



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월06일
(11) 등록번호 10-1895047
(24) 등록일자 2018년08월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/26 (2006.01) *A61K 47/30* (2017.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-0147684
(22) 출원일자 2011년12월30일
심사청구일자 2016년10월31일
(65) 공개번호 10-2013-0078634
(43) 공개일자 2013년07월10일
- (56) 선행기술조사문헌
WO2010107256 A2*
Advanced Drug Delivery Reviews 제54권, 제4호,
제459-476면(2002.06.17.)*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
한미사이언스 주식회사
경기도 화성시 팔탄면 무하로 214
(72) 발명자
김승수
서울특별시 강남구 개포로110길 15 115동 1302호
(일원동, 우성7차아파트)
임세영
전라북도 군산시 경암로 30, 210호 (경암동, 대명
아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 20 항

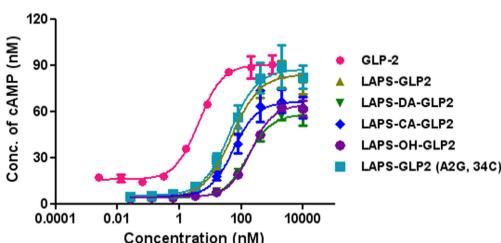
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 면역글로불린 단편을 이용한 위치 특이적 글루카곤 유사 펩타이드-2 약물 결합체

(57) 요약

본 발명은 C-말단에 티올 그룹이 도입된 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 또는 그의 유도체가 비펩타이드성 중합체에 의해 면역글로불린 Fc 영역과 공유적으로 연결된 GLP-2 결합체로서, 상기 GLP-2의 N-말단 아미노 그룹 이외의 특정 아미노산 잔기에 위치 특이적으로 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린이 결합된 것을 특징으로 하는 결합체, 이의 제조방법 및 상기 결합체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 GLP-2 결합체는 GLP-2 수용체와의 결합력이 현저히 증가하여, 우수한 생체 내 효력 지속효과를 나타낼 수 있고 반감기가 현저히 증가되므로, 투여 횟수를 줄이면서도 장질환, 장손상 또는 위질환 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도5



Test materials	EC ₅₀ (nM)	Relative activity (% vs. GLP-2)
GLP-2	4.25	100
LAPS-GLP2	49.22	8.6
LAPS-DA GLP2	162.6	2.6
LAPS-CA GLP2	56.82	7.5
LAPS-OH GLP2	203.0	2.1
LAPS-CA GLP2 (A2G, 34C)	42.85	9.9

(72) 발명자

정성엽

경기도 수원시 팔달구 권광로 373 109동 105호 (우
만동, 월드메르디앙)

권세창

서울특별시 강남구 선릉로 221 408동 1804호 (도곡
동, 도곡렉슬아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 또는 그의 유도체가 비펩타이드성 중합체에 의해 면역글로불린 Fc 영역과 공유적으로 연결된 GLP-2 결합체에 있어서,

상기 GLP-2 또는 그의 유도체는 C-말단에 티올(thiol) 그룹이 도입된 것이고,

상기 비펩타이드성 중합체는 상기 티올 그룹에 결합된 것인 GLP-2 결합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 GLP-2 또는 그의 유도체의 티올 그룹은 C-말단에 시스테인을 결합시켜 도입된 것인 GLP-2 결합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 GLP-2의 유도체는 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹의 치환(substitution), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중에 선택된 어느 하나의 방법에 의해 제조되고, GLP-2 수용체에 결합하는 기능을 보유하는 것인 GLP-2 결합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 GLP-2의 유도체는 천연형 GLP-2의 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아민 그룹이 제거된 GLP-2 유도체, 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹이 제거된 GLP-2 유도체, 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹이 하이드록실(hydroxyl) 그룹으로 치환된 GLP-2 유도체, 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹이 2개의 메틸기로 수식된 GLP-2 유도체, 및 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹이 카복실(carboxyl) 그룹으로 치환된 GLP-2 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 GLP-2 결합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 GLP-2의 티올 그룹에 공유적으로 연결되는 것인 GLP-2 결합체.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키تون류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 GLP-2 결합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 양 말단에 알데하이드 그룹, 프로피온알데하이드 그룹, 부틸알데하이드 그룹, 말레이미드 그룹, 및 석시니미드 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 반응기를 갖는 것인 GLP-2 결합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 석시니미드 유도체는 석시니미딜 프로피오네이트, 석시니미딜 카르복시메틸, 하이드록시

석시니미딜 또는 석시니미딜 카보네이트인 것인 GLP-2 결합체.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 한쪽 말단에 말레이미드 그룹을 갖고, 다른 쪽 말단에 알데히드 그룹을 갖는 폴리에틸렌글리콜인 것인 GLP-2 결합체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 비당쇄화된 것인 GLP-2 결합체.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 개 내지 4개의 도메인으로 이루어진 것인 GLP-2 결합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 헌지영역을 추가로 포함하는 것인 GLP-2 결합체.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 영역인 것인 GLP-2 결합체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역의 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM로 구성된 군으로부터 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 것인 GLP-2 결합체.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 당쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체인 것인 GLP-2 결합체.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 IgG4 Fc 영역인 것인 GLP-2 결합체.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역인 것인 GLP-2 결합체.

청구항 19

하기 단계를 포함하는 제1항 내지 제5항, 및 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 GLP-2 결합체의 제조방법:

(1) 양 말단에 알데히드, 말레이미드, 및 석시니미드 유도체 중에서 선택되는 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 GLP-2 또는 그의 유도체의 티올 그룹에 공유결합시키는 단계로서,

상기 GLP-2 또는 그의 유도체의 C-말단에는 티올(thiol) 그룹이 도입된 것이 특징인 단계;

(2) 상기 단계 (1)의 반응 혼합물로부터 티올 그룹에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 GLP-2 또는 그의 유도체를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및

(3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 GLP-2 또는 그의 유도체와 결합된 웹타이드 결합체를 생성하는 단계.

청구항 20

삭제

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 단계 (1)에서 GLP-2 또는 그의 유도체와 비펩타이드성 중합체의 반응이 1:2 내지 1:10의 반응 몰비로 pH 2 내지 4의 조건에서 수행되는 것인 GLP-2 결합체의 제조방법.

청구항 22

제1항 내지 제5항, 및 제7항 내지 제18항 중 어느 한 항의 GLP-2 결합체를 유효성분으로 포함하는, 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 C-말단에 티올 그룹이 도입된 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 또는 그의 유도체가 비펩타이드성 중합체에 의해 면역글로불린 Fc 영역과 공유적으로 연결된 GLP-2 결합체로서, 상기 GLP-2의 N-말단 아미노 그룹 이외의 특정 아미노산 잔기에 위치 특이적으로 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린이 결합된 것을 특징으로 하는 결합체, 이의 제조방법 및 상기 결합체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)는 섭취된 영양분에 반응하여 소장의 L-세포에서 생성되는 33개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬이다. GLP-2는 소장, 대장에서 점막 성장을 유도하고(*D.G.Burrin et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000 Dec;279(6):G1249-1256*) 장세포와 crypt 세포의 세포사멸(apoptosis)을 억제한다(*Bernardo Yusta et al., Gastrpenterology. 2009 Sep;137(3):986-996*). 또한 GLP-2는 소장에서 영양분의 흡수를 증가시키고(*PALLE BJ et al., Gastrpenterology. 2001;120:806-815*) 장투과성을 감소시킨다(*Cameron HL et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003 Jun;284(6):G905-12*). 또한, 위 배출(Gastric emptying) 및 위산 분비를 억제(*Meier JJ et al., Gastrpenterology. 2006 Jan;130(1):44-54*)하고, 장 혈류 속도를 증가시키고 (*Bremholm L et al., Scand J Gastroenterol. 2009;44(3):314-9*), 장평활근을 이완시킨다(*Amato A et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009 Mar;296(3):G678-84*).

[0003]

GLP-2은 에너지 흡수 및 보호, 장 세포 기능의 활성화 등의 특징으로 다양한 장 질환과 장손상의 실험모델에서 치료제로서 유망한 가능성을 보여왔다. 영양 흡수를 조절하는 호르몬으로서 GLP-2는 단장증후군 (short bowel syndrome, 이하 SBS)의 치료제로서 잠재력을 지니고 있다. SBS는 선천적 또는 장 절제 수술과 같은 후천적 원인으로 발생하며 소장의 흡수면적 감소로 인하여 영양 결핍증을 초래하게 된다. GLP-2는 SBS를 갖는 설치류 실험모델에서 영양 흡수 및 소화관 흡수를 증진시키는 모습을 보였다(*Ljungmann K et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 Sep;281(3):G779-85*). 또한, 크론병은 입에서 항문까지 소화관 전체에 걸쳐 어느 부위에서든지 발생할 수 있는 만성 염증성 장질환인데, 원인은 아직 정확히 알려져 있지 않지만, 환경적 요인, 유전적 요인과 함께 소화관 내에 정상적으로 존재하는 세균에 대한 우리 몸의 과도한 면역반응 때문에 발생하는 것으로 생각되고 있다. GLP-2는 화학요법에 의해 유도되거나 유전적 요인으로 발생된 점막염, 결장염, 염증성 장 질환에 대하여 점막 상피 손상을 예방하거나 경감시키는 것으로 밝혀졌다(*Qiang Xiao et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000 Apr; 278(4), R1057-R1063*). 화학요법 유발성 설사(chemotherapy-induced diarrhea, 이하 CID)는 항암치료제의 용량을 제한하게 하는 요인 중 하나로서, 가장 흔한 항암화학요법의 부작용이다. 진행암 환자의 10%, 특히 5-FU(5-fluorouracil, Adrucil)/ irinotecan(Camptosar) 단독/복합치료 시 약 80%가 경험하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 30%는 grade 3-5의 심각한 설사 증상을 보인다고 한다. 또한 점막염(mucositis), 호중구감소증(neutropenia)과 동시발생 시 사망에 이르기도 한다. GLP-2는 CID 유발랫트 실험 모델에서 5-FU에 의해 유도된 장 무게, 융모 높이, crypt 깊이의 저하를 경감시키는 효과를 나타내어 CID 치료제로서 잠재력을 보였다(*A. Tavakkolizadeh et al., J Surg Res. 2000 Jun; 91(1), 77-82*).

[0004]

그러나 이러한 유망한 가능성에도 불구하고 GLP-2를 약물로 상용화하기 위하여 해결해야 할 문제점들이 있다. GLP-2와 같은 펫타이드는 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 체내 단백질 가수 분해 효소에 의해 분해되어 그 활성을 잃으며, 또한 상대적으로 크기가 작아 신장을 통해 쉽게 제거되기 때문에 약리 성분으로 펫타이드를 포함하는 의약품의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 펫타이드 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나 펫타이드 약물은 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되며, 따라서 생리활성 펫타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사하게 되는데, 이는 환자의 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 다양한 시도가 있어왔다. 그 중 하나로 펫타이드 약물의 생체막 투과도를 증가시켜 구강 또는 비강을 통한 흡입으로 펫타이드 약물을 체내로 전달하려는 시도가 있었다. 그러나 이러한 방법은 주사제에 비해 펫타이드의 체내 전달 효율이 낮으며, 따라서 아직까지는 펫타이드 약물의 체내 활성을 요구되는 조건으로 유지하는데 어려움이 많다.

[0005]

특히, GLP-2는 생리 활성 반감기가 7분 이하로 매우 짧다. 이는 디펩티딜 펫타이드 IV(이하 DPPIV)에 의한 GLP-2의 아미노산 2번(Ala)와 3번(Asp) 사이의 절단에 의한 GLP-2의 역가 상실에 기인한다(Bolette H. et al., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(8):2884-2888). 이러한 GLP-2의 생리 활성 반감기를 증가시키기 위하여 주로 아미노산 치환을 통한 해결 시도가 있어왔다.

[0006]

미국의 NPS Pharmaceuticals Inc.는 크론병, SBS 및 위장 질환 치료제로 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산 Ala을 Asp로 치환한 GLP-2 유사체, 테두글루타이드를 개발 중이다. 테두글루타이드는 2번째 아미노산 서열을 치환함으로써 DPPIV의 절단에 내성을 지니게 되었으며 펫타이드의 안정성 및 효능을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나 DPPIV의 저항성을 증가시키는 방법만으로는 충분한 생리활성의 지속시간을 기대할 수 없으므로, 테두글루타이드 역시 하루 1회 주사를 통해 투여되어야 하며 이는 여전히 환자에게 큰 부담이 아닐 수 없다 (WO2005/067368).

[0007]

덴마크의 질랜드사는 천연형 GLP-2의 아미노산 위치 3, 8, 16, 24, 28, 31, 32 및 33에서 하나 이상의 치환을 포함한 GLP-2 유사체에 대하여 개발 중이다. 이를 치환은 펫타이드의 안정성 및 효능을 증가시킬 뿐만 아니라 치환 위치에 따라 결장에 비하여 소장에서 우세한 성장 촉진 활성을 지니거나 반대로 소장에 비하여 결장에서 우세한 성장 촉진 활성을 지니게 하여 선택적인 증상 치료를 가능하게 하는 것으로 알려져 있다. 또한 위장점막 염(gastrointestinal(GI)-mucositis)와 CID를 적응증으로 하는 GLP-2 유사체인 엘시글루타이드(ZP1846)를 개발 중으로, 현재 임상 1상을 진행하고 있다. 그러나 상기 유사체 역시 충분한 생리활성의 지속시간을 기대할 수 없어 하루 1회 주사를 통해 투여되어야 하는 문제점이 있다(WO 2006/117565).

[0008]

폴리에틸렌글리콜(PEG)은 목적 펫타이드의 특정 부위 또는 다양한 부위에 비특이적으로 결합하여 펫타이드의 분자량을 증가시켜 신장에 의한 소설을 억제하고 가수분해를 방지하는데 효과가 있으며 특별한 부작용도 일으키지 않는다. 예를 들어, US 4,179,337은 칼시토닌에 PEG를 결합하여 생리 활성 지속 및 막의 투과성을 높이는 것에 대해 기술하고 있으며, WO2006/076471은 NPR-A에 결합하여 cGMP의 생산을 활성화하여 동맥 내 혈압을 감소시키며, 따라서 울혈성 심부전증(Congestive heart failure) 치료제로 사용되는 B형 나트륨 배설증가 펫타이드(B-type natriuretic peptide, BNP)에 PEG를 결합하여 생리 활성을 지속시키는 것에 대해 기술하고 있다. 또한 US 6,924,264에서는 엑센딘-4의 라이신 잔기에 PEG를 결합시켜 생체 내 지속 시간을 증가시키는 방법을 기술하고 있다. 그러나 이러한 방법은 PEG 분자량을 증가시켜 펫타이드 약물의 생체 내 지속시간을 연장할 수 있는 반면, 분자량이 증가할수록 펫타이드 약물의 역가가 현저히 낮아지고, 또한 펫타이드와의 반응성이 낮아져 수율이 감소하는 문제가 있다.

[0009]

WO2002/46227는 재조합 유전자 기술을 이용한 GLP-1, 엑센딘-4 및 그 유사체와 인간 혈청 알부민 또는 면역글로불린 단편(Fc)과의 융합 단백질에 대해 기술하고 있으며, US 6,756,480는 부갑상선 호르몬(PTH) 및 그 유사체와 Fc 융합 단백질에 대해 기술하고 있다. 이러한 방법은 폐길화(pegylation)의 낮은 수율 문제와 비특이성을 극복할 수 있는 반면에, 혈중반감기 증가효과가 예상보다 획기적이지 못하고 경우에 따라서는 역가가 낮은 문제점을 지니고 있다. 혈중반감기 증가효과를 극대화하기 위하여 다양한 종류의 펫타이드 링커가 사용되기도 하지만 면역 반응을 유발할 수 있는 가능성이 있다. 또한 BNP와 같이 디설파이드 결합(disulfide bond)을 가지고 있는 펫타이드를 이용할 경우 미스폴딩(misfolding)의 확률이 높아 적용이 어렵다는 문제점과 천연에 존재하지 않는 아미노산 잔기가 있는 경우 유전자 재조합의 형태로 생산이 불가능하다는 문제점이 있다.

[0010] 본 발명자들은 이전 연구에서 GLP-2의 혈중 반감기를 증가시키고 생체 내 활성을 유지할 수 있는 방법으로 면역글로불린 Fc 영역, 비펩타이드성 중합체 및 GLP-2를 공유 결합에 의해 상호 연결시키는 제조방법을 사용하여 결합체의 생체 내 효력 지속효과가 획기적으로 증가됨을 확인하였다. GLP-2의 N-말단 아민 그룹을 하이드록실 그룹으로 치환한 베타-히드록시-이미다조-프로피오닐 GLP-2, GLP-2의 N-말단의 아민 그룹을 제거한 데스-아미노-히스티딜 GLP-2, GLP-2의 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아민 그룹을 제거한 이미다조-아세틸-GLP-2 등의 GLP-2 유도체는 생리 활성을 유지하면서 DPPIV 저항성이 증가하여 결합체의 생체 내 효력 지속효과가 획기적으로 증가되었다.

[0011] 그러나, 이들 GLP-2 유도체의 라이신 잔기에 위치 선택적으로 면역글로불린 Fc 영역을 연결시킨 결합체의 경우, 인 비트로 GLP-2 수용체와의 결합력이 현저하게 떨어져 생체 내 효력 및 이의 지속효과가 낮아질 수 있는 문제점이 있었다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 GLP-2의 혈중 반감기 증가 및 생체 내 활성유지를 동시에 극대화할 수 있는 방법을 찾고자 예의 노력한 결과, C-말단에 티올 그룹이 도입된 GLP-2 유도체의 C-말단에 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역을 공유 결합에 의해 상호 연결시키는 방법을 사용하여 GLP-2 결합체를 제조하였으며, 상기 결합체가 인 비트로 GLP-2 수용체와의 결합력이 증가하고, 생체 내 효력 지속효과가 획기적으로 증가됨을 확인하였다. 특히 GLP-2의 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아민 그룹을 제거하여 DPPIV의 저항성을 증가시킨 이미다조-아세틸-GLP-2의 C-말단에 도입한 시스테인 아미노산 잔기에 부위 선택적으로 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc영역을 결합시켜 인 비트로 효력증가되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 생체 내 지속성 및 안정성이 향상된 지속형 GLP-2 결합체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 GLP-2 결합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 GLP-2 결합체를 유효성분으로 포함하는, 장질환, 장손상 또는 위질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 또는 그의 유도체가 비펩타이드성 중합체에 의해 면역글로불린 Fc 영역과 공유적으로 연결된 GLP-2 결합체에 있어서, 상기 GLP-2 또는 그의 유도체는 C-말단에 티올(thiol) 그룹이 도입된 것이고, 상기 비펩타이드성 중합체는 상기 GLP-2의 N-말단 아민 그룹 이외의 아미노산 잔기에 결합된 것인 GLP-2 결합체를 제공한다.

[0017] 본 발명에서 용어, "글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)"는 GLP-2 수용체에 결합하여 장손상, 장질환 및 위 질환 개선의 기능을 보유한 33개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서, 천연형 GLP-2의 아미노산 서열은 아래와 같다.

[0018] GLP-2(1-33)

[0019] HADGSFSDEMTILDNLAAARDFINWLIQTKITD (서열번호 1)

[0020] 본 발명의 GLP-2는 천연형 GLP-2, 아고니스트(agonist), 유도체 (derivatives), 단편(fragments) 또는 변이체

(variants) 등을 모두 포함한다.

- [0021] 본 발명에서 "GLP-2 아고니스트"는 GLP-2의 구조와 상관없이 생체 내 GLP-2 수용체와 결합하여 천연형 GLP-2와 동일한 혹은 유사한 생리활성을 일으키는 물질을 말한다.
- [0022] 본 발명에서 "GLP-2 단편"은, GLP-2의 N-말단 또는 C-말단에 하나 또는 그 이상 아미노산이 추가 또는 삭제된 웨타이드를 의미하며, 이때 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산(예; D형 아미노산)도 가능하다.
- [0023] 바람직한 일 양태로서 본 발명의 GLP-2는 C-말단에 티올(thiol) 그룹이 도입된 것을 포함하며, 상기 티올 그룹은 시스테인(cysteine)을 추가로 GLP-2의 C-말단에 결합시킴으로써 도입할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에서 "GLP-2 변이체"는 천연형 GLP-2와 하나 이상의 아미노산이 다른 웨타이드를 의미하며 천연형 아미노산 이외에 비 천연형 아미노산의 치환도 가능하다.
- [0025] 본 발명에서 "GLP-2 유도체"는 천연형 GLP-2와 비교시 최소한 80% 이상 아미노산 서열에서 상동성을 보이며, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation), 제거(예; deamination) 또는 수식(예; N-ethylation)된 형태일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 N-말단의 치환, 제거, 및 수식 중에 선택된 어느 하나의 방법에 의해 제조되고, GLP-2의 기능을 보유하는 웨타이드, 이들의 단편 및 이들의 변이체로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 보다 바람직하게는, 천연형 GLP-2의 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아민 그룹이 제거된 GLP-2 유도체(이미다조아세틸-GLP-2(imidazoacetyl-GLP-2), 이하 'CA-GLP2'), 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹이 제거된 GLP-2 유도체(데스-아미노-히스티딜-GLP-2(des-amino-histidyl-GLP-2), 이하 'DA-GLP2'), 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹이 하이드록실(hydroxyl) 그룹으로 치환된 GLP-2 유도체(베타-하이드록시-이미다조프로피오닐 GLP-2(beta-hydroxy-imidazopropionyl GLP-2), 이하 'OH-GLP-2'), 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹이 2개의 메틸기로 수식된 GLP-2 유도체(다이메틸히스티딜 GLP-2(dimethyl histidyl GLP-2), 이하 'DM-GLP-2'), 및 천연형 GLP-2의 N-말단 아민 그룹이 카복실(carboxyl) 그룹으로 치환된 GLP-2 유도체(베타-카복시-이미다조프로피오닐 GLP-2(beta-carboxyimidazopropionyl GLP-2), 이하 'CX-GLP2')로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 보다 더 바람직하게는, 천연형 GLP-2의 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아민 그룹이 제거된 GLP-2 유도체인 CA-GLP-2일 수 있다.
- [0026] 바람직한 일 양태로서 본 발명의 GLP-2 또는 그의 유도체는 천연형 GLP-2의 C-말단에 시스테인이 도입되고, N-말단의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 아민 그룹이 제거된 것일 수 있으며, 2번째 아미노산인 알라닌이 글리신으로 치환된 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용한 GLP-2는 solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 재조합 방법으로도 생산 가능하다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "비웨타이드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 웨타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 본 발명에 사용가능한 비웨타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락티-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜이다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0029] 기존 인프레임 퓨전(inframe fusion) 방법으로 제조된 융합 단백질에서 사용된 웨타이드성 링커의 단점은 생체 내에서 단백질분해효소에 의해 쉽게 절단되어 캐리어에 의한 활성약물의 혈중반감기 증가 효과를 기대만큼 얻을 수 없다는 것이다. 그러나, 본 발명에서는 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하여 캐리어와 유사하게 웨타이드의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비웨타이드성 중합체는 상기와 같은 역할, 즉 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다. 비웨타이드성 중합체는 분자량이 1 내지 100 kDa 범위, 바람직하게는 1 내지 20 kDa 범위인 것이 바람직하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역과 결합되는 본 발명의 비웨타이드성 중합체는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다. 본 발명에 사용되는 비웨타이드성 중합체는 면역글로불린 Fc 영역 및 웨타이드

약물과 결합될 수 있는 반응기를 가진다.

[0030] 상기 비펩타이드성 중합체의 양말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시니미드(succinimide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 하이드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 상기 비펩타이드성 중합체의 양말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 양쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는 공자의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)을 이용하여 본 발명의 단백질 결합체를 제조할 수 있다.

[0031] 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양말단에 반응 알데히드 그룹 및 말레이미드의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 생리활성 폴리펩타이드의 티올 그룹 및 면역글로불린과 각각 결합하는데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 아미노 말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH9.0 조건에서는 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.

[0032] 바람직한 일 양태로서 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한쪽 말단에 말레이미드 그룹을 갖고, 다른 쪽 말단에 알데히드 그룹을 갖는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 한쪽 말단에 말레이미드 그룹을 갖고, 다른 쪽 말단에 알데히드 그룹을 갖는 폴리에틸렌글리콜일 수 있다.

[0033] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분을 제거함으로써 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다. 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL1)을 제외한, 중쇄 불변영역 (CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge)부분을 포함하기도 한다. 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄 불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH 3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 즉, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 (1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, (2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, (3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, (4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, (5) 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, (6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다. 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열유도체(mutant)를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331 번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다. 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펩터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[0034] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나 Fc 영역의 열, pH 등에 대한

구조적 안정성을 증대시킨 유도체다. 또한, 이러한 Fc 영역은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 괴 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체 일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 과파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 바람직하게는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역을 사용할 수 있다.

[0035] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다. 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, "비당쇄화(Aglycosylation)"는 원핵동물, 바람직하게는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.

[0036] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다.

[0037] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다. 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 Fc 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지를 포함할 수 있다. 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체의 존적 독성(CDC, Complement dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effectector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다.

[0038] 즉, 가장 바람직한 본 발명의 약물의 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.

[0039] 본 발명에서 사용된 GLP-2는 다양한 부위에서 비펩타이드성 중합체와 결합될 수 있다. 생체 내 활성에 중요한 부위인 N-말단 이외의 위치에 커플링 할 경우, 천연형 아미노산 서열에서 수식하고자 하는 아미노산 잔기 위치에 반응성 티올 그룹을 도입하여 비펩타이드성 중합체의 말레이미드 링커를 사용하여 공유결합을 형성할 수 있다. 또한, 생체 내 활성에 중요한 부위인 N-말단 이외의 위치에 커플링 할 경우, 천연형 아미노산 서열에서 수식하고자 하는 아미노산 잔기 위치에 반응성 있는 아민 그룹을 도입하여 비펩타이드성 중합체의 알데히드 링커를 사용하여 공유결합을 형성할 수 있다.

[0040] 비펩타이드성 중합체에 알데히드 링커를 사용하면 N-말단과 라이신 잔기에 있는 아민 그룹과 반응하며, 선택적으로 반응 수율을 향상시키기 위해 변형된 형태의 GLP-2를 사용할 수 있다. 예를 들어, N-말단 보호 방법, 라이신 잔기 치환 방법, 카르복시 말단에 아민 그룹을 도입방법 등을 사용하여 반응할 수 있는 아민 그룹을 원하는 위치에 하나만 유지할 수 있고, 폐질화 및 커플링 수율을 향상시킬 수 있다. N-말단의 보호방법은 디메틸화(dimethylation) 외 메틸화(methylation), 탈아미노화(deamination) 또는 아세틸화(acetylation) 방법으로도 가능하며, 이러한 알킬화(alkylation)방법에 한정되지 않는다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서는 GLP-2 펩타이드의 C-말단 아미노산 잔기에 선택적으로 커플링하기 위한 방법으로, GLP-2 유도체의 C-말단에 시스테인 잔기를 삽입하여 말레이미드 링커를 갖는 PEG를 결합시켜 C-말단 시스테인

잔기로의 선택적 폐길화 반응을 유도하였다. GLP-2의 첫 번째 아미노산인 히스티딘의 알파 탄소를 제거한 이미다조-아세틸-GLP-2(CA-GLP-2)의 C-말단 위치 특이적 면역글로불린 Fc 결합체는 인 비트로 GLP-2 수용체 결합력 시험에서 기존 라이신 잔기에 면역글로불린 Fc 영역을 결합한 지속형 GLP-2 유도체 대비 향상된 결합력을 보여주었다(도 5).

- [0042] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 GLP-2 결합체의 제조방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명에 따른 제조방법은, (1) 양 말단에 알데하이드, 말레이미드, 및 석시니미드 유도체 중에서 선택되는 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 GLP-2 또는 그의 유도체의 아민 그룹 또는 티올 그룹에 공유결합시키는 단계로서,
- [0044] 상기 GLP-2 또는 그의 유도체의 C-말단에는 티올(thiol) 그룹이 도입된 것이 특징인 단계;
- [0045] (2) 상기 (1)의 반응 혼합물로부터 N-말단 아미노 그룹 이외의 아미노산 잔기에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 GLP-2 또는 그의 유도체를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및
- [0046] (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 GLP-2 또는 그의 유도체와 결합된 웨타이드 결합체를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 용어 "연결체"란 비펩타이드성 중합체와 GLP-2 유도체만이 공유결합으로 연결된 중간체로서, 이후 이 연결체에 있는 비펩타이드성 중합체의 GLP-2 유도체가 연결되지 않은 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 결합시키게 된다.
- [0048] 상기 단계 (1)은, 비펩타이드성 중합체와 GLP-2 또는 그의 유도체를 공유결합시키는 단계이다. 상기 GLP-2는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 천연형 GLP-2 또는 그의 N-말단 변이체, 예컨대, CA-GLP-2, DA-GLP2, OH-GLP2, DM-GLP-2, 또는 CX-CLP-2의 C-말단에 티올 그룹이 도입된 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, CA-GLP-2의 C-말단에 시스테인이 추가로 결합된 것이다.
- [0049] 단계 (1)에서, 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 바람직하게는, 한쪽 말단에 말레이미드 그룹을 갖고, 다른 쪽 말단에 알데하이드 그룹을 갖는 것이 바람직하다.
- [0050] 단계 (1)에서, 비펩타이드성 중합체는 GLP-2 또는 그의 유도체의 N-말단 이외의 아미노산 잔기, 바람직하게는 C-말단의 시스테인 잔기 중 티올 그룹에 공유적으로 연결된다. 단계 (1)에서 C-말단의 시스테인 잔기 중 티올 그룹에서 비펩타이드성 중합체의 선택적 결합을 위해, GLP-2 또는 그의 유도체와 비펩타이드성 중합체를 pH 2 내지 pH 4, 바람직하게는 pH 3의 조건에서 반응시킨다. 이때, GLP-2 또는 그의 유도체와 비펩타이드성 중합체의 반응 몰비는 1:2 내지 1:10의 조건에서 반응시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 단계 (1)의 반응은, 반응에 참가하는 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단 반응기의 종류를 고려하여 필요에 따라 환원제의 존재하에서 수행될 수 있다. 바람직한 환원제로는 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH3), 수소화붕소나트륨, 다이메틸아민 붕산염 또는 피리딘 붕산염 등이 사용될 수 있다.
- [0052] 단계 (2)는 단계 (1)의 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단에 GLP-2 또는 그의 유도체가 공유적으로 연결된 GLP-2-비펩타이드성 중합체의 연결체를 분리하는 단계이다. (2) 단계에서는 요구되는 순도 및 생성된 산물의 분자량 및 전하량과 같은 특성을 고려하여, 단백질의 분리에 사용되는 통상의 방법들 중에서 필요에 따라 적절히 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피 또는 이온 교환 크로마토그래피를 포함하는 다양한 공지의 방법들을 적용할 수 있으며, 필요에 따라서는 보다 높은 순도로 정제하기 위해 복수개의 서로 다른 방법을 조합하여 사용할 수 있다.
- [0053] 단계 (3)은 단계 (2)에서 분리된 연결체를 면역글로불린 Fc 영역과 반응시켜, 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하는 단계이다.
- [0054] 이 단계에서, GLP-2-비펩타이드성 중합체와 면역글로불린 Fc 영역의 반응은 1:2 내지 1:10, 바람직하게는 1:4 내지 1:8의 반응 몰비로, pH 5.0 내지 8.0, 바람직하게는 pH 6.0의 조건에서 수행될 수 있다. 이때, 반응에 참가하는 비펩타이드성 중합체 양쪽 말단 반응기의 종류를 고려하여 필요에 따라 환원제의 존재 하에서 수행될 수 있다. 바람직한 환원제로는 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH3), 수소화붕소나트륨, 다이메틸아

민 붕산염 또는 피리딘 붕산염 등이 사용될 수 있다.

[0056] 바람직한 일 실시양태로서, 본 발명에 따른 GLP-2 결합체의 제조방법은,

[0057] (1) 양 말단에 말레이미드 반응기 및 알데하드 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 GLP-2 유도체의 C-말단에 도입한 시스테인 잔기에 공유결합으로 연결시키는 단계;

[0058] (2) 상기 단계 (1)의 반응 혼합물로부터 N-말단 아미노 그룹 이외의 아민 그룹 또는 티올 그룹에 비펩타이드성 중합체가 공유결합된 GLP-2 또는 그의 유도체를 포함하는 연결체를 분리하는 단계; 및

[0059] (3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 GLP-2 유도체와 결합된 웨بت아이드 결합체를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 GLP-2 결합체를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0061] 상기 약제학적 조성물은 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나, SBS를 포함하는 GI 질환, 염증성 장질환(IBD), 크론씨병, 대장염, 췌장염, 회장염, 염증성 장폐색(수술 후 및 다른 원인 모두로부터), 암 화학요법 및/또는 방사선 요법과 관련된 점막염, 총비경구영양 또는 허혈에 의한 장 위축, 뼈 관련 장애 및 신생아 괴사성 장염을 유도하는 장 상실을 포함하는 소아의 GI 장애를 포함하는 질환의 예방 또는 치료 목적으로 사용할 수 있다.

[0062] 본 발명에서 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여로 상기 설명한 장질환, 장손상 또는 위질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0063] 본 발명에서 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여로 장질환, 장손상 또는 위질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0064] 본 발명의 약제학적 조성물은 혈중 반감기가 증가하고 생체 내 지속성 및 안정성이 향상된 본 발명에 따른 지속형 GLP-2 결합체를 유효성분으로 포함하기 때문에, 약물의 투여 용량을 획기적으로 줄이면서도 혈당의 요동이 없는 개선된 복약 순응도를 나타내어 장질환, 장손상 또는 위질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 약제학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 혼탁제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥내, 복강내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 웨بت아이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 지속형 제제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 이러한 조성물에 포함될 수 있는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포

[0067] 함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면

[0068] 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제가 사용될 수 있다. 경구용 액상 제제로는 혼탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 페라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를

[0069] 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0070] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 혼탁제, 유제,

[0071] 동결건조제, 좌제 등을 예시할 수 있다. 비수성용제, 혼탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오

일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가

[0072] 능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 혼탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0073] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 GLP-2 결합체는 생체 내 지속성 및 역가가 우수하므로, 본 발명의 약제학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

발명의 효과

[0074] 본 발명의 GLP-2 결합체는 GLP-2 수용체와의 결합력이 현저히 증가하여, 우수한 생체 내 효력 지속효과를 나타낼 수 있고 반감기가 현저히 증가되므로, 투여 횟수를 줄이면서도 장질환, 장손상 또는 위질환 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 Source Phe 컬럼을 이용하여 정제한 프로파일을 나타낸 것이다.

도 2는 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 Source 15Q 컬럼을 이용하여 정제한 프로파일을 나타낸 것이다.

도 3은 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 Source ISO 컬럼을 이용하여 정제한 프로파일을 나타낸 것이다.

도 4는 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체 순도를 역상컬럼으로 분석한 결과이다.

도 5는 천연형 GLP-2와 비교하여 지속형 GLP-2 유도체의 GLP-2 수용체 결합력을 측정한 인 비트로 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 이미다조아세틸-GLP-2의 폐길화 (Pegylation)와 정제

[0078] 10K MAL-PEG-ALD(말레이이미드와 알데하이드 반응기를 갖는 혼합형(heterobifunctional) PEG, NOF, 일본)를 이미다조아세틸-GLP-2인 CA GLP-2(A2G, 34C)(American peptide, 미국)의 아미노산 서열 34번 시스테인 잔기에 폐길화시키기 위하여, CA GLP-2 웨타이드와 PEG의 몰비를 1:3, 웨타이드의 농도를 3.5mg/ml로 하여 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응은 환원제인 20mM 나트륨 시아노 보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride, 이하 SCB)의 존재하에서 pH 3.0인 50mM 농도의 Tris-HCl 완충액 내에서 수행되었다. 반응이 종결된 후, 하기 조건에서 SOURCE S 컬럼(LRC25, Pall Corporation)를 통하여 반응액을 정제하였고, 이로부터 시스테인 모노-폐길화된(monopegylated) 웨타이드를 수득하였다.

[0079] 컬럼(Column) : SOURCE S(LRC25, Pall Corporation)

[0080] 유속 : 4.0ml/분

[0081] 구배 : B 0% → 40% 240분 (A: 20mM Na-citrate, pH 2.0 + 45% 에탄올, B: A + 1M KCl)

[0082]

실시예 2: 이미다조아세틸-GLP-2(A2G, 34C)-PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

상기 실시예 1을 통해 수득한 모노-페길화된 CA GLP-2(A2G, 34C)를 면역글로불린 Fc 단편(대한민국 특허등록 제 10-725315호에 따라 제조)과 1:6의 몰비로 혼합하고, 전체 웨بت아이드 농도를 20mg/ml로 하여 4°C에서 16시간 반응시켰다. 이때, 반응은 100mM 포타슘 포스페이트(Potassium phosphate) pH 6.0에서 이루어졌으며, 환원제인 20mM SCB를 첨가하여 반응시켰다. 반응이 종결된 후, 하기 조건에서 반응액은 Source Phe 정제 컬럼, Source 15Q 정제 컬럼 및 Source ISO 정제 컬럼을 사용하여 정제하였고, SOURCE Phe 컬럼을 이용하여 정제한 프로파일은 도 1, SOURCE 15Q 컬럼을 이용하여 정제한 프로파일은 도 2, SOURCE ISO 컬럼을 이용하여 정제한 프로파일은 도 3에 나타내었다. 이로부터 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 수득하였다.

[0085] 컬럼 : SOURCE Phe (XK16, GE Healthcare)

[0086] 유속 : 2.0ml/분

[0087] 구배 : B 100→0%로 용출(A: 20mM Tris-HCl, pH 8.0, B: A + 2.6M NaCl)

[0088] 컬럼 : SOURCE 15Q (LRC25, Pall Corporation)

[0089] 유속 : 5.0ml/분

[0090] 구배 : B 0→30% 120분 (A: 20mM Tris-HCl, pH 8.0, B: A + 1M NaCl)

[0091]

[0092] 컬럼 : SOURCE ISO (HR16, GE Healthcare)

[0093] 유속 : 2.0ml/분

[0094] 구배 : B 100→0% 100분 (A: 20mM Tris-HCl, pH 8.0, B: A + 1.1M 암모니움 살레이트(ammonium sulfate))

[0095] CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 제조 수율은 12.5%이었으며, 용출된 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체를 역상 HPLC로 분석한 결과, 94.2% 순도를 나타내는 것으로 확인되었다 (도 4).

실시예 3: CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체의 인 비트로 GLP-2 수용체 결합력 측정 실험

[0097] 상기 실시예 2를 통해 제조된 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-면역글로불린 Fc 결합체(이하, GLP-2 결합체)의 효력을 측정하기 위해, 인 비트로 세포 활성을 측정하는 방법을 이용하였다. GLP-2 결합체의 GLP-2 수용체에 대한 결합 효력을 측정하기 위해 인간 GLP-2 수용체 유전자를 발현하도록 형질전환된 CHO (chinese hamster ovary) 세포주를 이용하였다. 본 시험에서 사용된 CHO/hGLP-2R 세포는 GLP-2 수용체를 가지고 있어, GLP-2 계통의 인 비트로 활성을 측정하는 방법으로 많이 이용되고 있다.

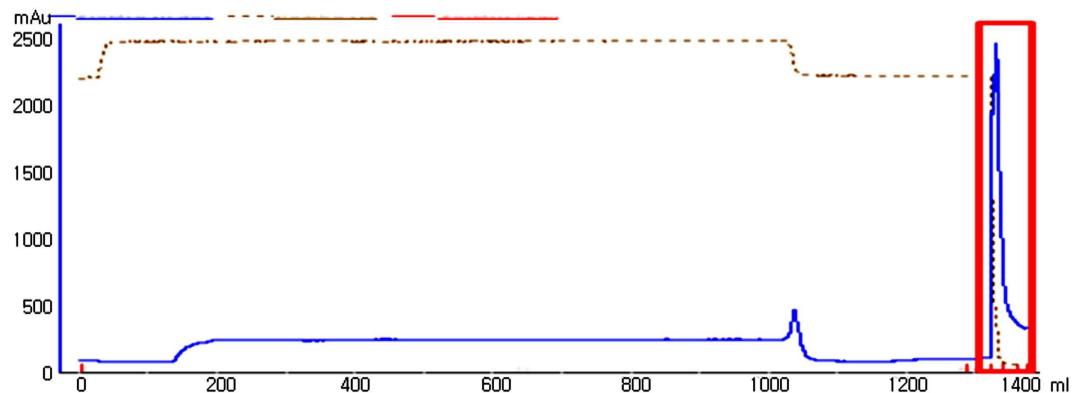
[0098] 세포는 1주일에 2~3번 계대하였고, 1×10^5 /웰(well)의 세포수로 96 웰 플레이트에 시딩(seeding)하여 24시간 배양시켰다. CHO/hGLP-2R에 천연형 GLP-2는 1000~0.002 nM, 천연형 GLP-2 지속형 제제(GLP-2 유도체-PEG-면역글로불린 Fc 결합체, 이하 LAPS-GLP-2), 라이신 잔기 선택적 결합 GLP-2 유도체 지속형 제제(LAPS-DA-GLP-2, LAPS-CA-GLP-2, LAPS-OH-GLP-2), 그리고 C-말단 시스테인 잔기 선택적 결합 GLP-2 유도체 지속형 제제(LAPS-CA-GLP-2(A2G, 34C))는 10000~0.02 nM 처리하였다. 시험물질에 의한 세포 내의 신호전달 물질인 cAMP의 발생 정도는 cAMP assay kit (MD, USA)를 이용하여 측정하였다. 또한, Victor (Perkin Elmer, USA)로 형광을 측정하고, EC50값을 측정하여 값을 비교하였다.

[0099] 라이신 잔기 선택적 결합 GLP-2 유도체 지속형 제제(LAPS-DA-GLP-2, LAPS-CA-GLP-2, LAPS-OH-GLP-2)는 천연형 GLP-2 지속형 제제 (LAPS-GLP-2) 대비 낮은 인 비트로 활성을 나타냈다(천연형 GLP-2 대비 2.6-7.5% vs 8.6%, 도 5). 이에 반해, C-말단 시스테인 잔기 선택적 결합 GLP-2 유도체 지속형 제제 (LAPS-CA-GLP-2(A2G, 34C))는 LAPS-GLP-2에 비해 향상된 인 비트로 활성을 보였다(천연형 GLP-2 대비 9.9%, 도 5).

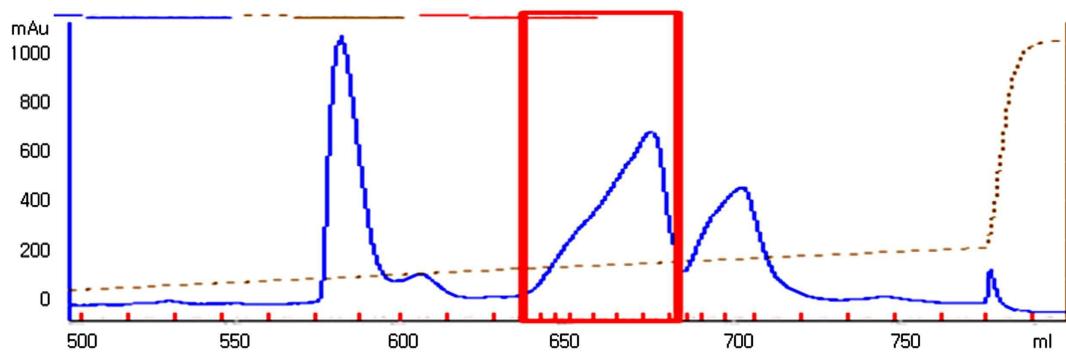
[0100] 이로부터 GLP-2 유도체의 C-말단에 비펩타이드성 중합체 및 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 GLP-2 결합체는 GLP-2 수용체 결합력이 기존의 GLP-2 결합체보다 향상되어, 생체 내 효력 지속효과가 증진될 수 있음을 알 수 있다.

도면

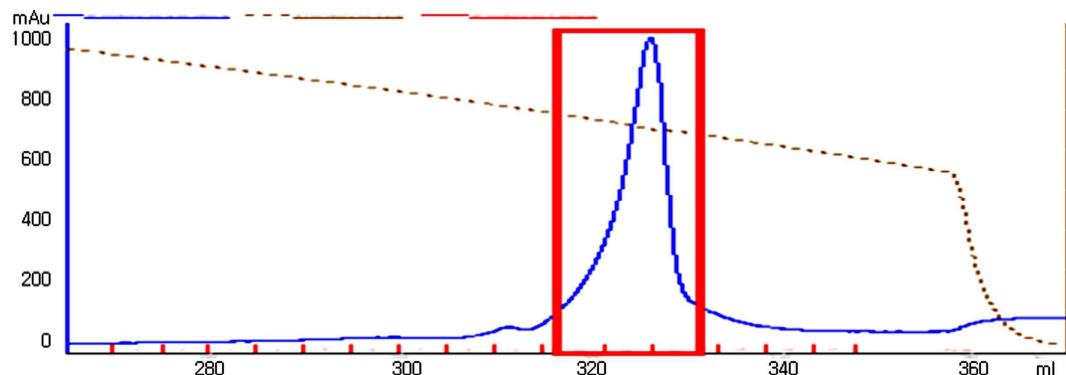
도면1



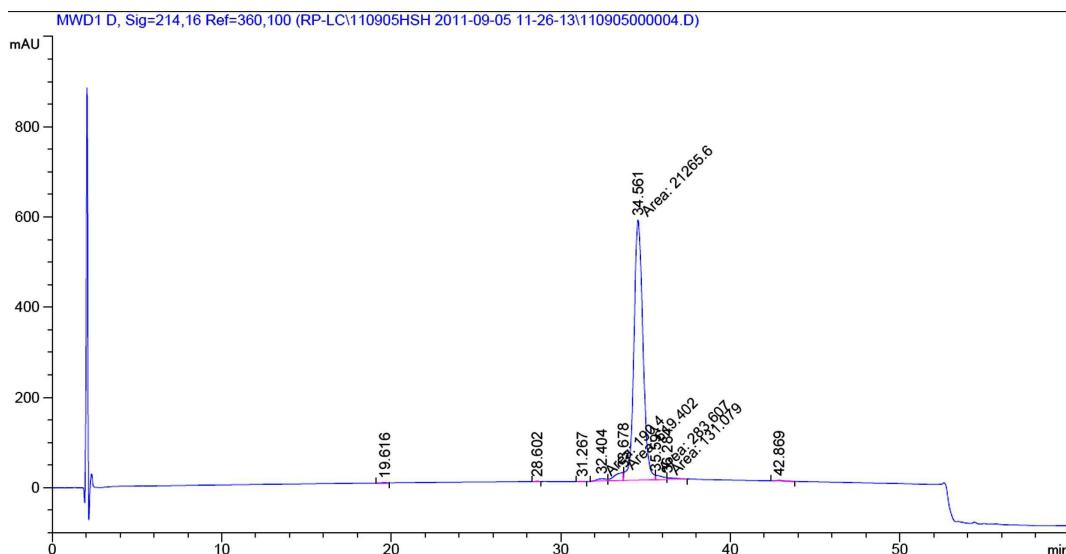
도면2



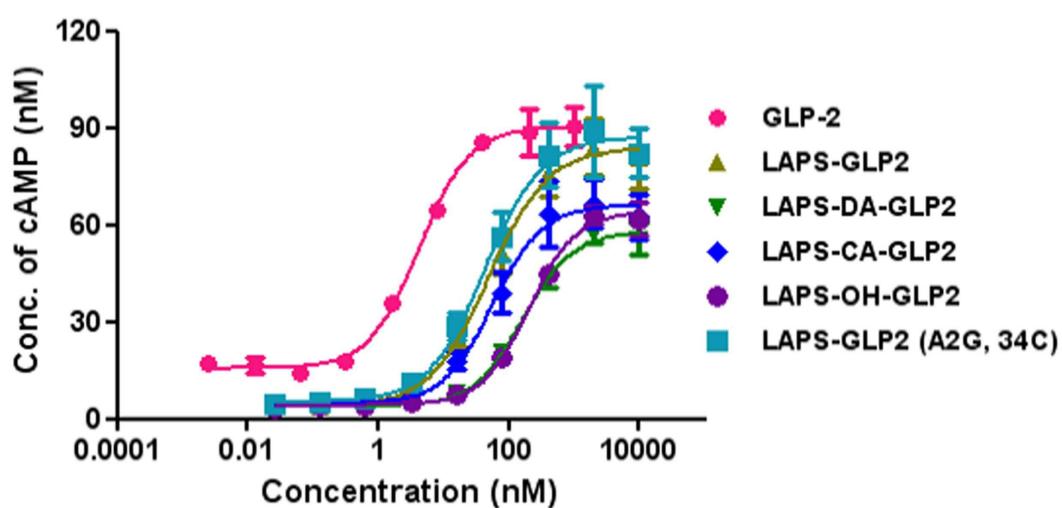
도면3



도면4



도면5



Test materials	EC ₅₀ (nM)	Relative activity (% vs. GLP-2)
GLP-2	4.25	100
LAPS-GLP2	49.22	8.6
LAPS-DA GLP2	162.6	2.6
LAPS-CA GLP2	56.82	7.5
LAPS-OH GLP2	203.0	2.1
LAPS-CA GLP2 (A2G, 34C)	42.85	9.9

서 열 목 록

- <110> Hanmi Holdings Co., Ltd
<120> A site-specific GLP-2 conjugate using an immunoglobulin fragment
<130> PA111023/KR
<160> 1
<170> Kopatent In 1.71
<210> 1
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr

20 25 30

Asp