucosa sanguínea en ayunas (FIG. 12 y Tabla 8) mostraron que en comparación con el grupo de db/db-ND, la glucosa sanguínea en ayunas de los animales en el grupo de Tirzepatida-0.15mg/kg y el grupo de cada dosis de BG128 había disminuido significativamente en diferentes

periodos de administración ($p < 0.05$) y que al final del experimento, la glucosa sanguínea en ayunas de cada grupo de dosis de BG128 había disminuido significativamente en comparación con el grupo de db/db-ND en forma dependiente de la dosis. El grupo de dosis alta de BG128 tuvo un mejor efecto para suprimir el

5 azúcar en sangre que el grupo de administración positiva de Tirzepatida-0.15mg/kg.

Tabla 8: Cambio en la glucosa sanguínea en ayunas de animales (mmol/L) (Media $\pm$ SD)

Grupo	Número	Día 0 (n = 11)	Día 7 (n = 11)	Día 13 (n = 11)	Día 19 (n = 11)	Día 25 (n = 11)	Día 31 (n = 11)
db/db-ND	11	23.15 $\pm$ 1.14	28.30 $\pm$ 1.07	25.49 $\pm$ 1.18	32.93 $\pm$ 0.41	33.04 $\pm$ 0.50	32.46 $\pm$ 1.20
Tirzepatida 0.15 mg/kg	11	23.16 $\pm$ 1.10	25.39 $\pm$ 1.75	19.12 $\pm$ 1.02 ^a	16.65 $\pm$ 1.82 ^c	13.86 $\pm$ 1.12 ^c	22.85 $\pm$ 1.86 ^c
BG128 0.05 mg/kg	11	23.18 $\pm$ 1.15	21.68 $\pm$ 1.77 ^b	21.68 $\pm$ 1.11	24.30 $\pm$ 1.41 ^c	18.32 $\pm$ 1.37 ^c	20.15 $\pm$ 1.91 ^c
BG128 0.15 mg/kg	11	23.17 $\pm$ 1.19	22.78 $\pm$ 1.11 ^a	21.58 $\pm$ 1.13	26.14 $\pm$ 1.05 ^b	15.70 $\pm$ 1.50 ^c	20.38 $\pm$ 1.87 ^c
BG128 0.5 mg/kg	11	22.99 $\pm$ 1.35	15.54 $\pm$ 1.49 ^c	16.79 $\pm$ 1.20 ^c	13.26 $\pm$ 1.91 ^c	11.85 $\pm$ 1.74 ^c	16.41 $\pm$ 1.68 ^c

a: * $p < 0.05$ vs. db/db-ND, por ANOVA de dos vías, prueba de Tukey

10 b: ** $p < 0.01$ vs. db/db-ND, por ANOVA de dos vías, prueba de Tukey

c: *** $p < 0.001$ vs. db/db-ND, por ANOVA de dos vías, prueba de Tukey

3.5 Insulina sérica

Los resultados de determinación de insulina sérica animal (FIG. 13 y Tabla 9)

15 mostraron que las concentraciones de insulina sérica de los animales en el grupo de Tirzepatida-0.15mg/kg y cada grupo de dosis de BG128 disminuyeron y que la insulina sérica de cada grupo de dosis de BG128 tuvo una disminución estadísticamente significativa en comparación con el grupo del modelo ($p = 0 < 0.05$).

20 La FIG. 13 muestra que la disminución de la concentración de la insulina sérica del grupo BG128 fue significativamente mayor que la del grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg a igual dosis.

Tabla 9: Cambio de insulina en sangre (nIU/mL) (Media $\pm$ SD)

Grupo	db/db-ND (n = 11)	Tirzepatida-0.15 mg/kg (n = 11)	BG128-0.05 mg/kg (n = 11)	BG128-0.15 mg/kg (n = 11)	BG128-0.5 mg/ kg (n = 11)
Insulina (nIU/mL)	48991.0±376 8.0	39227.0±2788.0	37649.0±3597.0 ^a	30897.0±5634.0 ^a	32774.0±6290.0 ^a

a: * $p < 0.05$ vs. db/db-ND, por análisis de prueba T

3.6 Porcentaje de HbA1C en sangre entera (%)

Los resultados de % de HbA1C en sangre entera (FIG. 14 y Tabla 10) mostraron que en comparación con el grupo de db/db-ND, los porcentajes de HbA1C en sangre entera con anticoagulantes de los animales en el grupo de Tirzepatida-0.15mg/kg y el grupo de cada dosis de BG128 disminuyeron significativamente ($p < 0.001$), el % de HbA1C en la sangre entera con anticoagulantes del grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg disminuyó en 1.88%, 1.80%, 1.83% y 2.54%, respectivamente, en forma dependiente de la dosis.

La FIG. 15 muestra que los efectos del grupo de BG128 y el grupo de Tirzepatida a igual dosis es comparable. La disminución en el grupo de BG128 de dosis alta fue significativamente mayor que en el Tirzepatida-0.15 mg/kg y el grupo de BG128-0.15 mg/kg ($p < 0.01$).

Tabla 10: Cambio en la hemoglobina glucosilada (Media ± SEM)

Grupo	db/db-ND (n = 11)	Tirzepatida- 0.15 mg/kg (n = 11)	BG128-0.05 mg/kg (n = 11)	BG128-0.15 mg/kg (n = 11)	BG128-0.5 mg/ kg (n = 11)
Hb	134.40±1.46	129.30±1.38	128.10±5.30	131.60±1.23	140.80±2.02*
HbA1C	7.87±0.24	5.16±0.19***	5.18±0.23***	5.31±0.19***	4.68±0.20***
HbA1C%	5.87±0.18	3.99±0.14 ^a	4.07±0.13 ^a	4.04±0.14 ^a	3.33±0.16 ^{abde}
Disminución %HbA1C	NA	1.88%±0.14 ^a	1.80%±0.13 ^a	1.83%±0.14 ^a	2.54%±0.16 ^{ab}

a: *** $p < 0.001$ vs. db/db-ND, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

b: # $p < 0.05$ vs. Tirzepatida-0.15mg/kg, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

c: ## $p < 0.01$ vs. Tirzepatida-0.15mg/kg, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

d: & $p < 0.05$ vs. BG128-0.05mg/kg, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

e: \$ $p < 0.05$ vs. BG128-0.15mg/kg, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

4. Conclusión

Los ratones db/db se derivan de una herencia autosómica recesiva de la cepa endogámica C57BL/KsJ y pertenecen a animales del modelo de diabetes tipo II. Bajo las condiciones del presente experimento, la glucosa sanguínea de los animales antes del agrupamiento era superior a 16.7 mmol/L y el tratamiento con el control positivo Tirzepatida puede inhibir significativamente la hiperglucemia en ratones db/db y reducir los contenidos de insulina y hemoglobina glucosilada en la sangre periférica, indicando que el modelo es estable y confiable.

El BG128 puede causar disminuciones agudas en el peso sanguíneo y la ingesta de alimentos en ratones db/db que pueden permanecer relativamente estables después de la administración. BG128 puede reducir significativamente la glucosa sanguínea no en ayunas después de la primera administración y la eficacia de BG128 es superior a la de Tirzepatida a igual dosis y BG128 puede inhibir significativamente la glucosa sanguínea en ayunas de ratones db/db y reducir los contenidos de insulina y hemoglobina glicosilada en la sangre periférica.

Ejemplo experimental 4: Prueba del efecto farmacodinámico de BG128 en el modelo de ratón C57BL/6 con diabetes inducida por STZ y alimentos HFD combinados con NASH

1. Materiales del experimento

1.1 La información de la muestra de prueba y muestra de referencia se muestran en la Tabla 11 a continuación

Tabla 11 Información de la muestra de prueba y muestra de referencia

Nombre	Muestra de prueba (BG128)	Muestra de control (Tirzepatida)
Contenido	79.0%	87.4%
Estado físico	Sólido blanco	Sólido blanco
Condición de preservación	A la sombra, sellado, almacenado a -20°C o inferior	A la sombra, sellado, almacenado a -20°C o inferior
Proveedor	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.	BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.

1.2 Formulación de la muestra de prueba y muestra de referencia

De acuerdo con el régimen de dosis, se pesó una cierta cantidad de Tirzepatida y BG128 y se añadió el vehículo (pH = 7.0, buffer citrato de sodio 20 mM) a la fórmula a la concentración correspondiente.

1.3 Sistema del experimento

1.3.1 Información del animal de experimentación

Germline: C57BL/6

Grado: nivel SPF

- 5 Número y género: 30 ratones hembra preñadas
Proveedor: Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co.,Ltd.

1.3.2 Gestión de alimentación animal

Los animales fueron mantenidos en el sistema de barrera, siendo controladas las condiciones ambientales en la sala de animales como temperatura ambiente de
10 20°C a 26°C y humedad de 40% a 70% y los criadores registraron datos una vez en la mañana y en la tarde. Los animales bebían de manera libre y recibían alimentación normal.

2. Diseño del experimento

2.1 Método de modelamiento

15 Se inyectó subcutáneamente a los recién nacidos macho STZ (100 µg/ratón) dentro de las 48 h posteriores al nacimiento y fueron alimentados por los ratones hembra por cuatro semanas, luego se determinó la glucosa sanguínea en ayunas de los ratones macho. Usando nivel de glucosa sanguínea en ayunas mayor que o igual a 12 mmol/L como estándar, se seleccionó 65 ratones macho diabéticos como
20 animales experimentales, los que fueron alimentados con comida HFD por 8 semanas para establecer un modelo de ratón macho C57BL/6 con diabetes inducida por STZ+ alimentos HFD combinado con NASH.

2.2 Agrupamiento del experimento

Se seleccionaron 10 ratones macho recién nacidos, sin inyección STZ que
25 fueron alimentados por los ratones hembra por cuatro semanas. Los ratones macho fueron separados en jaulas y alimentados con alimento de mantenimiento normal y usados como el grupo de control normal. Otros ratones recibieron alimento HFD por una semana y se determinó la glucosa sanguínea en ayunas de los animales y de acuerdo con su glucosa sanguínea en ayunas y peso corporal los animales fueron
30 agrupados aleatoriamente en el grupo de control normal, grupo del modelo, grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg, grupo de BG128-0.05 mg/kg, grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg. Revise la Tabla 12 para mayores detalles.

2.3 Régimen de administración

La administración se inició el primer día de la semana 2 de alimentación con alimento HFD y el experimento concluyó después de 7 semanas de administración continua. El régimen de administración específico se muestra en la Tabla 12.

5

Tabla 12: Agrupamiento experimental y régimen de administración

Agrupamiento	Número	STZ+HFD	Compuesto	Régimen de administración
Grupo-1	10	NO	Vehículo	Administración subcutánea a 10 mL/kg, una vez cada tres días
Grupo-2	13	Sí	Vehículo	Administración subcutánea a 10 mL/kg, una vez cada tres días
Grupo-3	13	Sí	Tirzepatida	Administración subcutánea a 10 mL/kg o 0.15 mg/kg, una vez cada tres días
Grupo-4	13	Sí	BG128	Administración subcutánea a 10 mL/kg o 0.05 mg/kg, una vez cada tres días
Grupo-5	13	Sí	BG128	Administración subcutánea a 10 mL/kg o 0.15 mg/kg, una vez cada tres días
Grupo-6	13	Sí	BG128	Administración subcutánea a 10 mL/kg o 0.5 mg/kg, una vez cada tres días

2.4 Indicadores de prueba

2.4.1 Observación general

10 Se realizó la observación al inicio del experimento, una vez al día, hasta el fin del experimento.

Contenido de la observación: muerte o agonía del animal, estado mental, actividad conductual, propiedad de las heces, alimentación, condiciones de ingesta de agua y similares fueron observadas a un lado de la jaula.

15 2.4.2 Peso corporal del animal

Los animales fueron pesados una vez cada tres días desde el momento de la alimentación con alimento HFD hasta el final del experimento.

2.4.3 Ingesta de alimentos del animal

La ingesta de alimentos de los animales fue registrada desde el momento de la alimentación con alimento HFD hasta el final del experimento. La cantidad restante era pesada en cada punto de tiempo antes de la administración.

2.4.4 Glucosa sanguínea en ayunas del animal

5 La glucosa sanguínea en ayunas fue determinada usando el medidor de glucosa sanguínea de Roche después de las 4 semanas de lactancia por parte de los ratones hembra (es decir, antes de la alimentación con alimento HFD), antes de la administración y 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas y 7 semanas después de la administración y al final del experimento.

10 2.4.5 Determinación de bioquímica clínica

3 días después de la última administración los animales fueron pesados y se les mantuvo en ayunas por 6 horas. Todos los animales del experimento fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico y se recolectó sangre entera sin anticoagulantes a través del plexo venoso orbital, se mantuvo a 15 temperatura ambiente por 30 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos. El suero fue separado y congelado a -80°C para la determinación bioquímica y se recolectó sangre entera con anticoagulantes EDTA-K2 a través del plexo venoso orbital y se colocó en hielo corriente para la determinación del contenido de HbA1C.

La muestra de suero fue tomada desde -80°C y se determinaron los contenidos 20 de ALT, AST, TG, TC, HDL-c y LDL-c en sangre y HbA1C en sangre entera usando un detector bioquímico automático Hitachi 7060 y el contenido de insulina se determinó por medio de un kit de análisis de inmunoadsorción enzimática. Los parámetros de determinación se muestran en la Tabla 13 a continuación:

Tabla 13

Parámetro	Unidad
Alanino aminotransferasa (ALT)	U/L
Aspartato aminotransferasa (AST)	U/L
Triglicérido (TG)	mmol/L
Colesterol Total (TC)	mmol/L
Lipoproteína de alta densidad (HDL-c)	mmol/L
Lipoproteína de baja densidad (LDL-c)	mmol/L

Hemoglobina glicosilada (HbA1C)	%
Insulina	nIU/ml

2.4.6 Análisis hepático NAS

Los ratones fueron disecados de acuerdo con el procedimiento. Después de la perfusión con solución salina normal pre-enfriada se tomó, fotografió y pesó el hígado y se sumergió en formalina al 10% y se fijó para tinción HE patológica. Las secciones hepáticas en parafina de todos los animales recibieron tinción HE de acuerdo con el SOP estándar de tinción patológica con KCI. Todas las secciones con tinción fueron escaneadas panorámicamente por un escáner NanoZoomer Digital Pathology (S210, Hamamaci, Japón) y luego observados a diferentes aumentos seleccionando diferentes campos de vista. Los diferentes lóbulos hepáticos en las secciones fueron calificados y los criterios de calificación se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: criterios de calificación NAS para esteatohepatitis no alcohólica

Hallazgo patológico	Criterios de evaluación	Puntaje
Inflamación de célula hepática	Ninguno	0
	Pequeña cantidad de inflamación celular	1
	Gran cantidad de inflamación celular	2
Inflamación dentro del lóbulo hepático: focos inflamatorios	Ninguna	0
	< 2 focos inflamatorios /campo de visión 200x	1
	2-4 focos inflamatorios /campo de visión 200x	2
	> 4 focos inflamatorios /campo de visión 200x	3
Esteatosis hepática: Área ocupada en todo el segmento	< 5%	0
	5%-33%	1
	> 33%-66%	2
	> 66%	3
Base patológica de diagnóstico		Puntaje Total (NAS)
NASH o en riesgo de desarrollar NASH		> 5
Sospecha de NASH		3-4
No NASH		< 2

2.4.7 Análisis de fibrosis hepática

Los ratones fueron disecados de acuerdo con el procedimiento. Después de la perfusión con solución salina normal pre-enfriada el hígado fue tomado, fotografiado, pesado, sumergido en formalina al 10% y fijado para tinción patológica rojo sirius (SR). Las secciones de hígado con parafina recibieron tinción con SR de acuerdo con el SOP estándar de tinción patológica con KCI. Todas las secciones con tinción fueron escaneadas panorámicamente con escáner NanoZoomer Digital Pathology (S210, Hamamaci, Japón) y el área de la fibrosis hepática fue analizada en las secciones con tinción con SR escaneadas panorámicamente usando el software VIS7.0 para calcular el porcentaje del área de fibrosis hepática en toda el área de la sección.

3. Análisis de datos

Los datos fueron organizados en Office Excel 2013 y GraphPad Prism6.0 y los datos fueron expresados como Media $\pm$ SEM. Se utilizó un análisis ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías para el análisis y los métodos de prueba adecuados para comparar la significancia entre los grupos, como Tukey y Dunnett fueron seleccionados como método de análisis. Cuando se compararon los dos grupos, se usó la prueba T para la prueba de dos colas entre los dos grupos. Cuando $p < 0.05$, hubo una diferencia significativa entre los dos grupos.

4. Resultados

4.1 Cambio en el número de animales

Los modelos animales de NASH creados por inducción de STZ + HFD tienen una cierta tasa de mortalidad. Las manifestaciones clínicas de los animales antes de la muerte fueron extremidades blancas y disminución de la actividad. Esas manifestaciones se debieron a la menor circulación sanguínea causada por los trastornos metabólicos, son el comportamiento normal del modelo y son consistentes con los antecedentes históricos. Los animales en los grupos de Tirzepatida-0.15 mg/kg, BG128-0.15 mg/kg y BG128-0.50 mg/kg tienen una buena tolerancia, indicando que el control positivo Tirzepatida y BG128 tienen ciertos efectos protectores en los animales del modelo. En el diseño del experimento, 3 animales fueron añadidos a cada grupo (excepto al grupo de control normal) y todos los

animales que sobrevivieron al final del experimento fueron incluidos en las estadísticas de datos. Los detalles se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Número de animales

Agrupamiento	Número planeado	Número enrolado	Número al punto final	STZ+HFD	Compuesto	Número y fecha de muertes animales	Causa de muerte animal
Grupo-1	10	10	10	NO	Vehículo	0	-
Grupo-2	10	13	9	Sí	Vehículo	3 (Día 30, 42 y 45)	El propio modelo
Grupo-3	10	13	13	Sí	Tirzepatida	0	-
Grupo-4	10	13	11	Sí	BG128	2 (Día 45, 51)	El propio modelo
Grupo-5	10	13	13	Sí	BG128	0	-
Grupo-6	10	13	13	Sí	BG128	0	-

Nota: -: No aplicable.

5

4.2 Peso corporal de los animales

Los resultados de los cambios en el peso corporal de los animales (FIG. 16) mostraron que después de la primera administración el peso corporal de los animales en cada grupo de administración mostró una tendencia a una disminución significativa y que la disminución en el peso corporal en los grupos que recibieron diferentes dosis de BG128 se relacionada positivamente con la dosis de administración. Además que después del día 12, el peso corporal de los animales en cada grupo de administración volvió a un aumento estable, pero fue significativamente menor que en el grupo del modelo general. En la última etapa de administración, no hubo diferencia significativa en los cambios en el peso corporal de los animales en cada grupo de administración ($p > 0.05$).

4.3 Ingesta de alimentos

Los resultados de los cambios en la ingesta de alimento de los animales (FIG. 17) mostraron que en comparación con el grupo normal, la ingesta de alimentos de los animales en cada grupo de alimentación alta en grasa fue menor que la ingesta de alimento de los animales en el grupo normal con alimento normal y durante todo el experimento no hubo diferencias estadísticas en la ingesta de alimentos entre el grupo del modelo y cada grupo de administración ($p > 0.05$). Puede observarse en la FIG. 17 que la ingesta de alimento de los animales que recibieron BG128 en el grupo

con igual dosis es menor que aquella de los animales que recibieron Tirzepatida en el grupo con igual dosis.

4.4 Glucosa sanguínea en ayunas

Los resultados de determinación de glucosa sanguínea en ayunas de los animales mostraron que en comparación con el grupo normal, la glucosa sanguínea en ayunas de los animales del modelo aumentó significativamente antes de recibir la HFD; la glucosa sanguínea de los animales del modelo después de recibir la HFD por una semana fue significativamente mayor que antes de la alimentación HFD y desde el inicio de la administración al final del experimento la glucosa sanguínea en ayunas de los animales en todos los grupos de administración fue significativamente menor en comparación con el grupo del modelo ($p < 0.001$) (Tabla 16 y FIG. 18). Al final del experimento, la glucosa sanguínea en ayunas de cada grupo de dosis de BG128 disminuyó significativamente en comparación con la del grupo de db/db-ND en forma dependiente de la dosis. Los efectos del grupo de BG128 y el grupo de Tirzepatida a igual dosis fue comparable.

Tabla 16: Glucosa sanguínea en ayunas (mmol/L) (Media $\pm$ SEM)

Grupo	Grupo de control normal	Grupo de modelo	Tirzepatida 0.15 mg/kg	BG128 0.05 mg/kg	BG128 0.15 mg/kg	BG128 0.5 mg/kg
Número	n = 10	n = 9	n = 13	n = 11	n = 13	n = 13
Antes de HFD	7.07 $\pm$ 0.37	15.90 $\pm$ 0.91	16.95 $\pm$ 0.98	18.28 $\pm$ 1.18	17.69 $\pm$ 0.81	18.59 $\pm$ 0.88
Antes de la administración	10.02 $\pm$ 0.40	25.29 $\pm$ 1.01	25.33 $\pm$ 1.01	25.59 $\pm$ 0.91	25.71 $\pm$ 0.91	25.81 $\pm$ 1.08
Administración por 1 semana	9.82 $\pm$ 0.39	29.43 $\pm$ 0.63	15.15 $\pm$ 1.63 ^a	15.62 $\pm$ 1.42 ^a	15.43 $\pm$ 1.66 ^a	11.39 $\pm$ 0.86 ^a
Administración por 2 semanas	8.98 $\pm$ 0.30	27.98 $\pm$ 0.46	12.58 $\pm$ 0.96 ^a	14.13 $\pm$ 1.61 ^a	14.61 $\pm$ 1.45 ^a	12.82 $\pm$ 1.12 ^a
Administración por 3 semanas	9.78 $\pm$ 0.26	27.42 $\pm$ 0.52	12.32 $\pm$ 1.07 ^a	16.89 $\pm$ 1.85 ^a	14.83 $\pm$ 1.49 ^a	13.35 $\pm$ 1.37 ^a
Administración por 4 semanas	8.14 $\pm$ 0.43	29.02 $\pm$ 0.46	11.08 $\pm$ 1.43 ^a	12.89 $\pm$ 1.83 ^a	14.52 $\pm$ 2.09 ^a	11.39 $\pm$ 1.20 ^a
Administración por 5 semanas	7.91 $\pm$ 0.31	27.67 $\pm$ 0.61	15.58 $\pm$ 1.58 ^a	18.32 $\pm$ 1.62 ^a	15.75 $\pm$ 1.81 ^a	12.31 $\pm$ 1.47 ^a
Administración por 6 semanas	8.47 $\pm$ 0.26	28.79 $\pm$ 0.56	15.90 $\pm$ 1.50 ^a	21.82 $\pm$ 2.11 ^a	17.88 $\pm$ 2.05 ^a	12.17 $\pm$ 1.70 ^{abd}

Administración por 7 semanas	7.50±0.13	28.37±0.61	15.49±1.26 ^a	18.89±1.89 ^a	17.26±1.97 ^a	10.45±1.34 ^{acd}
Punto final	7.87±0.21	29.31±0.42	13.55±1.25 ^a	15.81±1.83 ^a	16.85±2.04 ^a	12.27±1.61 ^a

a: *** $p < 0.001$ vs. grupo del modelo, por ANOVA de dos días, prueba de Tukey

b: # $p < 0.05$ vs. BG128-0.05 mg/kg, por ANOVA de dos días, prueba de Tukey

c: ### $p < 0.001$ vs. BG128-0.05 mg/kg, por ANOVA de dos días, prueba de Tukey

d: \$\$\$ $p < 0.001$ vs. BG 128-0.15 mg/kg, por ANOVA de dos días, prueba de

5 Tukey

4.5 Insulina

Los resultados de cambios en la insulina (FIG. 19) mostró que las concentraciones de insulina sérica de los animales en el grupo Tirzepatida-
 10 0.15mg/kg y cada grupo de dosis de BG128 había disminuido y que la insulina sérica del grupo de BG128-0.15 mg/kg y grupo de BG128-0.5 mg/kg era estadísticamente significativa en comparación con grupo de db/db-ND ($p < 0.05$). El efecto del grupo BG128 fue mejor que aquel del grupo de Tirzepatida a igual dosis.

4.6 % de HbA1C

El resultado del cambio en el % de HbA1C en la sangre periférica (Tabla 17) mostró que después de la administración el % de HbA1c del grupo del modelo aumentó significativamente en comparación con la del grupo de control normal; el % de HbA1c del grupo de Tirzepatida y cada grupo de dosis de BG128 mostró
 15 disminución en diferentes grados y el % de HbA1c del grupo de BG128-0.5 mg/kg había disminuido significativamente en comparación con el del grupo del modelo ($p < 0.05$); y tomando el % de HbA1C del grupo del modelo como valor basal, el % de HbA1c del grupo de Tirzepatida y cada grupo de dosis de BG128 había disminuido
 20 en 0.83%, 0.97%, 0.66% y 1.04%, respectivamente (FIG. 20). Los efectos del grupo de BG128 y el de Tirzepatida a igual dosis son comparables.

25

Tabla 17: Cambio en hemoglobina glicosilada (Media $\pm$ SEM)

Grupo	Grupo de control normal	Grupo de modelo	Tirzepatida 0.15 mg/kg	BG128 0.05 mg/kg	BG128 0.15 mg/kg	BG128 0.5 mg/kg
Número	n = 10	n = 9	n = 13	n = 11	n = 13	n = 13
%HbAC	1.35±0.03	1.97±0.47	1.14±0.14	1.00±0.23	1.31±0.19	0.94±0.25 ^a

Porcentaje de disminución en %HbAC	-	-	-0.83±0.14	-0.97±0.23	-0.66±0.19	-1.04±0.25
------------------------------------	---	---	------------	------------	------------	------------

a: * $p < 0.05$ vs. grupo del modelo, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

4.7 Función hepática e indicadores bioquímicos relacionados con lípidos en sangre

5 Los resultados de la función hepática y los indicadores bioquímicos relacionados con lípidos en sangre mostraron (Tabla 18 y FIGS. 21-23) que en comparación con el grupo del modelo, la ALT y AST del grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg y cada grupo de dosis de BG128 disminuyeron y que hubo una diferencia significativa entre la disminución del grupo de BG128-0.15 mg/kg y la disminución del grupo de dosis de 0.5 mg/kg (FIG. 21); el colesterol total y triglicéridos del grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg y cada grupo de dosis de BG128 disminuyeron significativamente (FIG. 22); y la lipoproteína de baja densidad del grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg y cada grupo de dosis de BG128 disminuyó significativamente aunque la lipoproteína de alta densidad no tuvo cambios significativos (FIG. 23). El efecto del grupo BG128 fue mejor que el del grupo de Tirzepatida a igual dosis.

Tabla 18: Resultados de determinación bioquímica clínica (Media ± SEM)

Grupo	Grupo de control normal	Grupo del modelo	Tirzepatida 0.15 mg/kg	BG128 0.05 mg/kg	BG128 0.15 mg/kg	BG128 0.5 mg/kg
Número	n = 10	n = 9	n = 13	n = 11	n = 13	n = 13
ALT (U/L)	62.08±4.56 ^a	104.67±7.22	79.23±10.51	73.97±9.20	67.58±7.73 ^a	58.46±5.38 ^b
AST (U/L)	89.55±4.70 ^c	185.44±14.85	158.77±11.64	155.44±10.85	152.48±6.56 ^a	150.54±6.26 ^a
TC (mmol/L)	2.68±0.16 ^c	7.64±1.98	3.58±0.21 ^c	3.81±0.15 ^c	3.25±0.12 ^c	3.53±0.09 ^c
TG (mmol/L)	0.83±0.02 ^b	5.33±2.39	0.86±0.08 ^b	1.09±0.20 ^b	0.84±0.12 ^b	0.88±0.14 ^b
HDL-c (mmol/L)	1.76±0.25 ^a	3.59±0.45	2.04±0.19	2.30±0.09	1.83±0.22	2.13±0.13
LDL-c (mmol/L)	0.45±0.05 ^c	0.97±0.25	0.73±0.09 ^c	0.56±0.03 ^b	0.65±0.10 ^c	0.62±0.03 ^c

a: * $p < 0.05$ vs. grupo del modelo, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

b: ** $p < 0.01$ vs. grupo del modelo, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

c: *** $p < 0.001$ vs. grupo del modelo, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey

d: $p < 0.01$ vs. grupo del modelo; e: $p < 0.01$ vs. grupo del modelo, por T-test

4.8 Histopatología hepática

5 4.8.1 Evaluación NAS

Los cambios patológicos del hígado fueron evaluados usando tinción H&E. La esteatosis hepática en el grupo del modelo mostró degeneración vacuolar hepática ampliamente distribuida en los lóbulos hepáticos. La inflamación hepática interlobular mostraba infiltración focal de células inflamatorias diseminada en los lóbulos hepáticos, aunque no se observaron lesiones por balonamiento (Tabla 19 y FIG. 24). En la FIG. 24, A: grupo de control normal; B: grupo del modelo; C: Tirzepatida -0.15 mg/kg; D: BG128-0.05 mg/kg; E: BG128-0.15 mg/kg; F: BG128-0.5 mg/kg. A partir de la FIG. A puede observarse que los hepatocitos estaban bien organizados y que la estructura celular estaba completa. A partir de la FIG. B puede observarse esteatosis hepática (flecha amarilla) e infiltración de células inflamatorias (flecha negra) y en las FIGS. C, D, E y F puede observarse diferentes grados de infiltración de células inflamatorias y reducción de esteatosis hepática.

De acuerdo con el estándar de calificación NAS en la Tabla 14, la esteatosis hepática, inflamación interlobular hepática y puntaje NAS del grupo del modelo eran significativamente mayores que las del grupo normal ($P < 0.001$).

En comparación con el grupo del modelo, el grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg y cada grupo de dosis de BG128 redujeron significativamente los puntajes de infiltración de células inflamatorias hepáticas y esteatosis hepática (FIG. 25).

En comparación con el grupo del modelo, el grupo de Tirzepatida-0.15 mg/kg y cada grupo de dosis de BG128 redujo significativamente el puntaje total de NAS ($p < 0.001$) (FIG. 26).

Tabla 19: Resultados histopatológicos (Media $\pm$ SEM)

Grupo	Número	Esteatosis	Infiltración de células inflamatorias	Lesión balonamiento	Puntaje total de NAS
Grupo de control normal	10	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00 ^a
Grupo del modelo	9	1.44 $\pm$ 0.26	1.63 $\pm$ 0.13	0.00 $\pm$ 0.00	3.07 $\pm$ 0.19

Tirzepatida-0.15 mg/kg	13	0.44±0.14 ^a	1.05±0.07 ^a	0.00±0.00	1.49±0.19 ^a
BG128-0.05 mg/kg	11	0.52±0.12 ^a	0.91±0.08 ^a	0.00±0.00	1.42±0.14 ^a
BG128-0.15 mg/kg	13	0.46±0.13 ^a	0.90±0.06 ^a	0.00±0.00 ^a	1.36±0.15 ^a
BG128-0.5 mg/kg	13	0.33±0.08 ^a	1.03±0.05 ^a	0.00±0.00	1.36±0.10 ^a

*a: ***p < 0.001 vs. grupo del modelo, por ANOVA de una vía, prueba de Tukey*

4.8.2 Evaluación de fibrosis hepática

La tinción con rojo sirius mostró que la fibrosis estaba distribuida principalmente en la vena porta, vena central y región intercelular (FIG. 27). En la FIG. 27, A: grupo de control normal; B: grupo del modelo; C: Tirzepatida -0.15 mg/kg; D: BG128-0.05 mg/kg; E: BG128-0.15 mg/kg; F: BG128-0.5 mg/kg. La FIG. A muestra que no había formación de fibrosis entre los cordones de las células hepáticas y las FIGS. B, C, D, E y F había fibras rojas formadas entre los cordones de las células hepáticas.

Un análisis semicuantitativo de la fibrosis hepática mostró (Tabla 20) que la tasa de fibrosis del grupo del modelo fue de $1.32 \pm 0.02\%$, que es significativamente mayor que la del grupo de control normal ($p < 0.001$). La tasa de fibrosis de cada grupo de dosis de BG128 se redujo significativamente en comparación con la del grupo del modelo (Tabla 20 y FIG. 28).

Tabla 20: Porcentaje de Fibrosis (Media $\pm$ SEM)

Grupo	Grupo de control normal	Grupo del modelo	Tirzepatida 0.15 mg/kg	BG128 0.05 mg/kg	BG128 0.15 mg/kg	BG128 0.5 mg/kg
Número	n = 10	n = 9	n = 13	n = 11	n = 13	n = 13
Fibrosis (%)	0.61±0.03 ^c	1.32±0.06	1.32±0.11	1.11±0.05 ^a	1.10±0.04 ^b	1.07±0.05 ^c

*a: *p < 0.05 vs. grupo del modelo, por T-test*

*b: **p < 0.01 vs. grupo del modelo, por T-test*

*c: ***p < 0.001 vs. grupo del modelo, por T-test*

5. Conclusión

En el experimento se usó el modelo de ratones macho C57 BL/6 con diabetes inducida por STZ y alimentos HFD combinado con NASH. En el grupo del modelo, la glucosa sanguínea en ayunas y % de HbA1c aumentaron significativamente, los indicadores bioquímicos séricos relacionados con la función hepática y los lípidos

en sangre aumentaron significativamente y los indicadores histopatológicos hepáticos cambiaron significativamente, incluyendo la esteatosis hepática, aumento de la inflamación interlobular hepática, aumento del puntaje NAS y exacerbamiento de la fibrosis hepática. Los síntomas fueron similares a las características clínicas de la hiperglucemia y NASH en humanos, lo que indica que el modelo es estable y confiable.

BG128 tiene un obvio efecto terapéutico en el modelo C57BL/6 con diabetes inducida por STZ-HFD combinado con NASH y cada grupo de dosis de BG128 puede reducir significativamente la glucosa sanguínea en ayunas, la insulina y el % de HbA1c y tiene un cierto efecto protector en los animales del modelo de forma dependiente de la dosis. El BG128 puede mejorar significativamente la función hepática y los indicadores bioquímicos clínicos relacionados con lípidos en sangre, reduce el puntaje NAS hepático y la tasa de fibrosis además de retardar significativamente el progreso del NASH y proceso de la fibrosis. En general, la eficacia de BG128 es superior a la del fármaco de control Tirzepatida a igual dosis.

Todas las características técnicas divulgadas en la especificación pueden ser combinadas en cualquier combinación. Cada característica divulgada en la especificación también puede ser reemplazada con otras características que tengan el mismo efecto, efecto equivalente o similar. Por tanto, a menos que se indique específicamente, cada característica divulgada solo es un ejemplo de una serie de características equivalentes o similares.

Adicionalmente, de acuerdo con la descripción anteriormente mencionada, una persona versada en el arte puede entender fácilmente las características clave de la presente divulgación a partir de la presente divulgación. Pueden realizarse diferentes modificaciones a la presente invención para adaptarse a diferentes objetivos y condiciones de uso sin alejarse del espíritu y alcance de la presente divulgación y por tanto tales modificaciones también deben considerar el alcance de las reivindicaciones en el apéndice.