

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-513345
(P2025-513345A)

(43)公表日 令和7年4月24日(2025.4.24)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/26 (2006.01)	A 6 1 K 38/26	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 38/22	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全55頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-561810(P2024-561810)
 (86)(22)出願日 令和5年4月18日(2023.4.18)
 (85)翻訳文提出日 令和6年11月5日(2024.11.5)
 (86)国際出願番号 PCT/KR2023/005198
 (87)国際公開番号 WO2023/204556
 (87)国際公開日 令和5年10月26日(2023.10.26)
 (31)優先権主張番号 10-2022-0047662
 (32)優先日 令和4年4月18日(2022.4.18)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 韓国(KR)
 (81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)

(71)出願人 515022445
 ハンミ ファーマシューティカル カンパニー リミテッド
 大韓民国 1 8 5 3 6 キョンギ - ド ファソン - シ パルタン - ミョン ムハ - ロ 2 1 4
 (74)代理人 100103610
 弁理士 吉 田 和彦
 (74)代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74)代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
 (74)代理人 100111796
 弁理士 服部 博信
 (74)代理人 100123766

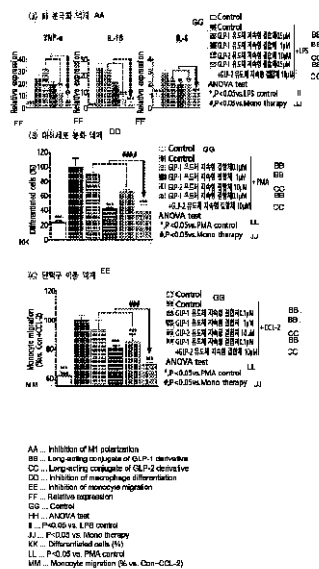
最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腸疾患の予防又は治療のためのG L P - 2 と、インスリン分泌ペプチド、T N F 抑制剤、又はその両方の併用療法

(57)【要約】

本発明は、腸疾患の予防、改善又は治療のためのG L P - 2 と、インスリン分泌ペプチド、T N F 抑制剤、又はその両方の併用療法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬学的有効量の G L P - 2 を含有する腸疾患の予防又は治療のための薬学的組成物であって、

前記薬学的組成物は、インスリン分泌ペプチド、T N F 抑制剤、又はその両方と併用投与されることを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 2】

前記インスリン分泌ペプチドは、グルカゴン様ペプチド - 1 (G l u c a g o n - l i k e p e p t i d e - 1 , G L P - 1)、エキセンジン - 3、エキセンジン - 4、それらの作用剤、誘導体、断片、変異体、及びそれらの組み合わせで構成される群から選択される、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 3】

前記インスリン分泌ペプチドは、インスリン分泌ペプチドの N - 末端ヒスチジン残基がイミダゾアセチルデスヒスチジン、デスアミノヒスチジン、 - ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N - ジメチルヒスチジン、又は - カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンで置換されたインスリン分泌ペプチド誘導体である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

前記インスリン分泌ペプチドは、天然型エキセンジン - 4、エキセンジン - 4 の N - 末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファー炭素及びアルファー炭素に結合された N - 末端アミノ基が除去されたエキセンジン - 4 誘導体、エキセンジン - 4 の N - 末端アミノ基が除去されたエキセンジン - 4 誘導体、エキセンジン - 4 の N - 末端アミノ基がヒドロキシル基で置換されたエキセンジン - 4 誘導体、エキセンジン - 4 の N - 末端アミノ基が 2 個のメチル基で修飾されたエキセンジン - 4 誘導体、エキセンジン - 4 の N - 末端アミノ基がカルボキシル基で置換されたエキセンジン - 4 誘導体、エキセンジン - 4 の 1 2 番目のアミノ酸 (リシン) がセリンで置換されたエキセンジン - 4 誘導体、又はエキセンジン - 4 の 1 2 番目のアミノ酸 (リシン) がアルギニンで置換されたエキセンジン - 4 誘導体である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 5】

前記 G L P - 2 は、天然型 G L P - 2 又は G L P - 2 誘導体である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 6】

前記 G L P - 2 誘導体は、天然型 G L P - 2 配列で少なくとも一つのアミノ酸に置換 (s u b s t i t u t i o n)、追加 (a d d i t i o n)、除去 (d e l e t i o n)、修飾 (m o d i f i c a t i o n) 及びそれらの組み合わせからなる群から選択された改変が起きた G L P - 2 誘導体である、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

前記 G L P - 2 誘導体は、配列番号 1 で 1 番、2 番、3 0 番及び 3 3 番目のアミノ酸中、少なくとも一つのアミノ酸に改変が起きたものである、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 8】

前記 G L P - 2 誘導体は、下記一般式 1 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の薬学的組成物：

[一般式 1]

$$X_1 X_2 D G S F S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T X_{30} I T D X_{34}$$

(配列番号 9)

ここで、

X_1 は、ヒスチジン、イミダゾアセチルデスヒスチジン、デスアミノヒスチジン、 - ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N - ジメチルヒスチジン、又は - カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンであり；

50

X₂は、アラニン、グリシン、又はA i b (2 - a m i n o i s o b u t y r i c a c i d) であり；

X₃₀は、リシン又はアルギニンであり；

X₃₄は、存在しないか、リシン、アルギニン、グルタミン、ヒスチジン、6 - アジドリシン又はシステインであり；

ただし、一般式 1 のアミノ酸配列中、配列番号 1 と同一の配列は除く。

【請求項 9】

前記 G L P - 2 誘導体は、

(1) X₁がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、X₂がグリシンであり、X₃₀がリシンであり、X₃₄がシステインであるか、

10

(2) X₁がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、X₂がグリシンであり、X₃₀がリシンであり、X₃₄がリシンであるか、

(3) X₁がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、X₂がグリシンであり、X₃₀がアルギニンであり、X₃₄がリシンであるか、

(4) X₁がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、X₂がグリシンであり、X₃₀がリシンであり、X₃₄が 6 - アジドリシンであるか、

(5) X₁がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、X₂がグリシンであり、X₃₀がアルギニンであり、X₃₄がシステインであるか、

(6) X₁がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、X₂がA i b であり、X₃₀がリシンであり、X₃₄がシステインであるか、又は

20

(7) X₁がヒスチジンであり、X₂がA i b であり、X₃₀がリシンであり、X₃₄がシステインである、請求項 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

前記 G L P - 2 誘導体は、下記の一般式 2 で表されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の薬学的組成物：

[一般式 2]

X₁X₂D G S F S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T X₃₀I T D X₃₄(配列番号 10)

ここで、

X₁は、ヒスチジン、イミダゾアセチルデスヒスチジン、デスアミノヒスチジン、 - ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N - ジメチルヒスチジン、又は - カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンであり；

30

X₂は、アラニン、グリシン、又はA i b (2 - a m i n o i s o b u t y r i c a c i d) であり；

X₃₀は、リシン又はアルギニンであり；

X₃₄は、一つ以上の任意のアミノ酸又は改変が起きた一つ以上の任意のアミノ酸であり；

ただし、一般式 2 のアミノ酸配列中、配列番号 1 と同一の配列は除く。

【請求項 11】

前記 G L P - 2 誘導体は、配列番号 2 ~ 8 からなる群から選択されたアミノ酸配列のペプチドである、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 12】

G L P - 2 とインスリン分泌ペプチドが併用投与される、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

G L P - 2 と T N F 抑制剤が併用投与される、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

G L P - 2、インスリン分泌ペプチド、及び T N F 抑制剤が併用投与される、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

50

T N F 抑制剤は、可溶性 T N F 受容体、抗 T N F 抗体又はその断片、又はそれらの組み合わせである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 6】

前記腸疾患は、過敏性腸疾患、腸炎、炎症性腸疾患、結腸炎、大腸炎、すい臓炎、回腸炎、腸萎縮、及び腸損傷からなる群から選択される少なくとも一つである、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 7】

前記炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎、クローン病及びベーチェット病からなる群から選択される少なくとも一つである、請求項 1 6 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 8】

前記組成物は、個体に投与時、単球 (m o n o c y t e) で M 1 分極化 (p o l a r i z a t i o n) 抑制、マクロファージ分化抑制、及び単球移動 (m i g r a t i o n) 抑制の一つ以上を示す、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 9】

前記組成物は、個体に投与時、小腸の長さ増加、小腸の炎症減少、大腸の長さ増加、及び大腸の炎症減少の少なくとも一つを引き起こす、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 0】

前記インスリン分泌ペプチド及び G L P - 2 は、その C - 末端が改変されていないか、又はアミド化された、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1】

(i) 前記インスリン分泌ペプチドは、その生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態であるか、

(i i) 前記 G L P - 2 は、その生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態であるか、

(i i i) 前記インスリン分泌ペプチド及び G L P - 2 それぞれは、これらの生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 2】

前記結合体は、下記化学式 (1) で示される、請求項 2 1 に記載の薬学的組成物：

〔化 1〕

$X - L a - F \cdots (1)$

ここで、

X は、インスリン分泌ペプチド又は G L P - 2 であり；

L は、エチレングリコール繰り返し単位を含有するリンカーであり；

a は、0 又は自然数であり、ただし、a が 2 以上である時、それぞれの L は互いに独立しており；

F は、免疫グロブリン F c 領域であり；

前記「 - 」は共有結合である。

【請求項 2 3】

前記免疫グロブリン F c 領域は、非グリコシル化された I g G 4 F c 領域である、請求項 2 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 4】

前記 F は、二つのポリペプチド鎖からなる二量体であり、L の一方の末端が前記二つのポリペプチド鎖の一つのポリペプチド鎖のみに連結されている、請求項 2 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 5】

前記 L は、ポリエチレングリコールである、請求項 2 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 6】

前記 L 内のエチレングリコール繰り返し単位部位の化学式量は 1 ~ 1 0 0 k D a の範囲にある、請求項 2 2 に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

前記組成物は、薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は希釈剤をさらに含む、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

(i) GLP-2 及びインスリン分泌ペプチド；(ii) GLP-2 及び TNF 抑制剤；又は(iii) GLP-2、インスリン分泌ペプチド、及び TNF 抑制剤が同時、順次に又は逆順で併用投与されることを特徴とする請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、腸疾患の予防又は治療のための GLP-2 と、インスリン分泌ペプチド、TNF 抑制剤、又はその両方の併用療法に関する。

【背景技術】

【0002】

腸疾患には、過敏性腸疾患、腸炎、炎症性腸疾患、結腸炎、大腸炎、すい臓炎、回腸炎、腸萎縮、又は腸損傷などがある。そのうち、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) は、胃腸管内に炎症や潰瘍が生じる炎症性疾患であり、炎症性サイトカインの発現増加、体重減少、結腸の長さ減少、腹痛、発熱、下痢、及び / 又は下血などの症状が現れ、そのような症状は、悪化と好転を繰り返すことができる。

20

【0003】

インスリン分泌ペプチドの一種である GLP-1 は、回腸と大腸の L-細胞から分泌されるインクレチン (incretin) ホルモンである。グルカゴン様ペプチド-1 の主要な作用はインスリン分泌を増加させ、ブドウ糖の濃度によるインスリン分泌 (Glucose dependent secretion) が行われ、低血糖が発生しない。そのような特徴により第 2 型糖尿病の治療方法に適用されるが、血中半減期が 2 分前後で非常に短いため、薬剤に開発するのに大きな短所を有している。これにより、開発されて市販される GLP-1 作用剤としては、アメリカドクトカゲ (glia monster) の唾液腺から精製された GLP-1 類似体であるエキセンジン-4 (Exendin-4) がある。これは、DPP-IV (Dipeptidyl peptidase-4) に対する抵抗性と共にグルカゴン様ペプチド-1 より高い生理活性を有し、したがって、体内半減期が 2 - 4 時間であり、GLP-1 に比べて長くなった体内半減期を有する (US 5, 424, 286 A)。しかし、DPP-IV の抵抗性を増加させる方法だけでは十分な生理活性の持続期間を期待できないが、例えば、現在市販されているエキセンジン-4 (エキセナチド、exenatide) の場合、患者に一日二回の注射を通じて投与されなければならない、投与による嘔吐誘発及び悪心現象が患者に大きい負担として作用される短所が依然として残っている。

30

【0004】

GLP-2 は、摂取された栄養分に反応して小腸の L-細胞で生成される 33 個のアミノ酸で構成されたペプチドホルモンである。GLP-2 は、小腸、大腸で粘膜成長を誘導し、腸細胞と crypt 細胞の成長促進及びアポトーシス (apoptosis) を抑制する。また、GLP-2 は、小腸で栄養分の吸収を増加させ、腸透過性を減少させる。胃排出 (Gastric emptying) 及び胃酸分泌を抑制し、腸血流速度を増加させ、腸の平滑筋を弛緩させる。

40

【0005】

TNF は、免疫反応に中枢的役割を果たすサイトカインであり、炎症反応とも関連しており、TNF の異常な調節が多様な疾患に現れることが知られている。このような TNF による反応を抑制するために多様な TNF 抑制剤が開発された。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】US 5,424,286 A

【特許文献2】韓国公開特許第10-2019-0037181号

【特許文献3】国際特許公開第97/34631号

【特許文献4】国際特許公開第96/32478号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

現在までインスリン分泌ペプチド、GLP-2、及び/又はTNF抑制剤を用いた腸疾患治療薬の開発は不備な状態であるところ、持続的な治療薬の開発の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一つの目的は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を併用する腸疾患の予防、改善又は治療のための治療法を提供することにある。

20

【0010】

本発明のもう一つの目的は、GLP-2を含有する腸疾患の予防又は治療のための薬学的組成物であり、前記薬学的組成物は、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方と併用投与されることを特徴とする薬学的組成物を提供することにある。

【0011】

本発明のもう一つの目的は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を含む、組み合わせ物を提供することにある。

【0012】

本発明のもう一つの目的は、前記組み合わせ物を含む、腸疾患の予防、改善又は治療のための薬学的組成物を提供することにある。

30

【0013】

本発明のもう一つの目的は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を含む、腸疾患の予防、改善又は治療のための薬学的キットを提供することにある。

【0014】

本発明のもう一つの目的は、前記組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットをそれを必要とする個体に投与及び/又は用いる段階を含む、腸疾患の予防、改善又は治療方法を提供することにある。

【0015】

本発明のもう一つの目的は、薬学的有効量のGLP-2を含有する組成物と、薬学的有効量のインスリン分泌ペプチドを含有する組成物、薬学的有効量のTNF抑制剤を含有する組成物、又はその両方をそれを必要とする個体に併用投与及び/又は併用使用する段階を含む、腸疾患の予防、改善又は治療方法を提供することにある。

40

【0016】

本発明のもう一つの目的は、前記組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットの腸疾患の予防、改善又は治療用途；及び/又は腸疾患の予防、改善又は治療のための薬剤の製造のための用途を提供することにある。

【発明の効果】

【0017】

本発明によるGLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方

50

の併用投与治療法は、単一投与治療法に比べて向上した効果を有し、腸疾患の予防、改善又は治療に有用に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】GLP-2（GLP-2誘導体持続型結合体）及びインスリン分泌ペプチド（GLP-1誘導体持続型結合体）の併用投与による、M1分極化（M1 polarization）抑制効果（A）、マクロファージ分化（Macrophage differentiation）抑制効果（B）、単球移動（monocyte migration）抑制効果（C）を確認した図である。

【図2】GLP-2（GLP-2誘導体持続型結合体）と、インスリン分泌ペプチド（GLP-1誘導体持続型結合体）、TNF抑制剤（抗TNF抗体）、又はその両方の併用投与による、インドメタシン（Indomethacin, INN）による炎症性腸疾患ラットの小腸の長さ変化を示した図である。 10

【図3】GLP-2（GLP-2誘導体持続型結合体）と、インスリン分泌ペプチド（GLP-1誘導体持続型結合体）、TNF抑制剤（抗TNF抗体）、又はその両方の併用投与によるインドメタシンによる炎症性腸疾患ラットの炎症部位（ulcer area）の変化を示した図である。

【図4】GLP-2（GLP-2誘導体持続型結合体）及びインスリン分泌ペプチド（GLP-1誘導体持続型結合体）の併用投与によるデキストラン硫酸ナトリウム（Dextran sulfate sodium, DSS）による潰瘍性大腸炎マウスの大腸の長さ変化を示した図である。 20

【図5】GLP-2（GLP-2誘導体持続型結合体）及びインスリン分泌ペプチド（GLP-1誘導体持続型結合体）の併用投与によるデキストラン硫酸ナトリウムによる潰瘍性大腸炎マウスの潰瘍性大腸炎活動指数（Disease activity index, DAI）を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明を具現する一態様は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を併用する腸疾患の予防、改善又は治療のための治療法である。

【0020】

本発明を具現する一態様は、GLP-2を含有する腸疾患の予防、改善又は治療のための組成物であり、前記GLP-2は、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方と併用投与されることを特徴とする組成物である。 30

【0021】

一つの具体例として、本発明は、薬学的有効量のGLP-2を含有する腸疾患の予防、改善又は治療のための薬学的組成物であり、前記薬学的組成物は、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方と併用投与されることを特徴とする。

【0022】

もう一つの具体例として、本発明は、GLP-2を含有する腸疾患の予防又は改善のための食品組成物であり、前記食品組成物は、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方と併用投与されることを特徴とする。 40

【0023】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記インスリン分泌ペプチドは、グルカゴン様ペプチド-1（Glucagon-like peptide-1, GLP-1）、エキセンジン-3、エキセンジン-4、それらの作用剤（agonist）、誘導体、断片、変異体、及びそれらの組み合わせで構成される群から選択されることを特徴とする。

【0024】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記インスリン分泌ペプチドは、インスリン分泌ペプチドのN-末端ヒスチジン残基がイミダゾアセチルデスヒスチジン、 50

デスアミノヒスチジン、 β -ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N-ジメチルヒスチジン、又は β -カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンで置換されたインスリン分泌ペプチド誘導体であることを特徴とする。

【0025】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記インスリン分泌ペプチドは、天然型エキセンジン-4、エキセンジン-4のN-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ-炭素及びアルファ-炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたエキセンジン-4誘導体、エキセンジン-4のN-末端アミノ基が除去されたエキセンジン-4誘導体、エキセンジン-4のN-末端アミノ基がヒドロキシル基で置換されたエキセンジン-4誘導体、エキセンジン-4のN-末端アミノ基が2個のメチル基で修飾されたエキセンジン-4誘導体、エキセンジン-4のN-末端アミノ基がカルボキシル基で置換されたエキセンジン-4誘導体、エキセンジン-4の12番目のアミノ酸（リシン）がセリンで置換されたエキセンジン-4誘導体、又はエキセンジン-4の12番目のアミノ酸（リシン）がアルギニンで置換されたエキセンジン-4誘導体であることを特徴とする。

10

【0026】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記GLP-2は、天然型GLP-2又はGLP-2誘導体であることを特徴とする。

【0027】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記GLP-2誘導体は、天然型GLP-2配列で少なくとも一つのアミノ酸に置換（substitution）、追加（addition）、除去（deletion）、修飾（modification）及びそれらの組み合わせからなる群から選択された改変が起きたGLP-2誘導体であることを特徴とする。

20

【0028】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記GLP-2誘導体は、配列番号1において1番目、2番目、30番目及び33番目のアミノ酸中、少なくとも一つのアミノ酸に改変が起きたことを特徴とする。

【0029】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記GLP-2誘導体は、下記一般式1で表されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする：

30

【0030】

[一般式1]

$X_1X_2DGSFSDENNTILDNLAARDFINWLIQT X_{30}ITDX_{34}$ （配列番号9）

【0031】

ここで、

X_1 は、ヒスチジン、イミダゾアセチルデスヒスチジン、デスアミノヒスチジン、 β -ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N-ジメチルヒスチジン、又は β -カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンであり；

40

X_2 は、アラニン、グリシン、又はAib（2-aminoisobutyric acid）であり；

X_{30} は、リシン又はアルギニンであり；

X_{34} は、存在しないか、リシン、アルギニン、グルタミン、ヒスチジン、6-アジドリシン又はシステインであり；

ただし、一般式1のアミノ酸配列中、配列番号1と同一の配列は除く。

【0032】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記GLP-2誘導体は、

(1) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} がシステインであるか、

50

(2) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} がリシンであるか、

(3) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がアルギニンであり、 X_{34} がリシンであるか、

(4) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} が6 - アジドリシンであるか、

(5) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がアルギニンであり、 X_{34} がシステインであるか、

(6) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がA i bであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} がシステインであるか、又は

(7) X_1 がヒスチジンであり、 X_2 がA i bであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} がシステインであることを特徴とする。

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記GLP - 2誘導体は、下記の一般式2で表されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする：

【0033】

[一般式2]

$X_1 X_2 D G S F S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T X_{30} I T D X_{34}$ (配列番号10)

【0034】

ここで、

X_1 はヒスチジン、イミダゾアセチルデスヒスチジン、デスアミノヒスチジン、 β -ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N - ジメチルヒスチジン、又は β -カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンであり；

X_2 は、アラニン、グリシン、又はA i b (2 - amino isobutyric acid)であり；

X_{30} は、リシン又はアルギニンであり；

X_{34} は、一つ以上の任意のアミノ酸又は改変が起きた一つ以上の任意のアミノ酸であり；

ただし、一般式2のアミノ酸配列中、配列番号1と同一の配列は除く。

【0035】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記GLP - 2誘導体は、配列番号2 ~ 8からなる群から選択されたアミノ酸配列のペプチドであることを特徴とする。

【0036】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、GLP - 2とインスリン分泌ペプチドが併用投与されることを特徴とする。

【0037】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、GLP - 2とTNF抑制剤が併用投与されることを特徴とする。

【0038】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、GLP - 2、インスリン分泌ペプチド、及びTNF抑制剤が併用投与されることを特徴とする。

【0039】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、TNF抑制剤は可溶性TNF受容体、抗TNF抗体又はその断片、又はそれらの組み合わせであることを特徴とする。

【0040】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記腸疾患は、過敏性腸疾患、腸炎、炎症性腸疾患、結腸炎、大腸炎、すい臓炎、回腸炎、腸萎縮、及び腸損傷からなる群から選択される少なくとも一つであることを特徴とする。

【0041】

前述した具体例のいずれか一つによる薬学的組成物として、前記炎症性腸疾患は、潰瘍

10

20

30

40

50

性大腸炎、クローン病及びベーチェット病からなる群から選択される少なくとも一つであることを特徴とする。

【0042】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記組成物は、個体に投与時、単球 (monocyte) で M1 分極化 (polarization) の抑制、マクロファージ分化の抑制、及び単球移動 (migration) の抑制の一つ以上を示すことを特徴とする。

【0043】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記組成物は、個体に投与時、小腸の長さ増加、小腸の炎症減少、大腸の長さ増加、及び大腸の炎症減少の少なくとも一つを引き起こすことを特徴とする。

【0044】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記インスリン分泌ペプチド及び GLP-2 は、その C-末端が改変されていないか、アミド化したことを特徴とする。

【0045】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、(i) 前記インスリン分泌ペプチドは、その生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態であるか、

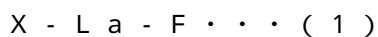
(ii) 前記 GLP-2 は、その生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態であるか、

(iii) 前記インスリン分泌ペプチド及び GLP-2 のそれぞれは、それらの生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態であることを特徴とする。

【0046】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記結合体は、下記化学式(1)で示されることを特徴とする：

【0047】



【0048】

ここで、

X は、インスリン分泌ペプチド又は GLP-2 であり；

L は、エチレングリコール繰り返し単位を含有するリンカーであり；

a は、0 又は自然数であり、ただし、a が 2 以上である時、それぞれの L は互いに独立しており；

F は、免疫グロブリン Fc 領域であり；

前記「-」は共有結合である。

【0049】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記免疫グロブリン Fc 領域は、非グリコシル化された IgG4 Fc 領域であることを特徴とする。

【0050】

前述した具体例のいずれか一つによる薬学的組成物として、前記 F は、二つのポリペプチド鎖からなる二量体であり、L の一方の末端が前記二つのポリペプチド鎖の一つのポリペプチド鎖のみに連結されていることを特徴とする。

【0051】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記 L は、ポリエチレングリコールであることを特徴とする。

【0052】

前述した具体例のいずれか一つによる薬学的組成物として、前記 L 内のエチレングリコール繰り返し単位部位の化学式量は 1 ~ 100 kDa の範囲にあることを特徴とする。

【0053】

10

20

30

40

50

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、前記組成物は、薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は希釈剤をさらに含むことを特徴とする。

【0054】

前述した具体例のいずれか一つによる組成物として、(i) GLP-2及びインスリン分泌ペプチド；(ii) GLP-2及びTNF抑制剤；又は(iii) GLP-2、インスリン分泌ペプチド、及びTNF抑制剤が同時に、順次又は逆順で併用投与されることを特徴とする。

【0055】

本発明を具現する他の一態様は、GLP-2とインスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を含む組み合わせ物である。

10

【0056】

本発明を具現する他の一態様は、前記組み合わせ物を含む、腸疾患の予防、改善又は治療用薬学的組成物である。

【0057】

本発明を具現する他の一態様は、前記組み合わせ物を含む、腸疾患の予防、改善又は治療用薬学的キットである。

【0058】

本発明を具現する他の一態様は、前記組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットをそれを必要とする個体に投与及び/又は使用する段階を含む腸疾患の予防、改善又は治療方法である。

20

【0059】

本発明を具現する他の一態様は、薬学的有効量のGLP-2を含有する組成物と、薬学的有効量のインスリン分泌ペプチドを含有する組成物、薬学的有効量のTNF抑制剤を含有する組成物、又はその両方をそれを必要とする個体に併用投与及び/又は併用使用する段階を含む腸疾患の予防、改善又は治療方法である。

【0060】

本発明を具現する他の一態様は、前記組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットの腸疾患の予防、改善又は治療用途、及び/又は腸疾患の予防又は治療のための薬剤の製造のための用途である。

【0061】

以下では、本発明をより詳細に説明する。

30

【0062】

一方、本願において開示されるそれぞれの説明及び実施形態は、それぞれの他の説明及び実施形態にも適用することができる。即ち、本願において開示された多様な要素の全ての組み合わせが本発明の範疇に属する。また、下記の具体的な記述により本発明の範疇が制限されるとは見られない。

【0063】

また、当該技術分野における通常の知識を有する者であれば、通常の実験のみを用いて本出願に記載された本発明の特定の様態に対する多数の等価物を認知又は確認することができる。また、そのような等価物は、本発明に含まれることが意図される。

40

【0064】

本明細書全体を通じて、天然に存在するアミノ酸に対する通常の一文字及び3文字コードが用いられるだけでなく、Aib(2-aminoisobutyric acid)、AZK(6-azidolysine)などのような他のアミノ酸について一般に許容される3文字コードが用いられる。また、本明細書で略語として言及されたアミノ酸はIUPAC-IUB命名法により記載された。

【0065】

アラニン Ala、A アルギニン Arg、R
 アスパラギン Asn、N アスパラギン酸 Asp、D
 システイン Cys、C グルタミン酸 Glu、E

50

グルタミン Gln、Q グリシン Gly、G
 ヒスチジン His、H イソロイシン Ile、I
 ロイシン Leu、L リシン Lys、K
 メチオニン Met、M フェニルアラニン Phe、F
 プロリン Pro、P セリン Ser、S
 スレオニン Thr、T トリプトファン Trp、W
 チロシン Tyr、Y バリン Val、V

【0066】

本発明を具現する一態様は、GLP-2を含有する腸疾患の予防、改善又は治療のための薬学的組成物であり、前記GLP-2は、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方と併用投与されることを特徴とする薬学的組成物を提供する。 10

【0067】

本発明の一つの具体例において、前記薬学的組成物は、薬学的有効量のGLP-2を含有する腸疾患の予防、改善又は治療のための薬学的組成物であり、前記薬学的組成物は、インスリン分泌ペプチド（例えば、薬学的有効量のインスリン分泌ペプチド）、TNF抑制剤（例えば、薬学的有効量のTNF抑制剤）、又はその両方と併用投与されることを特徴とすることができるが、これに制限されない。

【0068】

本発明のもう一つの態様は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を併用する腸疾患の予防、改善又は治療用途を提供する。 20

【0069】

もう一つの具体例は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を併用する腸疾患の予防、改善又は治療用薬学的組成物を提供する。

【0070】

具体的には、本発明の一態様は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を含む組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットを提供する。一つの具体例として、腸疾患の予防、改善又は治療用組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットを提供する。

【0071】

本発明において用語「組み合わせ物 (combination)」は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方の併用投与用途を有するものであり、「併用用途 (combined used)」と同意で理解される。これは、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方が併用されることを特徴とする薬学的組成物及び薬学的キット形態も含むが、これに制限されない。 30

【0072】

具体的には、(i) GLP-2及びインスリン分泌ペプチド；(ii) GLP-2及びTNF抑制剤；又は(iii) GLP-2、インスリン分泌ペプチド、及びTNF抑制剤が同時、順次に又は逆順で併用投与されてもよい。

【0073】

前記併用投与は、

i) GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を混合物の形態又は別個の分離した形態で含む薬学的組成物を用いて併用投与するか、

ii) GLP-2を含有する薬学的組成物と、インスリン分泌ペプチドを含有する薬学的組成物、TNF抑制剤を含有する薬学的組成物、又はその両方を同時、順次に又は逆順で併用投与するか、

iii) GLP-2、インスリン分泌ペプチド、及びTNF抑制剤の二つの物質を混合物の形態又は別個の分離した形態で含む薬学的組成物と、残った一つの物質を同時、順次に又は逆順で併用投与することであってもよいが、これに制限されない。

【0074】

前記組み合わせ物又は組成物は、

40

50

a) (i) GLP-2 及びインスリン分泌ペプチドが混合された一つの混合物 (mixture) で投与されるものであるか、(ii) GLP-2 及び TNF 抑制剤が混合された一つの混合物で投与されるものであるか、(iii) GLP-2、インスリン分泌ペプチド及び TNF 抑制剤が混合された一つの混合物で投与されるものであるか；又は

b) (i) GLP-2 及びインスリン分泌ペプチドが分離した形態で投与されるものであるか、(ii) GLP-2 及び TNF 抑制剤が分離した形態で投与されるものであるか、(iii) GLP-2、インスリン分泌ペプチド及び TNF 抑制剤が分離した形態で投与されるものであるか；又は

c) (i) GLP-2 とインスリン分泌ペプチドが混合された一つの混合物及び TNF 抑制剤が分離した形態で投与されるものであるか、(ii) GLP-2 と TNF 抑制剤が混合された一つの混合物及びインスリン分泌ペプチドが分離した形態で投与されるものであるか、(iii) インスリン分泌ペプチドと TNF 抑制剤が混合された一つの混合物及び GLP-2 が分離した形態で投与されるものであってもよいが、これに制限されない。

10

【0075】

前記 b) のように分離した形態である場合、(i) GLP-2 及びインスリン分泌ペプチド；(ii) GLP-2 及び TNF 抑制剤；又は (iii) GLP-2、インスリン分泌ペプチド、及び TNF 抑制剤がそれぞれ別個の分離した形態で共に製剤化されるか；又はそれぞれ別個の製剤で製剤化されて別個の製剤が同時、個別、順次、又は逆順で投与されてもよい。

20

【0076】

また、前記 c) のように分離した形態である場合、前記混合物とインスリン分泌ペプチド、GLP-2、又は TNF 抑制剤がそれぞれ別個の分離した形態で共に製剤化されるか；又はそれぞれ別個の製剤で製剤化されて別個の製剤が同時、個別、順次、又は逆順で投与されてもよい。

【0077】

本発明において、「併用投与」、「併用される」又は「併用する」とは、単に同時の投与を意味するだけでなく、GLP-2 とインスリン分泌ペプチド、TNF 抑制剤、又はその両方が個体に共に作用し、各物質（インスリン分泌ペプチド、GLP-2、及び / 又は TNF 抑制剤）が本来の機能と同等又はそれ以上の水準を遂行できる投与形態として理解されなければならない。したがって、本願において、「併用」という用語が使用される場合、これは同時、個別、順次、又は逆順投与を示すことであり、その順序が無制限であるものと理解されなければならない。前記投与が順次、逆順又は個別である場合、投与の順序は特に制限されず、ただし、2 次以上の成分投与の間隔は、前記併用の有益な効果を失わないようにしなければならない。

30

【0078】

本発明において用語「組み合わせ物を含む組成物 (composition)」は、前記 GLP-2 とインスリン分泌ペプチド、TNF 抑制剤、又はその両方を含む組み合わせ物それ自体であるか、これを含み、治療学的用途を有するものであってもよいが、これに制限されない。その例として、腸疾患の予防、改善又は治療用途を有するものであってもよいが、これに制限されない。本願において「組み合わせ物を含む組成物」は「組成物」と互換して使用することができる。

40

【0079】

本発明による組み合わせ物を含む組成物は、GLP-2 とインスリン分泌ペプチド、TNF 抑制剤、又はその両方を併用投与するためのものであり、GLP-2 とインスリン分泌ペプチド、TNF 抑制剤、又はその両方が一つの製剤に製剤化されたものであるか、又は二つ以上の個別の製剤に製剤化されたものであってもよい。具体的には、GLP-2 とインスリン分泌ペプチド、TNF 抑制剤、又はその両方を同時、個別、順次、又は逆順で投与するものであってもよいが、これに制限されない。

【0080】

50

本発明において用語「キット」は、GLP-2とインスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を併用投与するために、本発明による組み合わせ物又は組成物を含むものであってもよい。具体的には、本発明によるキットには、a)一つの製剤に製剤化された、(i)GLP-2及びインスリン分泌ペプチド、(ii)GLP-2及びTNF抑制剤、又は(iii)GLP-2、インスリン分泌ペプチド、及びTNF抑制剤；b)(i)GLP-2及びインスリン分泌ペプチドそれぞれの個別製剤、(ii)GLP-2及びTNF抑制剤それぞれの個別製剤、又は(iii)GLP-2、インスリン分泌ペプチド、及びTNF抑制剤それぞれの個別製剤；又はc)(i)GLP-2とインスリン分泌ペプチドが一つに製剤化された製剤及びTNF抑制剤の個別製剤、(ii)GLP-2とTNF抑制剤が一つに製剤化された製剤及びインスリン分泌ペプチドの個別製剤、又は(iii)インスリン分泌ペプチドとTNF抑制剤が一つに製剤化された製剤及びGLP-2の個別製剤を含むものであってもよく、二つ以上の物質の併用投与に必要な物質をさらに含むものであってもよいが、これに制限されない。

10

【0081】

本発明は、GLP-2とインスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を併用して使用する場合、インスリン分泌ペプチド、GLP-2、及びTNF抑制剤の単独に比べて腸疾患の予防、改善又は治療効果が画期的に増加することを確認し、前記併用使用治療法を提供することになった。

【0082】

前記「インスリン分泌ペプチド」とは、インスリン分泌機能を有するペプチドを意味し、膵臓ベータ細胞のインスリンの合成又は発現を刺激することができる。前記インスリン分泌ペプチドは、その例として、GLP-1(Glucagon like peptide-1)、エキセンジン-3(exendin-3)又はエキセンジン-4(exendin-4)であってもよいが、これに制限されない。前記インスリン分泌ペプチドは、天然型インスリン分泌ペプチドだけでなく、その前駆物質(precursors)、作用剤(agonist)、誘導体(derivatives)、断片(fragment)及び変異体(variants)などを含み、また、これらの生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された持続型結合体の形態も含む。前記インスリン分泌ペプチドは、薬学的有効量で薬学的組成物に含まれてもよい。

20

【0083】

GLP-1は、小腸から分泌されるホルモンであり、一般に、インスリン生合成及び分泌を促進してグルカゴン分泌を抑制し、細胞内グルコース吸収を促進する。小腸においてグルカゴン前駆体は3個のペプチドに分解されるが、グルカゴン、GLP-1、GLP-2である。ここで、GLP-1はGLP-1(1-37)を意味し、インスリン分泌機能がない形態であり、GLP-1(7-37)の形態でプロセッシングされて活性型GLP-1(7-37)になる。GLP-1(7-37)アミノ酸配列は、下記の通りである。

30

【0084】

GLP-1(7-37)：

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG(配列番号32)

40

【0085】

エキセンジン-3とエキセンジン-4は、GLP-1と53%のアミノ酸配列類似性を示す39個のアミノ酸からなるGLP-1類似体又は誘導体であり、インスリン分泌ペプチドに該当する。エキセンジン-3とエキセンジン-4のアミノ酸配列は、下記の通りである。

【0086】

エキセンジン-3：

HSDGTFTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNGG PSS
GA PPPS(配列番号33)

エキセンジン-4：

50

H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S
G A P P P S (配列番号34)

【0087】

インスリン分泌ペプチド誘導体は、インスリン分泌機能を有し、天然型インスリン分泌ペプチドとアミノ酸配列において少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の相同性又は同一性を示すものであってもよく、であるか、インスリン分泌ペプチドのアミノ酸のある残基の一部のグループが化学的に置換(例; α -methylation, α -hydroxylation)、除去(例; deamination)又は修飾(例; N-methylation)された形態であってもよいが、これに制限されるものではない。

10

【0088】

一つの具体的な実施形態において本発明のインスリン分泌ペプチド誘導体は、N-末端ヒスチジンのアルファアミノ基を除去する方法、N-末端アミノ基をヒドロキシル(hydroxyl)基又はカルボキシル(carboxyl)基で置換して合成する方法、N-末端ヒスチジンのアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基を除去してイミダゾアセチル(imidazoacetyl)官能基のみを残す方法、N-末端アミノ基を2個のメチル基で修飾する方法などを通じて製造することができる。前記方法を通じて製造されたインスリン分泌ペプチド誘導体は、インスリン分泌ペプチドのN-末端ヒスチジン残基がイミダゾアセチルデスヒスチジン、デスアミノヒスチジン、 β -ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N-ジメチルヒスチジン、又は β -カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンで置換されたインスリン分泌ペプチド誘導体であってもよい。

20

【0089】

一つの具体的な例として、インスリン分泌ペプチド誘導体は、GLP-1誘導体であってもよく、GLP-1誘導体は、エキセンジン-3、エキセンジン-4、又はこれらの誘導体を含むが、これに制限されない。

【0090】

また、インスリン分泌ペプチド誘導体の例としてエキセンジン-4のN-末端アミノ基又はアミノ酸残基を化学的に変異させた誘導体であってもよく、エキセンジン-4のN-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたイミダゾアセチルデスヒスチジルエキセンジン-4(imidazoacetyl-deshistidyl-exendin-4, CA-exendin-4)、エキセンジン-4のN-末端アミノ基が除去されたデスアミノヒスチジルエキセンジン-4(desaminohistidyl-exendin-4, DA-exendin-4)、エキセンジン-4のN-末端アミノ基がヒドロキシル基で置換された β -ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジルエキセンジン-4(β -hydroxyimidazopropionyl-deshistidyl-exendin-4, HY-exendin-4)、エキセンジン-4のN-末端アミノ基が2個のメチル基で修飾されたN-ジメチルヒスチジルエキセンジン-4(N-dimethylhistidyl-exendin-4, DM-exendin-4)、又はエキセンジン-4のN-末端アミノ基がカルボキシル基で置換された β -カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジル-エキセンジン-4(β -carboxyimidazopropionyl-deshistidyl-exendin-4, CX-exendin-4)、エキセンジン-4の12番目のアミノ酸(リシン)がセリンで置換されたエキセンジン-4誘導体、又はエキセンジン-4の12番目のアミノ酸(リシン)がアルギニンで置換されたエキセンジン-4誘導体であってもよいが、これに制限されない。

30

40

【0091】

インスリン分泌ペプチド断片とは、天然型インスリン分泌ペプチドのN-末端又はC-末端の一つ以上のアミノ酸が除去及び/又は追加された形態を意味し、追加されたアミノ酸は、天然に存在しないアミノ酸(例; D型アミノ酸)も可能である。

50

【0092】

インスリン分泌ペプチド変異体は、天然型インスリン分泌ペプチドとアミノ酸が一つ以上異なるペプチドであり、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の相同性又は同一性を示し、インスリン分泌機能を有するペプチドを意味する。

【0093】

インスリン分泌ペプチド作用剤とは、インスリン分泌ペプチドの構造と関係なくインスリン分泌ペプチドの生体内受容体に結合してインスリン分泌ペプチドと同一な生物学的活性を示す物質を意味する。

【0094】

本発明の誘導体、断片、変異体及び作用剤においてそれぞれ使用された製造方法は、独立して使用してもよく、組み合わせも可能である。例えば、アミノ酸配列が一つ以上異なり、N-末端アミノ酸残基に脱アミノ化 (deamination) されたインスリン分泌ペプチドも本発明を含む。

【0095】

本発明において用語「グルカゴン様ペプチド-2」又は「GLP-2 (Glucagon-like peptide-2)」はグルカゴン様ペプチド-2受容体の作用剤 (agonist) であり、ポリペプチド形態又はその生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された持続型結合体の形態であってもよいが、これに制限されない。

【0096】

本発明においてグルカゴン様ペプチド-2又はGLP-2は、天然型ヒトGLP-2と一致する配列だけでなく、GLP-2誘導体も含まれ、天然型GLP-2又はGLP-2誘導体に生体適合性物質が結合された形態の持続型結合体も含む概念である。前記GLP-2は、インスリン分泌ペプチドを含有する薬学的組成物と併用投与又は使用できるように、前記組成物に又はこれと別個の組成物に薬学的有効量で含まれ得る。

【0097】

天然型GLP-2のアミノ酸配列は、下記の通りである。

【0098】

GLP-2 (1-33)

H A D G S F S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T K I T D (配列番号 1)

【0099】

本発明において「GLP-2受容体作用剤」は、生体内又は分離したヒトグルカゴン様ペプチド-2受容体と結合して天然型GLP-2と同等若しくは類似の生理活性を引き起こす物質を言う。例えば、GLP-2作用剤には天然型GLP-2又はGLP-2誘導体が含まれ得る。

【0100】

本発明において「GLP-2誘導体」は、天然型GLP-2と比較してアミノ酸配列に一つ以上の差があるペプチド；天然型GLP-2配列を改質 (modification) して改変させたペプチド；及び/又は天然型GLP-2のように腸疾患の予防、治療及び/又は改善機能を有する天然型GLP-2の模倣体を含む。具体的には、前記GLP-2誘導体は、天然型GLP-2配列で少なくとも一つ以上のアミノ酸に置換 (substitution)、追加 (addition)、除去 (deletion)、修飾 (modification) 及びそれらの組み合わせからなる群から選択された改変が起きたものであってもよいが、これに制限されない。

【0101】

追加されるアミノ酸は、非天然型アミノ酸 (例；D型アミノ酸) も可能であり、天然型アミノ酸以外に非天然型アミノ酸の置換も可能である。前記追加されるアミノ酸配列は、天然型GLP-2に由来したものであってもよいが、これに制限されない。また、本発明においてアミノ酸の改変は、少なくとも一つのアミノ酸の置換、追加、除去、又はそれら

10

20

30

40

50

の組み合わせと共に；又はこれと独立してアミノ酸残基の一部のグループが化学的に置換（例；*alpha*-methylation, *alpha*-hydroxylation, azido基で置換）、除去（例；deamination）及び/又は修飾（例；N-methylation）されたことを意味し得るが、これに制限されるものではない。

【0102】

一つの具体的な実施形態において、本発明のGLP-2の誘導体は、天然型GLP-2とアミノ酸配列で少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の相同性又は同一性を示すものであってもよく/であるが、GLP-2のアミノ酸のある残基の一部のグループが化学的に置換（例；*alpha*-methylation, *alpha*-hydroxylation, azido基で置換）、除去（例；deamination）及び/又は修飾（例；N-methylation）された形態であってもよいが、これに制限されるものではない。

10

【0103】

一つの具体的な実施形態において本発明のGLP-2は、N-末端アミノ基が置換、除去、又は修飾されてもよいが、これに制限されない。本発明のGLP-2は、持続型結合体の製造時にGLP-2の生体内活性に重要な部位であるN-末端に結合が起きることを防止するために、N-末端ヒスチジンのアルファアミノ基を除去する方法、N-末端アミノ基をヒドロキシル（hydroxyl）基又はカルボキシル（carboxyl）基で置換して合成する方法、N-末端ヒスチジンのアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基を除去してイミダゾアセチル（imidazoacetyl）官能基のみを残す方法、N-末端アミノ基を2個のメチル基で修飾する方法などを通じて製造することができる。

20

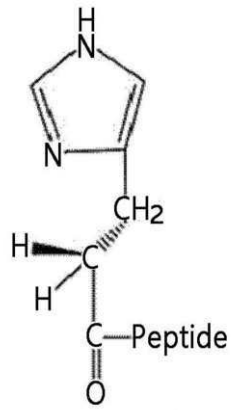
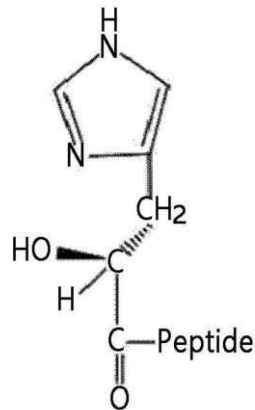
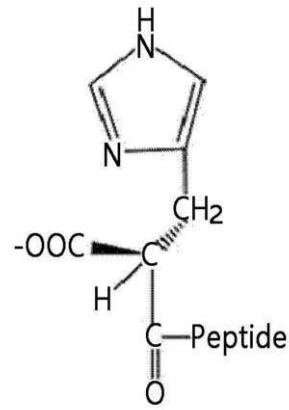
【0104】

具体的には、GLP-2誘導体は、GLP-2のN-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたイミダゾアセチルデスヒスチジルGLP-2（imidazoacetyl-des-histidyl-GLP-2, CA-GLP-2）、GLP-2のN-末端アミノ基が除去されたデアミノヒスチジルGLP-2（desaminohistidyl-GLP-2, DA-GLP-2）、GLP-2のN-末端アミノ基がヒドロキシル基で置換されたベータ-ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジルGLP-2（-hydroxyimidazopropionyl-des-histidyl-GLP-2, HY-GLP-2）、GLP-2のN-末端アミノ基が2個のメチル基で修飾されたN-ジメチルヒスチジルGLP-2（N-dimethylhistidyl-GLP-2, DM-GLP-2）、又はGLP-2のN-末端アミノ基がカルボキシル基で置換されたベータ-カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジル-GLP-2（-carboxyimidazopropionyl-des-histidyl-GLP-2, CX-GLP-2）であってもよいが、これに制限されない。一つの非制限的な例示としてGLP-2誘導体の製造に使用された物質の構造は、下記の通りである。

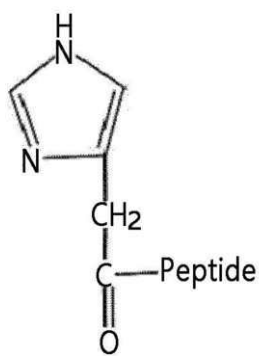
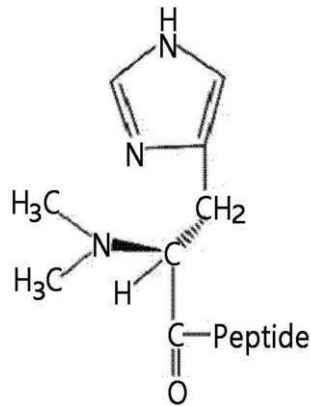
30

【0105】

40

Des-amino-histidyl
(DA)-GLP-2Beta-hydroxy-imidazopropionyl
(HY)-GLP-2Beta-carboxyl-imidazopropionyl
(CX)-GLP-2

10

Imidazoacetyl
(CA)-GLP-2Dimethyl-histidyl
(DM)-GLP-2

20

【 0 1 0 6 】

本願においてイミダゾアセチルデスヒスチジル（ジン）、デスアミノヒスチジル（ジン）、ベータ - ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジル（ジン）、N - ジメチルヒスチジル（ジン）、及びベータ - カルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジル（ジン）は、それぞれイミダゾアセチル、デス - アミノ - ヒスチジル、ベータ - ヒドロキシ - イミダゾプロピオニル、ジメチル - ヒスチジル、ベータ - カルボキシル - イミダゾプロピオニルと同意で用いられる。

30

【 0 1 0 7 】

一つの具体的な実施形態において、前記 G L P - 2 誘導体は、配列番号 1 において 1 番目、2 番目、30 番目及び 33 番目のアミノ酸中、少なくとも一つのアミノ酸に改変が起きたものであってもよいが、これに制限されない。具体的には、前記改変は、少なくとも一つのアミノ酸の置換、追加、除去、修飾、及びそれらの組み合わせからなる群から選択された改変であってもよく、その時に追加されるアミノ酸は、非天然型アミノ酸（例；D 型アミノ酸）も可能であり、天然型アミノ酸以外に非天然型アミノ酸の置換も可能である。前記追加されるアミノ酸配列は、天然型 G L P - 2 に由来したものであってもよいが、これに制限されない。また、本発明においてアミノ酸の改変は、少なくとも一つのアミノ酸の置換、追加、除去、又はそれらの組み合わせと共に；又はこれと独立してアミノ酸残基の一部の基が化学的に置換（例；alpha - methylation, alpha - hydroxylation, azido 基で置換）、除去（例；deamination）及び / 又は修飾（例；N - methylation）されたことを意味するが、これに制限されるものではない。

40

【 0 1 0 8 】

50

一つの具体的な実施形態において、GLP-2誘導体は、下記の一般式1のアミノ酸配列を含んでもよいが、これに制限されない：

【0109】

[一般式1]

$X_1 X_2 D G S F S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T X_{30} I T D X_{34}$

(配列番号9)

【0110】

ここで、

X_1 は、ヒスチジン、イミダゾアセチルデスヒスチジン、デスアミノヒスチジン、
- ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N-ジメチルヒスチジン、又は - カ 10
ルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンであり；

X_2 は、アラニン、グリシン、又はAib(2-aminoisobutyric acid)であり；

X_{30} は、リシン又はアルギニンであり；

X_{34} は、存在しないか、リシン、アルギニン、グルタミン、ヒスチジン、6-アジド
リシン、又はシステインである。

【0111】

もう一つの具体的な実施形態において、GLP-2誘導体は、下記の一般式2のアミノ酸配列を含んでもよいが、これに制限されない：

【0112】

[一般式2]

$X_1 X_2 D G S F S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T X_{30} I T D X_{34}$

(配列番号10)

【0113】

ここで、

X_1 は、ヒスチジン、イミダゾアセチルデスヒスチジン、デスアミノヒスチジン、
- ヒドロキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジン、N-ジメチルヒスチジン、又は - カ
ルボキシイミダゾプロピオニルデスヒスチジンであり；

X_2 は、アラニン、グリシン、又はAib(2-aminoisobutyric acid)であり；

X_{30} は、リシン又はアルギニンであり；

X_{34} は、一つ以上の任意のアミノ酸又は改変が起きた一つ以上の任意のアミノ酸である。

【0114】

具体的には、前記アミノ酸は、天然型アミノ酸又は非天然型アミノ酸であってもよく、
前記アミノ酸の改変は、前述した通りである。

【0115】

また、前記一般式1又は2のアミノ酸配列中、配列番号1と同一の配列は、GLP-2
誘導体から除外されるが、これに制限されない。

【0116】

具体的には、本発明のGLP-2誘導体は、天然型GLP-2の2番目のアミノ酸である
アラニンのグリシン又はAib(2-aminoisobutyric acid)での置換、30番目のアミノ酸である
リシンのアルギニンでの置換、又はそれらの組み合わせを有してもよいが、これに制限
されない。また、前記GLP-2誘導体は、C-末端(例えば、33番目のアミノ酸)にチオール基
(例えば、システイン)、アミノ基(例えば、リシン、アルギニン、グルタミン又はヒスチジン)、
又はアジド基(例えば、6-アジドリシン)が導入されてもよいが、これに制限されない。

【0117】

GLP-2誘導体の持続型結合体の製造時に前記導入された基で結合が起きるため、
これを用いて結合位置が選択的に調節されたGLP-2結合体を製造することができる。具

10

20

30

40

50

体的には、GLP-2誘導体のヒドロキシル基、チオール基、アミノ基又はアジド基にリンカーの一方の末端が結合され、リンカーの他方の末端に生体内半減期を増加させる物質（例えば、免疫グロブリンFc領域）が結合されてもよい。前記チオール基、アミノ基又はアジド基は、GLP-2にアミノ酸を追加して導入させてもよいが、これに制限されない。前記チオール基は、GLP-2にシステイン（C）を追加させて導入され；アミノ基は、リシン（K）、アルギニン（R）、グルタミン（Q）又はヒスチジン（H）を追加させて導入され；アジド基は、6-アジドリシン（6-azidolysine, AZK）を追加させて導入されてもよいが、これに制限されない。

【0118】

具体的には、本発明によるGLP-2誘導体は、少なくとも一つの残基がシステイン、リシン、アルギニン、グルタミン、ヒスチジン又は6-アジドリシンであってもよいが、これに制限されない。

10

【0119】

具体的には、本発明のGLP-2誘導体は、天然型GLP-2の2番目のアミノ酸であるアラニンのグリシンでの置換及びC-末端にチオール基（例えば、システイン）の導入を含み、より具体的には、N-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたイミダゾアセチルデスヒスチジンを含むことができ、その例として配列番号2のアミノ酸配列を有してもよいが、これに制限されない。

【0120】

具体的には、本発明のGLP-2誘導体は、天然型GLP-2の2番目のアミノ酸であるアラニンのグリシンでの置換及びC-末端にアミノ基（例えば、リシン）の導入を含み、より具体的には、N-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたイミダゾアセチルデスヒスチジンを含むことができ、その例として配列番号3のアミノ酸配列を有してもよいが、これに制限されない。

20

【0121】

具体的には、本発明のGLP-2誘導体は、天然型GLP-2の2番目のアミノ酸であるアラニンのグリシンでの置換、天然型GLP-2の30番目のアミノ酸であるリシンのアルギニンでの置換及びC-末端にアミノ基（例えば、リシン）の導入を含み、より具体的には、N-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたイミダゾアセチルデスヒスチジンを含むことができ、その例として配列番号4のアミノ酸配列を有してもよいが、これに制限されない。

30

【0122】

具体的には、本発明のGLP-2誘導体は、天然型GLP-2の2番目のアミノ酸であるアラニンのグリシンでの置換及びC-末端にアジド基（例えば、6-アジドリシン）の導入を含み、より具体的には、N-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたイミダゾアセチルデスヒスチジンを含むことができ、その例として配列番号5のアミノ酸配列を有してもよいが、これに制限されない。

40

【0123】

具体的には、本発明のGLP-2誘導体は、天然型GLP-2の2番目のアミノ酸であるアラニンのグリシンでの置換、天然型GLP-2の30番目のアミノ酸であるリシンのアルギニンでの置換及びC-末端にチオール基（例えば、システイン）の導入を含み、より具体的には、N-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ炭素及びアルファ炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたイミダゾアセチルデスヒスチジンを含むことができ、その例として配列番号6のアミノ酸配列を有してもよいが、これに制限されない。

【0124】

50

具体的には、本発明のGLP-2誘導体は、天然型GLP-2の2番目のアミノ酸であるアラニンの2-アミノイソブチル酸での置換及びC-末端にチオール基（例えば、システイン）の導入を含み、その例として配列番号8のアミノ酸配列を有してもよく、より具体的には、N-末端の最初のアミノ酸であるヒスチジン残基のアルファ-炭素及びアルファ-炭素に結合されたN-末端アミノ基が除去されたイミダゾアセチルデスヒスチジンを含むことができ、その例として配列番号7のアミノ酸配列を有してもよいが、これに制限されない。

【0125】

前記配列番号2～8のGLP-2誘導体を下記表1に示した。

【0126】

【表1】

名称	配列	配列番号
CA GLP-2 KC	${}_{ca}$ HGDGFSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	2
CA GLP-2 KK	${}_{ca}$ HGDGFSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDK	3
CA GLP-2 RK	${}_{ca}$ HGDGFSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTRITDK	4
CA GLP-2 K _{Az} K	${}_{ca}$ HGDGFSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD _{Az} K	5
CA GLP-2 RC	${}_{ca}$ HGDGFSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTRITDC	6
CA GLP-2 Aib	${}_{ca}$ HAibDGSFSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	7
GLP-2 Aib	HAibDGSFSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	8

【0127】

前記の表1において ${}_{ca}$ Hはヒスチジンの代わりにイミダゾアセチルデスヒスチジンで置換されたものを、Aibは2-アミノイソブチル酸(2-aminoisobutyric acid)を、AzKは6-アジド-L-リシン(6-azido-L-lysine)を示す。

【0128】

本発明によるGLP-2は、前述した特定配列を含むペプチド、前述した特定配列で構成された(又は必須で構成された)ペプチドであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0129】

一方、本願において「特定の配列番号で構成される(からなる)」ペプチド又はGLP-2と記載されているとしても、当該配列番号のアミノ酸配列からなるペプチド又はGLP-2と同一又は対応する活性を有する場合であれば、当該配列番号のアミノ酸配列の前後の無意味な配列の追加又は自然に起こり得る突然変異、あるいはその非表現突然変異(silent mutation)を除くものではなく、このような配列の追加もしくは突然変異を有する場合にも、本願の範囲内に属することが自明である。

【0130】

具体的には、GLP-2誘導体は、一般式1又は2において(1)X₂がグリシン又はAibであるか、(2)X₃₀がリシン又はアルギニンであるか、又は(3)X₂がグリシン又はAibであり、X₃₀がリシン又はアルギニンであってもよいが、これに制限されない。

10

20

30

40

50

【0131】

具体的には、GLP-2誘導体は、一般式1又は2において

(1) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} がシステインであるか、

(2) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} がリシンであるか、

(3) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がアルギニンであり、 X_{34} がリシンであるか、

(4) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} が6-アジドリシンであるか、

(5) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がグリシンであり、 X_{30} がアルギニンであり、 X_{34} がシステインであるか、

(6) X_1 がイミダゾアセチルデスヒスチジンであり、 X_2 がAibであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} がシステインであるか、又は

(7) X_1 がヒスチジンであり、 X_2 がAibであり、 X_{30} がリシンであり、 X_{34} がシステインであってもよいが、これに制限されない。

【0132】

本発明において天然型GLP-2の作用剤、断片、変異体及び誘導体の製造のためのこのような改変は、L-型若しくはD-型アミノ酸、及び/又は非-天然型アミノ酸を利用した改変；及び/又は天然型配列を修飾若しくは翻訳後の修飾(例、メチル化、アシル化、ユビキチン化、分子内共有結合など)することにより改変することを全て含む。

【0133】

本発明において、前記GLP-2又はGLP-2誘導体は、生体内のタンパク質切断酵素から保護し、安定性を増加させるために、そのN-末端及び/又はC-末端などが化学的に修飾されたり有機基で保護されたり、又はGLP-2又はGLP-2誘導体は末端などにアミノ酸が追加されて改変された形態であってもよい。

【0134】

特に、化学的に合成したペプチドの場合、N-及びC-末端が電荷を帯びているため、このような電荷を除去するために、N-末端をアセチル化(acetylation)及び/又はC-末端をアミド化(amidation)してもよいが、特にこれに制限されない。具体的には、本発明において、GLP-2又はGLP-2誘導体は、そのC-末端が改変されていないか、又はアミド化したものであってもよいが、これに制限されない。

【0135】

本発明において用語「TNF (Tumor Necrosis Factor α 1) 抑制剤」は、TNFの活性を減少させる物質を総称し、GLP-2と共に又はGLP-2及びインスリン分泌ペプチドと共に併用療法に使用され、単独に比べて腸疾患を予防、改善又は治療できる物質を制限なく含む。具体的には、TNF抑制剤は、TNFに結合したりTNFの受容体に結合し、最終的に、TNFとその受容体との間の結合を妨害することによりTNFの活性を減少させる物質；又は細胞のTNF生産を減少させることによりTNFの活性を減少させる物質であってもよく、そのような物質は、化合物、核酸、又はペプチドなど、その形態に制限されない。

【0136】

一つの具体的な例として、TNF抑制剤は、可溶性TNF受容体[例えば、エタネルセプト(etanercept)]、抗TNF抗体又はその断片[例えば、インフリキシマブ(infliximab)、アダリムマブ(adalimumab)、セルトリズマブペゴル(certolizumab pegol)、ゴリムマブ(golimumab)]、化合物[例えば、サリドマイド(thalidomide)及びその誘導体(例えば、レナリドミド(lenalidomide)、ポマリドミド(pomalidomide)]；キサントシン(xanthine)及びその誘導体(例えば、ペントキシフィリン(pentoxifylline))、ブプロピオン(bupropion)；5-

10

20

30

40

50

H T₂A アゴニスト (例えば、(R) - DOI ((R) - 2, 5 - Dimethoxy - 4 - iodoamphetamine)、TCB - 2、LSD (Lysergic acid diethylamide)、LA - SS - Az (Lysergic acid 2, 4 - dimethylazetidine))]、又はそれらの組み合わせであってもよいが、これに制限されない。そのような物質だけでなく、当業界に TNF の活性を減少させることが知られている物質も本願において TNF 抑制剤として使用することができる。具体的には、TNF 抑制剤は、可溶性 TNF 受容体、抗 TNF 抗体又はその断片、又はそれらの組み合わせであってもよいが、これに制限されない。

【0137】

本発明において、インスリン分泌ペプチド及び/又は GLP - 2 は、それぞれの生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された持続型結合体の形態であってもよいが、これに制限されない。前記持続型結合体は、生体適合性物質 (例として、免疫グロブリン Fc 領域) が結合されていないインスリン分泌ペプチド又は GLP - 2 の誘導体に比べて増加した効力の持続性を示すことができ、本発明では、インスリン分泌ペプチド又は GLP - 2 に生体適合性物質が結合して半減期が増加した、インスリン分泌ペプチド又は GLP - 2 を含む結合体をそれぞれ「インスリン分泌ペプチド持続型結合体又はインスリン分泌ペプチドの持続型結合体」又は「GLP - 2 持続型結合体又は GLP - 2 の持続型結合体」と称する。本発明において持続型結合体は、結合体と混用される。

【0138】

一つの実例において、

(i) 前記インスリン分泌ペプチドは、その生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態であるか、

(ii) 前記 GLP - 2 は、その生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態であるか、

(iii) 前記インスリン分泌ペプチド及び GLP - 2 のそれぞれは、これらの生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、持続型結合体の形態であってもよい。

【0139】

一方、このような結合体は、非自然な (non - naturally occurring) ものもであってもよい。

【0140】

また、持続型結合体においてインスリン分泌ペプチド又は GLP - 2 と生体適合性物質 (例として、免疫グロブリン Fc 領域) の連結は、物理又は化学結合であるか、非共有又は共有結合であってもよく、具体的には、共有結合であってもよいが、これに制限されない。

【0141】

また、持続型結合体においてインスリン分泌ペプチド又は GLP - 2 と生体適合性物質 (例として、免疫グロブリン Fc 領域) の連結方法は、特に制限されないが、リンカーを通じてインスリン分泌ペプチド又は GLP - 2 と生体適合性物質 (例として、免疫グロブリン Fc 領域) が互いに連結されたものであってもよい。

【0142】

また、GLP - 2 の持続型結合体に関する韓国公開特許第 10 - 2019 - 0037181 号は、参照として本願に含まれる。

【0143】

一つの実施形態において、本発明のインスリン分泌ペプチド又は GLP - 2 の持続型結合体は、下記化学式 (1) の構造を有してもよいが、これに制限されない。

【0144】

X - La - F ··· (1)

【0145】

ここで、

X は、インスリン分泌ペプチド又は GLP - 2 であり；

Lは、リンカー（例えば、エチレングリコール繰り返し単位を含有するリンカー）であり；

aは、0又は自然数であり、ただし、aが2以上である時、それぞれのLは互いに独立しており；

Fは、Xの生体内半減期を増加させる生体適合性物質（例えば、免疫グロブリンFc領域）であり；

前記「-」は、化学的結合（例えば、共有結合）である。

【0146】

より具体的には、XとL、及びLとFは、共有結合で互いに連結されてもよく、その時、前記結合体は、化学式(1)の手順で、X、L、及びFが共有結合を通じてそれぞれ連結された結合体であってもよい。

10

【0147】

また、前記FはXと直接的に連結されるか（即ち、前記化学式(1)においてaが0であるか）、又はリンカー(L)を通じて連結されたものであってもよい。

【0148】

本発明による結合体においてFはX、即ち、本発明によるインスリン分泌ペプチド又はGLP-2の半減期を増加させる物質であり、本発明の結合体を構成するモイエティの一構成に該当する。

【0149】

前記Fは、Xと共有化学結合又は非共有化学結合で互いに結合されてもよく、共有化学結合、非共有化学結合又はそれらの組み合わせによりLを通じてFとXが互いに結合されてもよい。

20

【0150】

前記Fは、Xの生体内半減期を増加させる物質は、生体適合性物質であり、例えば、高分子ポリマー、脂肪酸、コレステロール、アルブミン及びその断片、アルブミン結合物質、特定のアミノ酸配列の繰り返し単位のポリマー、抗体、抗体断片、FcRn結合物質、生体内結合組織、ヌクレオチド、フィブロネクチン、トランスフェリン(Transferrin)、サッカリド(saccharide)、ヘパリン、及びエラスチンからなる群から選択されるものであってもよいが、特にこれに制限されない。

【0151】

前記エラスチンの場合、水溶性前駆体であるヒトトロポエラスチン(tropoelastin)であってもよく、これらのうちの一部の配列若しくは一部の繰り返し単位のポリマーであってもよく、例えば、エラスチン様ポリペプチドである場合を全て含むが、特にこれに限定されるものではない。

30

【0152】

前記高分子ポリマーの例として、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール-プロピレングリコールコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、多糖類、ポリビニルエチルエーテル、生分解性高分子、脂質ポリマー、キチン、ヒアルロン酸、オリゴヌクレオチド及びそれらの組み合わせからなる群から選択される高分子ポリマーが挙げられ、前記多糖類としては、デキストランが含まれてもよいが、特にこれに制限されない。

40

【0153】

本明細書においてポリエチレングリコールは、エチレングリコールホモポリマー、PEGコポリマー、又はモノメチル置換PEGポリマー(mPEG)の形態を全部包括する用語であるが、特にこれに限定されるものではない。

【0154】

また、前記生体適合性物質は、ポリリシン、ポリアスパラギン酸及びポリグルタミン酸のようなポリアミノ酸を含むが、これに制限されるものではない。

【0155】

また、脂肪酸は、生体内アルブミンと結合力を有するものであってもよいが、特にこれ

50

に制限されない。

【0156】

前記Fの一例として、前記FはFcRn結合物質であってもよく、具体的には、前記FcRn結合物質は免疫グロブリンFc領域であってもよく、より具体的には、IgGFc領域、より具体的には、非グリコシル化されたIgG4Fc領域であってもよいが、特にこれに制限されない。

【0157】

本発明の具体的な一例として、前記F（例えば、免疫グロブリンFc領域）は、二つのポリペプチド鎖からなる二量体であり、Lの一方の末端が前記二つのポリペプチド鎖の一つのポリペプチド鎖のみに連結されている構造を有してもよいが、これに制限されない。

10

【0158】

一つの具体的な実施形態において、本発明の持続型結合体は、インスリン分泌ペプチド又はGLP-2と免疫グロブリンFc領域が連結されたものであってもよいが、これに制限されない。

【0159】

本発明において、「免疫グロブリンFc領域」とは、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖可変領域を除く、重鎖定常領域を意味する。具体的には、前記免疫グロブリンFc領域は、重鎖定常領域2(CH2)及び/又は重鎖定常領域3(CH3)部分を含むものであってもよく、より具体的には、ヒンジ領域（ヒンジ領域の全体又は一部を意味する。）をさらに含むものであってもよい。前記免疫グロブリンFc領域は、本発明の結合体のモイエティ

20

をなす一構成であってもよい。具体的には、前記化学式(1)においてFに該当する。

【0160】

本明細書においてFc領域と言え、免疫グロブリンのパパイン消化から得られる天然型配列だけでなく、その誘導体、置換体、例えば、天然配列中の一つ以上のアミノ酸残基が欠失、挿入、非保存的若しくは保存的置換、又はそれらの組み合わせにより変換されて天然のものとは異なる配列など改変体も含まれる。前記誘導体、置換体、改変体は、FcRnに結合する能力を保有することを前提とする。

【0161】

前記F（例えば、免疫グロブリンFc領域）は、二つのポリペプチド鎖がジスルフィド結合で連結されている構造であり、前記二鎖中の一鎖の窒素原子を介してのみ連結されている構造であってもよいが、これに制限されない。前記窒素原子を介する連結は、リシンのイプシロンアミノ原子やN-末端のアミノ基に還元的アミノ化により連結されるものであってもよい。

30

【0162】

還元的アミノ化反応とは、反応物のアミン基又はアミノ基が他の反応物のアルデヒド（即ち、還元的アミノ化が可能な官能基）と反応してアミンを生成し、次いで還元反応によりアミン結合を形成させる反応を意味し、当該技術分野で周知の有機合成反応である。

【0163】

一つの具体例として、前記免疫グロブリンFc領域がそのN-末端窒素原子を介して連結されたものであってもよい。

40

【0164】

このような免疫グロブリンFc領域は、重鎖定常領域にヒンジ(hinge)部分を含んでもよいが、これに制限されるものではない。

【0165】

本発明における免疫グロブリンFc領域は、N-末端に特定のヒンジ配列を含んでもよい。

【0166】

本発明の用語、「ヒンジ配列」とは、重鎖に位置してジスルフィド結合(interdisulfide bond)により免疫グロブリンFc領域の二量体を形成する部位を意味する。

50

【0167】

本発明における前記ヒンジ配列は、下記のアミノ酸配列を有するヒンジ配列中の一部が欠失して一つのシステイン残基のみを有するように変異したものであってもよいが、それに制限されるものではない：

【0168】

G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 1 1) 。

【0169】

前記ヒンジ配列は、配列番号 1 1 のヒンジ配列中の 8 番目又は 1 1 番目システイン残基が欠失して一つのシステイン残基のみを含むものであってもよい。本発明のヒンジ配列は、一つのシステイン残基のみを含む、3 ~ 1 2 個のアミノ酸からなるものであるが、これに制限されるものではない。より具体的には、本発明のヒンジ配列は、次のような配列を有することができる：G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 1 2)、G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s - P r o - S e r - P r o (配列番号 1 3)、G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s - P r o - S e r (配列番号 1 4)、G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s - P r o - P r o (配列番号 1 5)、L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s - P r o - S e r (配列番号 1 6)、G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s (配列番号 1 7)、G l u - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s (配列番号 1 8)、G l u - S e r - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 1 9)、G l u - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 2 0)、P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 2 1)、G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 2 2)、L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 2 3)、G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 2 4)、G l u - S e r - L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s (配列番号 2 5)、L y s - T y r - G l y - P r o - P r o - C y s - P r o (配列番号 2 6)、G l u - S e r - L y s - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 2 7)、G l u - S e r - P r o - S e r - C y s - P r o (配列番号 2 8)、G l u - P r o - S e r - C y s (配列番号 2 9)、S e r - C y s - P r o (配列番号 3 0) 。

【0170】

より具体的には、前記ヒンジ配列は、配列番号 2 1 (P r o - S e r - C y s - P r o) 又は配列番号 3 0 (S e r - C y s - P r o) のアミノ酸配列を含むものであってもよいが、これらに制限されるものではない。

【0171】

本発明の持続型結合体のより具体的な形態において、前記結合体内免疫グロブリン F c 領域の N - 末端はプロリンであり、その結合体は、前記プロリンの窒素原子を介して F c 領域がリンカーに連結されたものである。

【0172】

一つの具体的な実施形態において、免疫グロブリン F c 領域はヒンジ配列の存在により、免疫グロブリン F c 領域の鎖二つがホモ二量体 (h o m o d i m e r) 又はヘテロ二量体 (h e t e r o d i m e r) を形成した二量体形態であってもよい。本発明の化学式 (1) の結合体は、リンカーの一末端が二量体の免疫グロブリン F c 領域の 1 つの鎖に連結された形態であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0173】

本発明の用語、「N - 末端」とは、タンパク質又はポリペプチドのアミノ末端を意味し、アミノ末端の最末端、又は最末端から 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、又は 1 0 個以上のアミノ酸まで含むものであってもよい。本発明の免疫グロブリン F c 領域は、ヒンジ配列を N - 末端に含んでもよいが、これに限定されるものではない

10

20

30

40

50

い。

【0174】

また、本発明の免疫グロブリンFc領域は、天然のものと実質的に同等又は向上した効果を有するものであれば、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変領域を除き、一部又は全部の重鎖定常領域1(CH1)及び/又は軽鎖定常領域1(CL1)を含む拡張されたFc領域であってもよい。また、CH2及び/又はCH3に相当する非常に長い一部のアミノ酸配列が欠失した領域であってもよい。

【0175】

例えば、本発明の免疫グロブリンFc領域は、1)CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン及びCH4ドメイン、2)CH1ドメイン及びCH2ドメイン、3)CH1ドメイン及びCH3ドメイン、4)CH2ドメイン及びCH3ドメイン、5)CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン及びCH4ドメインの1個又は2個の以上のドメインと免疫グロブリンヒンジ領域(又はヒンジ領域の一部)との組み合わせ、又は6)重鎖定常領域の各ドメインと軽鎖定常領域の二量体であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0176】

また、本発明の持続型結合体の一つの実施形態として、前記免疫グロブリンFc領域は二量体形態(dimeric form)であってもよく、二量体形態の一つのFc領域にXの一分子が共有結合的に連結されてもよく、その時、前記免疫グロブリンFcとXは一つの同一のリンカーにより互いに連結されてもよい。一方、二量体形態の一つのFc領域にXの二分子が対称的に結合することも可能である。この時、前記免疫グロブリンFcとXは、リンカーにより互いに連結されてもよい。しかし、前述した例に制限されるものではない。

【0177】

また、本発明の免疫グロブリンFc領域は、天然型アミノ酸配列だけでなく、その配列誘導体を含む。アミノ酸配列誘導体とは、天然アミノ酸配列中の一つ以上のアミノ酸残基が欠失、挿入、非保存的若しくは保存的置換、又はそれらの組み合わせにより異なる配列を有するものを意味する。

【0178】

例えば、IgG Fcの場合、結合に重要であることが知られている214~238、297~299、318~322又は327~331番目のアミノ酸残基が修飾のために適当な部位として用いられてもよい。

【0179】

また、ジスルフィド結合を形成する部位が除去されるか、又は天然型FcからN-末端のいくつかのアミノ酸が除去されるか、又は天然型FcのN-末端にメチオニン残基が付加されることもできるなど、多様な種類の誘導体が可能である。また、エフェクター機能をなくすために、補体結合部位、例えば、C1q結合部位が除去されてもよく、ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity)部位が除去されてもよい。このような免疫グロブリンFc領域の配列誘導体を製造する技術は、国際特許公開第WO 97/34631号、国際特許公開第96/32478号などに開示されている。

【0180】

分子の活性を全体的に変更させないタンパク質及びペプチドにおけるアミノ酸交換は、当該分野に公知である(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最も一般的な交換は、アミノ酸残基Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly間の交換である。場合によっては、リン酸化(phosphorylation)、硫化(sulfation)、アクリル

化 (a c r y l a t i o n)、グリコシル化 (g l y c o s y l a t i o n)、メチル化 (m e t h y l a t i o n)、ファルネシル化 (f a r n e s y l a t i o n)、アセチル化 (a c e t y l a t i o n) 及びアミド化 (a m i d a t i o n) などにより修飾 (m o d i f i c a t i o n) されてもよい。

【 0 1 8 1 】

前述した F c 誘導体は、本発明の F c 領域と同等な生物学的活性を示し、F c 領域の熱、pH などに対する構造的安定性を増大させたものであってもよい。

【 0 1 8 2 】

また、このような F c 領域は、ヒト、ウシ、ヤギ、ブタ、マウス、ウサギ、ハムスター、ラット又はモルモットなどの動物の生体内から分離した天然のものから得られてもよく、形質転換された動物細胞もしくは微生物から得られた組換えたもの又はその誘導体であつてもよい。ここで、天然のものから得る方法は、全免疫グロブリンをヒト又は動物の生体から分離した後、タンパク質分解酵素を処理して得る方法であつてもよい。パパインを処理する場合には F a b 及び F c で切断され、ペプシンを処理する場合には p F ' c 及び F (a b)₂ に切断される。これをサイズ排除クロマトグラフィー (s i z e - e x c l u s i o n c h r o m a t o g r a p h y) などを用いて F c 又は p F ' c を分離することができる。より具体的な実施形態では、ヒト由来の F c 領域は微生物から得られた組換え型免疫グロブリン F c 領域である。

10

【 0 1 8 3 】

また、免疫グロブリン F c 領域は、天然糖鎖、天然のものに比べて増加した糖鎖、天然のものに比べて減少した糖鎖、又は糖鎖が除去された形態であつてもよい。このような免疫グロブリン F c 糖鎖の増減又は除去には、化学的方法、酵素学的方法及び微生物を用いた遺伝工学的な方法などの通常の方法が用いられてもよい。ここで、F c から糖鎖が除去された免疫グロブリン F c 領域は、補体 (c 1 q) との結合力が著しく低下し、抗体依存性細胞傷害又は補体依存性細胞傷害が減少又は除去されるので、生体内で不要な免疫反応を誘発しない。このようなことから、薬物のキャリアとしての本来の目的に、より符合する形態は、糖鎖が除去されるか、又は非グリコシル化された免疫グロブリン F c 領域であると言える。

20

【 0 1 8 4 】

本発明において「糖鎖の除去 (D e g l y c o s y l a t i o n) 」とは、酵素から糖を除去した F c 領域を意味し、非グリコシル化 (A g l y c o s y l a t i o n) とは、原核動物、より具体的な実施形態においては、大腸菌で生産してグリコシル化されていない F c 領域を意味する。

30

【 0 1 8 5 】

一方、免疫グロブリン F c 領域は、ヒト又はウシ、ヤギ、ブタ、マウス、ウサギ、ハムスター、ラット、モルモットなどの動物起源であつてもよく、より具体的な実施形態においてはヒト起源である。

【 0 1 8 6 】

また、免疫グロブリン F c 領域は、I g G、I g A、I g D、I g E、I g M 由来又はそれらの組み合わせ (c o m b i n a t i o n) 又はそれらのハイブリッド (h y b r i d) による F c 領域であつてもよい。より具体的な実施形態においては、ヒト血液に最も豊富な I g G 又は I g M 由来のものであり、さらに具体的な実施形態においては、リガンド結合タンパク質の半減期を延長させることが知られている I g G 由来のものである。一層具体的な実施形態において、前記免疫グロブリン F c 領域は I g G 4 F c 領域であり、最も具体的な実施形態において、前記免疫グロブリン F c 領域はヒト I g G 4 由来の非グリコシル化された F c 領域であるが、これらに制限されるものではない。

40

【 0 1 8 7 】

また、一つの具体例において、免疫グロブリン F c 領域はヒト I g G 4 F c のフラグメントとして、各モノマーの 3 番目のアミノ酸であるシステインの間のジスルフィド結合 (i n t e r - c h a i n 形態) により 2 個のモノマーが連結されたホモ二量体であつて

50

もよく、その時、ホモ二量体は、各モノマーにおいて35番の及び95番のシステインの間及び141番及び199番のシステインの間にジスルフィド結合、即ち、2個のジスルフィド結合 (i n t r a - c h a i n 形態) を有するものである / 有するものであってもよい。

【0188】

各モノマーのアミノ酸数は、221個のアミノ酸からなり、ホモ二量体を形成するアミノ酸は、全体で442個のアミノ酸からなるが、これらに制限されるものではない。具体的には、免疫グロブリンFc領域は、配列番号35のアミノ酸配列(442個のアミノ酸からなる)を含むホモ二量体(ここで、配列番号31のアミノ酸配列(221個のアミノ酸からなる)を有するモノマー2個が各モノマーの3番目のアミノ酸であるシステインの間にジスルフィド結合を通じてホモ二量体を形成し、前記ホモ二量体のモノマーは、それぞれ独立して35番目の及び95番目のシステイン間の内部のジスルフィド結合及び141番目及び199番目のシステイン間の内部のジスルフィド結合を形成する)であって

10

【0189】

一方、本発明において免疫グロブリンFc領域に関連した「組み合わせ (c o m b i n a t i o n) 」とは、二量体又は多量体を形成する時、同一起源の単鎖免疫グロブリンFc領域をコードするポリペプチドが相違する起源の単鎖ポリペプチドと結合を形成することを意味する。即ち、I g G F c、I g A F c、I g M F c、I g D F c 及び I g E の F c 領域からなるグループから選択された2個以上のFc領域から二量体又は多量体の製造が可能である。

20

【0190】

本発明において「ハイブリッド (h y b r i d) 」とは、単鎖の免疫グロブリン不変領域内に2個以上の相違した起源の免疫グロブリンFc領域に該当する配列が存在することを意味する用語である。本発明の場合、種々の形態のハイブリッドが可能である。即ち、I g G F c、I g M F c、I g A F c、I g E F c 及び I g D F c の C H 1、C H 2、C H 3 及び C H 4 からなるグループから1個~4個のドメインからなるドメインのハイブリッドが可能であり、ヒンジを含んでもよい。

【0191】

一方、I g G も I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4 のサブクラスに分けることができ、本発明ではそれらの組み合わせ又はこれらのハイブリダイゼーションも可能である。具体的には、I g G 2 及び I g G 4 サブクラスであり、最も具体的には、補体依存的傷害 (C D C , C o m p l e m e n t d e p e n d e n t c y t o t o x i c i t y) のようなエフェクター機能 (e f f e c t o r f u n c t i o n) がほとんどない I g G 4 の F c 領域である。

30

【0192】

また、上述した結合体は、効力の持続性が天然型インスリン分泌ペプチド又は天然型 G L P - 2 に比べて、又はFが修飾されていないXに比べて増加したものであってもよく、このような結合体は上述した形態だけでなく、生分解性ナノパーティクルに封入された形態などを全て含むが、これに制限されない。

40

【0193】

前記化学式(1)においてリンカーLは、ペプチド性リンカー又は非ペプチド性リンカー(例えば、エチレングリコール繰り返し単位を含有するリンカー)であって

【0194】

前記Lがペプチド性リンカーである時、1個以上のアミノ酸を含むことができ、例えば、1個から1000個のアミノ酸を含んでもよいが、特にこれに限定されるものではない。本発明においてFとXを連結するために、公知の多様なペプチドリンカーが本発明に用いられ、その例として、[GS]xリンカー、[GGGS]xリンカー及び[GGGGS]xリンカーなどを含み、ここで、xは、1以上の自然数であって

50

【0195】

本発明において「非ペプチド性リンカー」は、繰り返し単位が二つ以上結合された生体適合性ポリマーを含む。前記繰り返し単位は、ペプチド結合ではない任意の共有結合を通じて互いに連結される。前記非ペプチド性リンカーは、本発明の結合体のモイエティをなす一構成であってもよく、前記化学式(1)においてLに該当する。

【0196】

本発明で使用できる非ペプチド性リンカーは、生体内タンパク質分解酵素に抵抗性のあるポリマーであれば、制限なく使用できる。

【0197】

本発明において前記非ペプチド性リンカーは、非ペプチド性ポリマーと混用され得る。

10

【0198】

また、特にこれに制限されないが、前記非ペプチド性リンカーはポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、多糖類(例、デキストランなど)、ポリビニルエチルエーテル、PLA(poly lactic acid)及びPLGA(poly lactic-glycolic acid)のような生分解性高分子、脂質ポリマー、キチン、ヒアルロン酸、オリゴヌクレオチド及びそれらの組み合わせで構成された群から選択されるものであってもよい。

【0199】

また、本発明で使用できる非ペプチド性リンカーは、生体内タンパク質分解酵素に抵抗性のあるポリマーであれば、制限なく使用できるが、具体的には、非ペプチド性ポリマーの分子量は、0超過約100kDaの範囲、約1~約100kDaの範囲、具体的には、約1~50kDaの範囲、約1~約20kDaの範囲、約1~約10kDaの範囲、又は約3.4kDa~10kDaであるが、これに制限されない。

20

【0200】

特にこれに制限されないが、前記非ペプチド性リンカーは、エチレングリコール繰り返し単位を含有するリンカー、例えば、ポリエチレングリコールであってもよく、また、当該分野に既に知られているこれらの誘導体及び当該分野の技術水準で容易に製造できる誘導体も本発明の範囲に含まれる。

【0201】

前記非ペプチド性リンカーの繰り返し単位はエチレングリコール繰り返し単位であってもよく、具体的には、前記非ペプチド性リンカーはエチレングリコール繰り返し単位を含みながら、結合体の製造に用いられる官能基を末端に含むものであってもよい。本発明による持続型結合体は、前記官能基を通じてXとFが連結された形態であってもよいが、これに制限されない。本発明において、前記非ペプチド性リンカーは2個、又は3個以上の官能基を含むことができ、各官能基は同一又は相異してもよいが、これに制限されない。

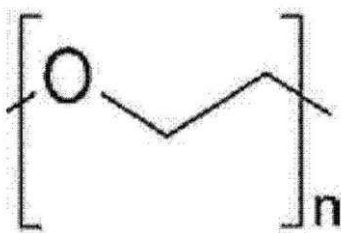
30

【0202】

具体的には、前記リンカーは下記化学式(4)で表される繰り返し単位を含むものであってもよい。その例として、ポリエチレングリコール(PEG)であってもよいが、これに制限されるものではない：

40

【0203】



50

・・・(4)

【0204】

ここで、 $n = 10 \sim 2400$ 、 $n = 10 \sim 480$ 、又は $n = 50 \sim 250$ であるが、これに制限されない。

【0205】

前記持続型結合体においてPEGモイエティは、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 構造だけでなく、連結要素とその $-(CH_2CH_2O)_n-$ との間に介在する酸素原子も含んでもよいが、これに制限されるものではない。

【0206】

また、一つの具体的な実施形態において、前記結合体はインスリン分泌ペプチド又はGLP-2と免疫グロブリンFc領域(F)がエチレングリコール繰り返し単位を含有するリンカーを通じて共有結合で連結された構造であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0207】

前記ポリエチレングリコールは、エチレングリコールホモポリマー、PEGコポリマー、又はモノメチル置換PEGポリマー(mPEG)の形態をいずれの包括する用語であるが、特にこれに限定されるものではない。

【0208】

一つの具体例において前記エチレングリコール繰り返し単位は、その例として、 $[OCH_2CH_2]_n$ で表されることができ、 n 値は自然数で前記ペプチド結合体内の $[OCH_2CH_2]_n$ 部位の平均分子量、例えば、数平均分子量が0超～約100kDaになるように定められることができるが、これに制限されない。もう一つの例として、前記 n 値は自然数で前記ペプチド結合体内の $[OCH_2CH_2]_n$ 部位の平均分子量、例えば、数平均分子量が約1～約100kDa、約1～約80kDa、約1～約50kDa、約1～約30kDa、約1～約25kDa、約1～約20kDa、約1～約15kDa、約1～約13kDa、約1～約11kDa、約1～約10kDa、約1～約8kDa、約1～約5kDa、約1～約3.4kDa、約3～約30kDa、約3～約27kDa、約3～約25kDa、約3～約22kDa、約3～約20kDa、約3～約18kDa、約3～約16kDa、約3～約15kDa、約3～約13kDa、約3～約11kDa、約3～約10kDa、約3～約8kDa、約3～約5kDa、約3～約3.4kDa、約8～約30kDa、約8～約27kDa、約8～約25kDa、約8～約22kDa、約8～約20kDa、約8～約18kDa、約8～約16kDa、約8～約15kDa、約8～約13kDa、約8～約11kDa、約8～約10kDa、約9～約15kDa、約9～約14kDa、約9～約13kDa、約9～約12kDa、約9～約11kDa、約9.5～約10.5kDa、約3.4kDa又は約10kDaであってもよいが、これに制限されない。

【0209】

本出願において用語「約」は、 ± 0.5 、 ± 0.4 、 ± 0.3 、 ± 0.2 、 ± 0.1 などを全て含む範囲であり、約という用語に続く数値と同等又は類似の範囲の数値を全て含むが、これに制限されない。

【0210】

また、免疫グロブリンFc領域と結合される本発明の非ペプチド性リンカーは、一種類のポリマーだけでなく、異なる種類のポリマーの組み合わせを使用することもできる。

【0211】

一つの具体的な実施形態において、前記非ペプチド性リンカーの両末端は、免疫グロブリンFc領域のチオール基、アミノ基、ヒドロキシル基及びGLP-2のチオール基、アミノ基、アジド基、ヒドロキシル基に結合できるが、これに制限されない。

【0212】

具体的には、前記非ペプチド性リンカーは、両末端にそれぞれ免疫グロブリンFcとインスリン分泌ペプチド又はGLP-2と結合できる反応基、具体的には、免疫グロブリンFc領域のシステインのチオール基；N-末端、リシン、アルギニン、グルタミン及びノ

又はヒスチジンに位置するアミノ基；及び／又はC - 末端に位置するヒドロキシル基と結合され、GLP - 2のシステインのチオール基；リシン、アルギニン、グルタミン及び／又はヒスチジンのアミノ基；アジドリシンのアジド基；及び／又はヒドロキシル基と結合できる反応基を含んでもよいが、これに制限されない。

【0213】

より具体的には、前記非ペプチド性ポリマーの反応基は、アルデヒド基、マレイミド基及びスクシンイミド誘導体からなる群から選択される一つ以上であってもよいが、これに制限されない。

【0214】

前記において、アルデヒド基としてプロピオンアルデヒド基又はブチルアルデヒド基を例として挙げられるが、これに制限されない。

【0215】

前記において、スクシンイミド誘導体としては、スクシンイミジルカルボキシメチル、スクシンイミジル吉草酸、スクシンイミジルメチルブタン酸、スクシンイミジルメチルプロピオネート、スクシンイミジルブタン酸、スクシンイミジルプロピオネート、N - ヒドロキシスクシンイミド、ヒドロキシスクシンイミジル又はスクシンイミジルカーボネートが使用できるが、これに制限されない。

【0216】

前記非ペプチド性リンカーは、前記のような反応基を通じて生体適合性物質（例えば、免疫グロブリンFc）とインスリン分泌ペプチド又はGLP - 2に連結され、非ペプチド性ポリマー連結部に転換できる。

【0217】

また、アルデヒド結合による還元性アルキル化で生成された最終産物は、アミド結合で連結されたものより遥かに安定している。アルデヒド反応基は、低いpHでN - 末端に選択的に反応し、高いpH、例えば、pH 9.0の条件ではリシン残基と共有結合を形成できる。

【0218】

本発明の非ペプチド性リンカーの末端反応基は互いに同一又は互いに異なってもよい。前記非ペプチド性リンカーは、末端にアルデヒド基の反応基を有するものであってもよく、また、前記非ペプチド性リンカーは、末端にそれぞれアルデヒド基及びマレイミド反応基を有するか、又は末端にそれぞれアルデヒド基及びスクシンイミド反応基を有してもよいが、これに制限されない。

【0219】

例えば、一方の末端にはマレイミド基を、他方の末端にはアルデヒド基、プロピオンアルデヒド基又はブチルアルデヒド基を有することができる。また、一例として、一方の末端にはスクシンイミジル基を、他方の末端にはプロピオンアルデヒド基又はブチルアルデヒド基を有することができる。

【0220】

プロピオン側の末端にヒドロキシ反応基を有するポリエチレングリコールを非ペプチド性リンカーとして用いる場合には、公知の化学反応により前記ヒドロキシ基を前記多様な反応基で活性化するか、又は商業的に入手可能な修飾された反応基を有するポリエチレングリコールを用いて本発明の結合体を製造することができる。

【0221】

一つの具体的な実施形態において前記非ペプチド性リンカーの反応基がインスリン分泌ペプチド又はGLP - 2のシステイン残基、より具体的には、システインの-SH基に連結されるものであってもよいが、これに制限されない。

【0222】

もし、マレイミド-PEG-アルデヒドを用いる場合、マレイミド基はインスリン分泌ペプチド又はGLP - 2の-SH基とチオエーテル(thioether)結合で連結し、アルデヒド基は免疫グロブリンFcの-NH₂基と還元的アルキル化反応を通じて連結

10

20

30

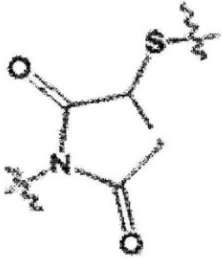
40

50

できるが、これに限定されず、これは一例に該当する。

【 0 2 2 3 】

このような還元的アルキル化を通じて P E G の一方の末端に位置する酸素原子に免疫グロブリン F c 領域の N - 末端アミノ基が - C H ₂ C H ₂ C H ₂ - の構造を有するリンカー官能基を通じて互いに連結され、 - P E G - O - C H ₂ C H ₂ C H ₂ N H - 免疫グロブリン F c と同様な構造を形成することができ、チオエーテル結合を通じて P E G の一方の末端が G L P - 2 又は G L P - 2 のシステインに位置する硫黄原子に連結された構造を形成することができる。上述のチオエーテル結合は、



10

の構造を含むことができる。

【 0 2 2 4 】

しかし、上述の例に特に制限されるものではなく、これは一例に該当する。

20

【 0 2 2 5 】

また、前記結合体において、非ペプチド性リンカーの反応基が免疫グロブリン F c 領域の N - 末端に位置する - N H ₂ と連結されたものであってもよいが、これは一例に該当する。

【 0 2 2 6 】

また、前記結合体において、インスリン分泌ペプチド又は G L P - 2 は反応基を有する非ペプチド性リンカーと C - 末端を通じて連結されてもよいが、これは一例に該当する。

【 0 2 2 7 】

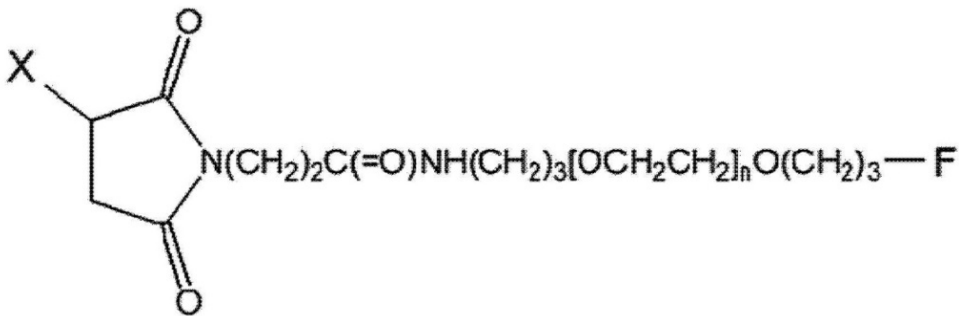
本発明において「 C - 末端」とは、ペプチドのカルボキシ末端を意味し、本発明の目的上、非ペプチド性ポリマーと結合できる位置をいう。その例として、これに制限されるものではないが、 C - 末端の最末端のアミノ酸残基だけでなく、 C - 末端周囲のアミノ酸残基をいずれも含んでもよく、具体的には、最末端から最初の ~ 2 0 番目のアミノ酸残基を含んでもよい。

30

【 0 2 2 8 】

一つの実例として、前記化学式 (1) の結合体は、下記化学式 (2) 又は (3) の構造を有することができる。

【 0 2 2 9 】

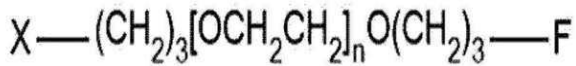


40

・ ・ ・ (2)

【 0 2 3 0 】

50



・・・(3)

【0231】

前記化学式(2)又は(3)において、Xは前記で説明した化学式(1)のペプチドであり；

Fは免疫グロブリンFc切片であり；

nは自然数であってもよい。この時、nに関する説明は、前記で説明した通りである。

【0232】

一つの具体例として、前記化学式(2)の持続型結合体は、インスリン分泌ペプチド又はGLP-2のXと免疫グロブリンFc領域のFがエチレングリコール繰り返し部を介在し、共有結合で連結された構造であり、それぞれXは化学式(2)のスクシンイミド環に、Fは化学式(2)のオキシプロピレン基に連結された形態であってもよい。また、前記化学式(3)の持続型結合体は、インスリン分泌ペプチド又はGLP-2のXと免疫グロブリンFc領域のFがエチレングリコール繰り返し部を介在して共有結合で連結された構造であり、それぞれXは化学式(3)のオキシプロピレン基に、Fは化学式(3)の他のオキシプロピレン基に連結された形態であってもよい。

10

【0233】

前記化学式(2)又は(3)において、前記nの値は、前記ペプチド結合体内[OCH₂CH₂]_n部位の平均分子量、例えば、数平均分子量が1~100kDa、又は1~20kDa又は10kDaになるように定められるものであってもよいが、これに制限されない。

20

【0234】

一実施形態において、化学式(2)のスクシンイミド環又は化学式(2)のスクシンイミド環にXが連結される部位は、XのC-末端システインの硫黄原子であってもよい。また、化学式(3)のオキシプロピレン基又は化学式(3)のオキシプロピレン基にXが連結される部位は、XのC-末端システインの硫黄原子であってもよい。

【0235】

F内において化学式(2)又は化学式(3)のオキシプロピレン基に連結される部位は、特に限定されない。本発明の一実施形態において、前記オキシプロピレン基に連結されるFの部位は、N-末端の窒素又はF内部残基の窒素原子(例えば、リシンのイプシロン窒素)であってもよい。本発明の一つの具体的な実施形態において、Fが化学式(2)又は化学式(3)のオキシプロピレン基に連結される部位は、FのN-末端プロリンであってもよいが、これに制限されない。

30

【0236】

一方、本発明によるインスリン分泌ペプチド、GLP-2、これらの持続型結合体、又はTNF抑制剤は、それ自体、これらの塩(例えば、薬学的に許容可能な塩)、又はこれらの溶媒和物の形態を全て含む。

【0237】

また、インスリン分泌ペプチド、GLP-2、これらの持続型結合体、又はTNF抑制剤は、薬学的に許容される任意の形態であってもよい。

40

【0238】

前記塩の種類は、特に制限されない。ただし、個体、例えば、哺乳類に安全で効果的な形態であることが好ましいが、特にこれに限定されるものではない。

【0239】

本出願において用語「薬学的に許容可能な塩」とは、薬学的に許容される無機酸、有機酸、又は塩基から誘導された塩を含む。適した酸の例としては、塩酸、臭素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、

50

安息香酸、マロン酸、ナフタレン - 2 - スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などを挙げることができる。適した塩基から誘導された塩は、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、マグネシウムなどのアルカリ土類金属、及びアンモニウムなどを含み得る。

【0240】

また、本発明で使用される用語「溶媒和物」は、本発明によるペプチド、化合物又はその塩が溶媒分子と複合体を形成したことをいう。

【0241】

本発明の天然型インスリン分泌ペプチドと改変されたインスリン分泌ペプチド、GLP - 2 と GLP - 2 誘導體、TNF 抑制剤は、Solid phase 合成法を通じて合成されてもよく、組換え方法でも生産可能であり、商業的に依頼して製造してもよく、商業的に販売されるものを利用してよい。

10

【0242】

もう一つの具体例として、本発明の組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットは、

(i) GLP - 2 及びインスリン分泌ペプチドを含むか、

GLP - 2 及び TNF 抑制剤を含むか、

GLP - 2、インスリン分泌ペプチド、及び TNF 抑制剤を含むか、

(ii) GLP - 2 ; 及び生体内半減期を増加させる生体的物質が結合された、インスリン分泌ペプチド持続型結合体を含むか、

GLP - 2、前記インスリン分泌ペプチド持続型結合体、及び TNF 抑制剤を含むか

20

(iii) 生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、GLP - 2 持続型結合体 ; 及びインスリン分泌ペプチドを含むか、

前記 GLP - 2 持続型結合体及び TNF 抑制剤を含むか、

前記 GLP - 2 持続型結合体、インスリン分泌ペプチド、及び TNF 抑制剤を含むか

(iv) 生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、GLP - 2 持続型結合体 ; 及び生体内半減期を増加させる生体適合性物質が結合された、インスリン分泌ペプチド持続型結合体を含むか、

前記 GLP - 2 持続型結合体、前記インスリン分泌ペプチド持続型結合体、及び TNF 抑制剤を含むことができる。

30

【0243】

本発明の組み合わせ物、薬学的組成物又は薬学的キットは、腸疾患の予防、改善又は治療に使用できる。

【0244】

本発明において用語「予防」とは、GLP - 2 とインスリン分泌ペプチド、TNF 抑制剤、又はその両方を含む組み合わせ物 ; 又は GLP - 2 とインスリン分泌ペプチド、TNF 抑制剤、又はその両方を併用する組成物の投与により目的とする疾患、例えば、腸疾患の発症を抑制又は遅延させるあらゆる行為を意味し、「治療」とは、前記組み合わせ物又は組成物の投与により目的とする疾患、例えば、腸疾患の症状が好転又は有益になるあらゆる行為を意味する。また、「改善」とは、本発明の組み合わせ物又は組成物の投与により治療される状態と関連したパラメーター、例えば、症状の程度を少なくとも減少させるあらゆる行為を意味する。

40

【0245】

本発明において用語「投与」とは、任意の適切な方法で患者に所定の物質を導入することを意味し、前記組成物の投与経路は特にこれに制限されないが、前記 GLP - 2、インスリン分泌ペプチド、及び TNF 抑制剤が生体内標的に到達できる任意の一般的な経路を通じて投与され、例えば、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、経口投与、局所投与、鼻腔内投与、肺内投与、直腸内投与などが挙げられる。

【0246】

50

本発明の方法において、前記GLP-2、インスリン分泌ペプチド、及びTNF抑制剤は同一の投与経路で投与されるか、又は互いに異なる投与経路で投与されてもよく、併用投与される薬物の投与経路は、互いに独立していてもよい。

【0247】

前記GLP-2とインスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方は、併用で利用されて腸疾患の予防又は治療に使用できる。

【0248】

前記腸疾患は、過敏性腸疾患、腸炎、炎症性腸疾患、結腸炎、大腸炎、すい臓炎、回腸炎、腸萎縮、及び腸損傷からなる群から選択される少なくとも一つであってもよいが、本発明の組成物で予防、改善又は治療される腸疾患は、制限なく含まれる。

10

【0249】

具体的な例として、腸疾患は、炎症性腸疾患であってもよい。前記炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease, IBD)は、胃腸管内に炎症や潰瘍が生じる炎症性疾患であり、炎症性サイトカインの発現増加、体重減少、結腸の長さ減少、腹痛、発熱、下痢、及び/又は下血などの症状を伴うことがあり、症状の悪化と好転を繰り返すことがあるが、これに制限されない。具体的には、前記炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis)、クローン病(Crohn's disease)、及びベーチェット病(Bechet's disease)からなる群から選択される少なくとも一つであってもよいが、これに制限されない。

【0250】

本発明による組み合わせ物又は組成物は、個体に投与時に単球(monocyte)でM1分極化(polarization)抑制、マクロファージ分化抑制、及び単球移動(migration)抑制の一つ以上を示し、腸疾患を予防、改善又は治療することができるが、これに制限されるものではない。

20

【0251】

本発明による組み合わせ物又は組成物は、個体に投与時に小腸の長さ増加、小腸の炎症減少、大腸の長さ増加、及び大腸の炎症減少の少なくとも一つを引き起こして腸疾患を予防、改善又は治療することができる。しかし、これに制限されるものではない。

【0252】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は希釈剤をさらに含む得る。このような薬学的に許容可能な担体、賦形剤、又は希釈剤は非自然なものであってもよい。

30

【0253】

本発明において用語「薬学的に許容可能な」とは、治療効果を示すことができる程度の十分な量と副作用を起こさないことを意味し、疾患の種類、患者の年齢、体重、健康、性別、患者の薬物に対する敏感度、投与経路、投与方法、投与回数、治療期間、配合又は同時用いられる薬物などの医学分野における公知の要素により当業者が容易に決定することができる。本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含んでもよい。前記賦形剤は特にこれに制限されるものではないが、経口投与時には、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、可溶化剤、分散剤、安定化剤、懸濁化剤、色素、香料などを用いることができ、注射剤の場合は、緩衝剤、保存剤、無痛化剤、可溶化剤、等張化剤、安定化剤などを混合して用いることができ、局所投与用の場合は、基剤、賦形剤、潤滑剤、保存剤などを用いることができる。

40

【0254】

本発明の組成物の剤形は、前述したような薬学的に許容可能な賦形剤と混合して多様に製造することができる。例えば、経口投与時には、錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、サスペンション、シロップ、ウエハーなどの形態に製造することができ、注射剤の場合は、単位投薬アンプル又は複数回投薬形態に製造することができる。その他、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、徐放性製剤などに剤形化することができる。

【0255】

50

なお、製剤化に適した担体、賦形剤及び希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、デンプン、アカシア、アルギネート、ゼラチン、カルシウムホスフェート、カルシウムシリケート、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、マグネシウムステアレート又は鉱油などが挙げられる。また、充填剤、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料、防腐剤などをさらに含んでもよい。

【0256】

さらに、本発明の薬学的組成物は、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤、滅菌水溶液、非水性溶剤、凍結乾燥製剤及び坐剤からなる群から選択されるいずれか一つの剤形を有してもよい。 10

【0257】

さらに、前記組成物は、薬学的分野における通常の方法により患者の身体内投与に適した単回投与型の製剤、具体的には、タンパク質医薬品の投与に有用な製剤形態に剤形化し、当業界で通常用いる投与方法を用いて経口、又は皮膚、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、髄膜腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、消化管内、局所、舌下、膈内もしくは直腸経路が含まれる非経口投与経路で投与することができるが、これらに限定されるものではない。

【0258】

さらに、前記結合体は、生理食塩水又は有機溶媒のように薬剤に許容される種々の伝達体 (carrier) と混合して用いることができ、安定性や吸水性を向上させるために、グルコース、スクロース又はデキストランのような炭水化物、アスコルビン酸 (ascorbic acid) 又はグルタチオンのような抗酸化剤 (antioxidants)、キレート剤、低分子タンパク質又は他の安定化剤 (stabilizers) などを薬剤として用いることができる。 20

【0259】

本発明の薬学的組成物の投与量と回数は、治療する疾患、投与経路、患者の年齢、性別及び体重及び疾患の重症度などの様々な関連因子と共に、活性成分である薬物の種類により決定される。具体的には、本発明の組成物は、前記インスリン分泌ペプチド、GLP-2、及び/又はTNF抑制剤を薬学的有効量で含むものであってもよいが、これに制限されない。 30

【0260】

前記インスリン分泌ペプチド、GLP-2、及び/又はTNF抑制剤を薬学的有効量として含むことは、インスリン分泌ペプチド、GLP-2、及び/又はTNF抑制剤による目的とする薬理活性を得る程度を意味し、また、投与される個体において毒性又は副作用が起きなかったり、微々たる水準で薬学的に許容される水準を意味するが、これに制限されない。このような薬学的有効量は、投与回数、患者、剤形などを総合的に考慮して決定することができる。

【0261】

特にこれに制限されないが、本発明の前記薬学的組成物は、前記成分 (有効成分) を 0.01 ~ 99% 重量対体積で含有することができる。 40

【0262】

本発明の組成物の総有効量は、単一投与量 (single dose) で患者に投与され得、多重投与量 (multiple dose) で長期間投与される分割治療方法 (fractionated treatment protocol) により投与され得る。本発明の薬学的組成物は、疾患の程度に応じて有効成分の含量を異にすることができる。具体的には、本発明のペプチド又は結合体の好ましい全体用量は、一日に患者体重 1 kg 当り約 0.0001 mg ~ 500 mg であってもよいが、これに制限されない。しかし、前記結合体の用量は、薬学的組成物の投与経路及び治療回数だけでなく、患者の年齢、体重、健康状態、性別、疾患の重症度、食物及び排泄率など、多様な要因を考慮して患者 50

に対する有効投与量が決定されるため、このような点を考慮すると、当分野の通常の知識を有する者であれば、前記本発明の組成物の特定の用途に応じた適切な有効投与量を決定し得るものである。本発明による薬学的組成物は、本発明の効果を奏する限り、その剤形、投与経路及び投与方法に特に制限されない。

【0263】

本発明の薬学的組成物は、生体内持続性及び力価に優れ、本発明の薬学的製剤の投与回数及び頻度を顕著に減少させることができるが、これに制限されない。

【0264】

本発明を具現する一態様は、GLP-2を含有する腸疾患の予防又は改善のための食品組成物であり、前記食品組成物は、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方と併用投与されることを特徴とする食品組成物を提供する。

10

【0265】

前記インスリン分泌ペプチド、GLP-2、TNF抑制剤、予防、改善、及び腸疾患については、前述の通りである。

【0266】

前記食品組成物は、健康機能食品として用いられる。本発明の組成物を食品補助添加剤として用いる場合、インスリン分泌ペプチド、GLP-2、その持続型結合体、TNF抑制剤、又はそれらの組み合わせをそのまま添加したり、他の食品又は食品成分と共に用いることができ、常法により好適に用いることができる。有効成分の混合量は、使用目的（予防、健康又は治療的処置）により適切に決定され得る。

20

【0267】

本発明における用語「健康機能食品」とは、健康補助の目的で特定成分を原料としたり食品原料に入っている特定成分を抽出、濃縮、精製、混合などの方法で製造、加工した食品をいい、前記成分により生体防御、生体リズムの調節、疾病の防止と回復など、生体調節機能を生体に対して十分に発揮できるように設計され、加工された食品のことをいい、前記健康食品用組成物は、疾病の予防及び疾病の回復などに関連した機能を行うことができる。

【0268】

本発明を具現する他の一態様は、GLP-2とインスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方をそれを必要とする個体に投与する段階を含む、腸疾患の予防、改善又は治療方法を提供する。

30

【0269】

また、一つの具体例として、本発明の組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットをそれを必要とする個体に投与及び/又は使用する段階を含む腸疾患の予防、改善又は治療方法であってもよい。

【0270】

また、一つの具体例として、薬学的有効量のGLP-2を含有する組成物と、薬学的有効量のインスリン分泌ペプチドを含有する組成物、薬学的有効量のTNF抑制剤を含有する組成物、又はその両方をそれを必要とする個体に併用投与及び/又は併用使用する段階を含む腸疾患の予防、改善又は治療方法である。

40

【0271】

前記インスリン分泌ペプチド、GLP-2、TNF抑制剤、併用、予防、治療、改善、腸疾患、組み合わせ物、薬学的組成物及び薬学的キットについては、前述の通りである。

【0272】

本発明における前記個体とは、腸疾患の疑いのある個体であり、前記腸疾患の疑いのある個体とは、該当する疾患が発症しているか、発症するリスクのある、ヒトを含むラット、家畜などが含まれる哺乳動物を意味するが、本発明のGLP-2とインスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方の併用で治療可能な個体は、制限なく含まれる。また、本発明のGLP-2とインスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を腸

50

疾患の疑いのある個体に投与することにより、個体を効率的に治療することができる。腸疾患については、前記で説明した通りである。

【0273】

本発明の方法は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を含む組み合わせ物又は薬学的組成物を薬学的有効量で投与することを含むことができる。本発明による方法は、GLP-2と、インスリン分泌ペプチド、TNF抑制剤、又はその両方を一つの製剤として投与するか、又は個別製剤を同時、個別、順次又は逆順で投与することであってもよいが、これに制限されない。

【0274】

適した総1日使用量は、正しい医学的判断の範囲内で処置医により決定され、1回又は数回に分けて投与できる。しかし、本発明の目的上、特定患者に対する具体的な治療の有効量は、達成しようとする反応の種類と程度、場合によっては他の製剤が用いられるかどうかをはじめとする具体的な組成物、患者の年齢、体重、一般健康状態、性別及び食事、投与時間、投与経路及び組成物の分泌率、治療期間、具体的な組成物と共に用いられり同時に用いられる薬物をはじめとする多様な因子と医薬分野によく知られている類似因子により異なって適用することが好ましい。

【0275】

本発明を具現するもう一つの様態は、前記組み合わせ物、薬学的組成物、又は薬学的キットの腸疾患の予防、改善又は治療用途、及び/又は腸疾患の予防、改善又は治療のための薬剤の製造のための用途である。前記予防、改善、治療、腸疾患、組み合わせ、薬学的組成物及び薬学的キットについては、前述の通りである。

【0276】

以下、下記実施例により本発明をより詳細に説明する。ただし、下記実施例は本発明を例示するものに過ぎず、本発明の範囲がこれらに限定されるものではない。

【0277】

実施例1：GLP-1誘導体持続型結合体の製造

1-1. CA-Exendin-4-PEG結合体の製造

CA-Exendin4(N-[2-(1H-Imidazol-5-yl)acetyl]-Exendin4、ハンミ精密化学、韓国)ペプチド内の27番目のリシン残基のアミン基と、両末端にアルデヒド(Aldehyde, ALD)基を有するポリエチレングリコール(3.4kDa, ALD(2) PEG、ハンミ精密化学、韓国)間の共有結合を通じて、ペグ化(PEGylation)されたペプチド結合体(モノペグ化された(mono-PEGylated) CA-Exendin-4)を製造した。具体的には、CA-Exendin-4:ALD(2) PEGのモル比を1:5~1:15で、CA-Exendin-4の濃度を6~12mg/mlで、4~10乃至常温で、約4~12時間反応させた。この時、反応は、0.1M HEPES pH 7.0~8.5、約45%のイソプロパノールで行われ、2~5mM濃度のシアノ水素化ホウ素ナトリウム[sodium cyanoborohydride (NaCNBH₃)]を添加して反応させた。反応液をクエン酸ナトリウム(pH 2.0~3.5)、約45%のエタノールが含まれたバッファと塩化カリウムの濃度勾配を利用したSource 15S (Cytiva、米国)カラムを用いて精製した。

【0278】

1-2. CA-Exendin-4-PEG-Fc結合体の製造

CA-Exendin-4-PEG-Fc結合体を製造するために、前記実施例1-1を通じて得られたモノペグ化されたCA-Exendin-4に免疫グロブリンFc断片を添加して全体タンパク質濃度を10~50mg/mlにした後、4~10乃至常温で約12~17時間反応させた。この時、反応液は、0.1Mリン酸カリウムpH 5.5~8.5であり、還元剤である2~50mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加した。反応が終了した後、反応液内のCA-Exendin-4-PEG-Fc結合体を疎水性結合及び陰イオン交換カラムの2種類を用いて精製した。疎水性結合カラムであるSou

10

20

30

40

50

rice 15 Phenyl (Cytiva、米国)の場合、Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液及びNaCl濃度勾配を用いて反応していない免疫グロブリンFc断片を分離及び精製し、陰イオン交換カラムであるSource 15 Q (Cytiva、米国)の場合、Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液及びNaCl濃度勾配を用いて過反応した不純物を除去し、CA-Exendin-4-PEG-Fc結合体を分離及び精製した。

【0279】

実施例2：GLP-2誘導体持続型結合体の製造

2-1. CA GLP-2 RK-PEG結合体の製造

表1の配列番号4のGLP-2誘導体CA GLP-2 RKを改質ポリエチレングリコールであるALD(2) PEG(両末端の水素がそれぞれプロピオンアルデヒド基(3-オキソプロピル基)で置換され、エチレングリコール繰り返し単位部位(moiety)の化学式量が3.4kDaである改質ポリエチレングリコール、日本NOF社)でペグ化させるために、GLP-2誘導体とALD(2) PEGのモル比を1:5~1:20、GLP-2誘導体の濃度を5~10mg/mlにして2~8で4~16時間反応させた。この時、反応は20mMヘプス(HEPES) pH 7.5とエタノールで行われ、還元剤である20mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加して反応させた。反応液は、クエン酸ナトリウムpH 2.0、エタノールが含まれた緩衝溶液と塩化カリウム濃度勾配を利用したSource 15 S (GE、米国)カラムを用いてモノペグ化されたGLP-2誘導体を精製した。

10

20

【0280】

2-2. CA GLP-2 RK-PEG-Fc結合体の製造

次に、前記精製されたモノペグ化されたGLP-2誘導体と免疫グロブリンFc断片のモル比が1:2~1:6になるようにし、全体タンパク質濃度を30~35mg/mLにして2~8で12~20時間反応させた。この時、反応液は、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)とイソプロパノールに還元剤として20mMシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加した。

【0281】

反応が終了した後、反応液は、ビストリス(bis-Tris) pH 6.5バッファと塩化ナトリウム濃度勾配を用いてSource 15 Q (GE、米国)カラムに適用し、硫酸アンモニウムとクエン酸ナトリウムpH 5.0~5.2の濃度勾配を用いてSource 15 ISO (GE、米国)に適用し、免疫グロブリンFc断片にGLP-2誘導体がポリエチレングリコールリンカーにより共有結合で連結された結合体であるGLP-2誘導体の持続型結合体を精製した。

30

【0282】

実施例3：GLP-1誘導体持続型結合体とGLP-2誘導体持続型結合体の併用処理を通じたTHP-1 cell (Monocyte)でM1分極化抑制、マクロファージ分化抑制、単球移動抑制効果の確認

GLP-1誘導体持続型結合体とGLP-2誘導体持続型結合体のそれぞれ、そして併用処理によるTHP-1 cell (Monocyte)でM1分極化(M1 polarization)抑制、マクロファージ分化(Macrophage differentiation)抑制、単球移動(monocyte migration)抑制効果を確認するために、次のように試験管内(in vitro)実験を行った。

40

【0283】

[M1分極化抑制確認実験]

THP-1 cellにGLP-1誘導体持続型結合体(0.5若しくは1µM)、GLP-2誘導体持続型結合体(10µM)、そしてGLP-1誘導体持続型結合体(0.5µM)+GLP-2誘導体持続型結合体(10µM)を4時間処理した。そして、炎症(inflammation)を誘導するために、リポポリサッカリド(Lipopolysaccharides, LPS) 1µg/mLを2時間処理した後、RNAを抽出

50

して前炎症性サイトカイン (*pro-inflammatory cytokine* , M1分極化) の TNF - 、 IL - 1 、そして IL - 6 の mRNA 発現量を qPCR を通じて測定した。

【 0 2 8 4 】

[マクロファージ分化抑制確認実験]

THP - 1 cell に GLP - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 1 若しくは 1 μ M) 、 GLP - 2 誘導体持続型結合体 (10 μ M) 、そして GLP - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 1 μ M) + GLP - 2 誘導体持続型結合体 (10 μ M) を THP - 1 分化を誘導するために、ホルボール 12 - ミリステート 13 - 酢酸 (*phorbol 12-myristate 13-acetate* , PMA) を 48 時間処理した。そして分化した細胞である 10
 附着細胞 (*adherent cell*) を計数した。

【 0 2 8 5 】

[単球移動抑制実験]

THP - 1 cell に GLP - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 1 若しくは 1 μ M) 、 GLP - 2 誘導体持続型結合体 (10 μ M) 、そして GLP - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 1 μ M) + GLP - 2 誘導体持続型結合体 (10 μ M) を 48 時間処理した。そして薬物が処理された THP - 1 cell をボイデンチャンバー (*Boyden chamber*) の上方チャンバー (*upper chamber*) に移した後、下方チャンバー (*bottom chamber*) への移動を誘導できる CCL - 2 50 ng / mL を入れて 4 時間培養した。そして *migration assay kit* (*Abcam*) を用 20
 いて移動の程度を測定した。

【 0 2 8 6 】

前記実験を通じて GLP - 1 誘導体持続型結合体と GLP - 2 誘導体持続型結合体のそれぞれの M1 分極化 (図 1、A) 、マクロファージ分化 (図 1、B) 、単球移動に対する抑制 (図 1、C) 効果を確認し、このような効果が併用投与時にさらに増幅されることを確認した。

【 0 2 8 7 】

実施例 4 : GLP - 1 誘導体持続型結合体、GLP - 2 誘導体持続型結合体、及び Anti - TNF mAb の併用投与によるインドメタシンによる炎症性腸疾患ラットにおける小腸の長さ増加及び小腸の炎症減少の確認 30

GLP - 1 誘導体持続型結合体、GLP - 2 誘導体持続型結合体、及び Anti - TNF mAb (*BioXcell* , *Catalog # BE0244*) の併用投与による生体内 (*in vivo*) における小腸 (*Small intestine*) の長さ及び炎症改善効力を測定するために、インドメタシン (*Indomethacin* , *INN*) による炎症性腸疾患ラット (*Rat*) を用いた。具体的には、8 週齢の雄性ラット (*SD rat*) を 1 群当たり 6 匹ずつ、下記のように分けた :

【 0 2 8 8 】

- G1 : 正常対照群 (薬物を投与していない群、 *Vehicle*)
- G2 : インドメタシン対照群 (*Indomethacin* 7 . 5 mg / kg ; 1 日目及び 2 日目 (*D1, 2*)) 40
- G3 : GLP - 2 誘導体持続型結合体 (3 . 1 mg / kg / *single*) の投与後、インドメタシンを投与した群 (GLP - 2 誘導体持続型結合体 3 . 1 mg / kg / *single* ; 0 日目 (*D0*) + *Indomethacin* 7 . 5 mg / kg ; *D1, 2*)
- G4 : GLP - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 178 mg / kg / *single*) の投与後、インドメタシンを投与した群 (GLP - 1 誘導体持続型結合体 0 . 178 mg / kg / *single* ; *D0* + *Indomethacin* 7 . 5 mg / kg ; *D1, 2*)
- G5 : GLP - 2 誘導体持続型結合体 (3 . 1 mg / kg / *single*) と GLP - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 178 mg / kg / *single*) の投与後、インドメタシンを投与した群 ([GLP - 2 誘導体持続型結合体 3 . 1 mg / kg / *single* + GLP - 1 誘導体持続型結合体 0 . 178 mg / kg / *single* ; *D0*] + *Ind* 50

omethacin 7.5 mg / kg , D 1 , 2)

- G 6 : A n t i - T N F m A b (0 . 2 m g / k g / s i n g l e) の投与後、インドメタシンを投与した群 (A n t i - T N F m A b 0 . 2 m g / k g / s i n g l e ; D 0 + I n d o m e t h a c i n 7 . 5 m g / k g ; D 1 , 2)

- G 7 : G L P - 2 誘導体持続型結合体 (3 . 1 m g / k g / s i n g l e) と A n t i - T N F m A b (0 . 2 m g / k g / s i n g l e) の投与後、インドメタシンを投与した群 ([G L P - 2 誘導体持続型結合体 3 . 1 m g / k g / s i n g l e + A n t i - T N F m A b 0 . 2 m g / k g / s i n g l e ; D 0] + I n d o m e t h a c i n 7 . 5 m g / k g ; D 1 , 2)

- G 8 : G L P - 2 誘導体持続型結合体 (3 . 1 m g / k g / s i n g l e) 、 G L P - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 1 7 8 m g / k g / s i n g l e) と A n t i - T N F m A b (0 . 2 m g / k g / s i n g l e) の投与後、インドメタシンを投与した群 ([G L P - 2 誘導体持続型結合体 3 . 1 m g / k g / s i n g l e + G L P - 1 誘導体持続型結合体 0 . 1 7 8 m g / k g / s i n g l e + A n t i - T N F m A b 0 . 2 m g / k g / s i n g l e ; D 0] + I n d o m e t h a c i n 7 . 5 m g / k g ; D 1 , 2)

【 0 2 8 9 】

本明細書において G L P - 1 誘導体持続型結合体又は G L P - 2 誘導体持続型結合体の投与量で示した数値は、使用された G L P - 1 誘導体持続型結合体又は G L P - 2 誘導体持続型結合体の全質量からポリエチレングリコールリンカー部位の質量を除いた数値、即ち、ポリペプチド部位のみの質量を合算した値を基準として表示した数値である。

【 0 2 9 0 】

そして3日目で剖検を通じて小腸の長さ、E v a n s b l u e 染色を通じた炎症部位 (u l c e r a r e a) を測定した。

【 0 2 9 1 】

G 2 のインドメタシン対照群に比べて、G 5 の G L P - 2 誘導体持続型結合体と G L P - 1 誘導体持続型結合体の併用投与後、インドメタシンを投与した群で、小腸の長さが + 2 5 c m 増加し (図 2) 、炎症部位 (u l c e r a r e a) が 6 . 7 % 減少した (図 3) 。 G 2 のインドメタシン対照群に比べて、G 7 の G L P - 2 誘導体持続型結合体と A n t i - T N F m A b の併用投与後、インドメタシンを投与した群で、小腸の長さが + 1 2 c m 増加し (図 2) 、炎症部位が 3 . 5 % 減少した (図 3) 。また、G 2 のインドメタシン対照群に比べて、G 8 の G L P - 2 誘導体持続型結合体、G L P - 1 誘導体持続型結合体と A n t i - T N F m A b の併用投与後、インドメタシンを投与した群で、小腸の長さが + 3 2 c m 増加し (正常対照群と類似水準、図 2) 、炎症部位が 7 . 2 % 減少した (正常対照群と類似水準、図 3) 。

【 0 2 9 2 】

実施例 5 : G L P - 1 誘導体持続型結合体と G L P - 2 誘導体持続型結合体の併用投与によるデキストラン硫酸ナトリウムによる潰瘍性大腸炎マウスにおける大腸の長さ増加及び潰瘍性大腸炎活動指数減少の確認

G L P - 1 誘導体持続型結合体と G L P - 2 誘導体持続型結合体の併用投与による生体内大腸 (L a r g e i n t e s t i n e) の長さ及び潰瘍性大腸炎活動指数 (D i s e a s e a c t i v i t y i n d e x , D A I) の改善効力を測定するために、デキストラン硫酸ナトリウム (D e x t r a n s u l f a t e s o d i u m , D S S) による潰瘍性大腸炎マウス (m o u s e) を用いた。具体的には、7 週齢の雄性マウス (C 5 7 B L / 6) を 1 群当たり 1 0 匹ずつ、下記のように分けた。D S S は飲水に 2 % 混ぜて投与され、1 c y c l e は 5 日の D S S が含まれた飲水と 5 日の一般飲水を飲むことを意味する。総 3 c y c l e 後に薬物が投与され、最初の c y c l e で D S S が含まれた飲水が投与された最初の日を 0 日目と命名した。

【 0 2 9 3 】

- G 1 : 正常対照群 (薬物を投与していない群、V e h i c l e)

- G2 : DSS 対照群 (2 % DSS、3 cycles)
- G3 : DSS 投与後、GLP - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 3 0 1 m g / k g / Q 2 D) を投与した群 (2 % DSS、3 cycles + GLP - 1 誘導体持続型結合体 0 . 3 0 1 m g / k g / Q 2 D、2 週)
- G4 : DSS 投与後、GLP - 2 誘導体持続型結合体 (1 . 7 5 7 m g / k g / Q 2 D) を投与した群 (2 % DSS、3 cycles + GLP - 2 誘導体持続型結合体 1 . 7 5 7 m g / k g / Q 2 D、2 週)
- G5 : DSS 投与後、GLP - 1 誘導体持続型結合体 (0 . 3 0 1 m g / k g / Q 2 D) と GLP - 2 誘導体持続型結合体 (1 . 7 5 7 m g / k g / Q 2 D) を投与した群 (2 % DSS、3 cycles + [GLP - 1 誘導体持続型結合体 0 . 3 0 1 m g / k g / Q 2 D + GLP - 2 誘導体持続型結合体 1 . 7 5 7 m g / k g / Q 2 D]、2 週)
- G6 : DSS 投与後、シクロスポリン・エイ (Cyclosporine A ; 2 0 m g / k g / Q D , P O) を投与した群 (2 % DSS、3 cycles + Cyclosporine A 2 0 m g / k g / Q D、2 週)

【 0 2 9 4 】

そして 4 4 日目で剖検を通じて大腸の長さを測定し、病症改善を測定した (図 4) 。

【 0 2 9 5 】

潰瘍性大腸炎活動指数は、便の硬さ (stool consistency) と出血状態を点数化して測定した。便の硬さの場合、正常 (0 点)、肉眼で形態が見えるが、押し込んだ時に正常群の便と異なって柔らかい (1 点)、正常群の便と異なって形態も丸くなく柔らかい (2 点)、形態が取れておらず、便が非常に柔らかい (3 点)、下痢により肛門の周囲がぬれており、便がよく出ず水が出てくる (4 点) で測定した。出血状態の場合、出血がなし (0 点)、便を押し込んだ時に血が見える状態 (2 点)、便を押しなくても血が見える状態 (3 点)、直腸 (rectal) から深刻な出血が確認される状態 (4 点) で測定した。測定は 2 1 日、2 3 日、2 5 日、2 8 日、3 0 日、3 2 日、3 5 日、3 7 日、3 9 日、4 2 日、4 4 日目で行い、これを合算した値を通じて病症の改善を測定した (図 5) 。

【 0 2 9 6 】

G2 の DSS 対照群に比べて、G5 の DSS 投与後、GLP - 1 誘導体持続型結合体と GLP - 2 誘導体持続型結合体を投与した群で大腸の長さが + 0 . 8 c m (1 8 %) 程度増加し (正常対照群と類似水準、図 4)、潰瘍性大腸炎活動指数が 1 0 減少した (図 5)。また、G6 の DSS 投与後に臨床で手術直前の段階 (severe) に使用される Cyclosporine A (2 0 m g / k g / Q D) を投与した群に比べて、G5 の DSS 投与後、GLP - 1 誘導体持続型結合体と GLP - 2 誘導体持続型結合体を投与した群で大腸の長さが + 1 . 4 c m (2 5 %) 程度増加し (正常対照群と類似水準、図 4)、潰瘍性大腸炎活動指数が 6 減少した (図 5) 。

【 0 2 9 7 】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施されることが理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本発明の範囲は前記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更又は改変された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

10

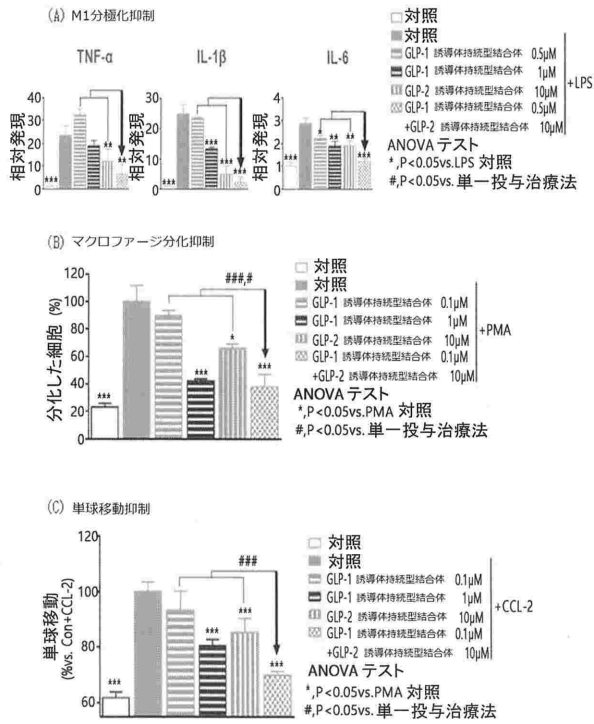
20

30

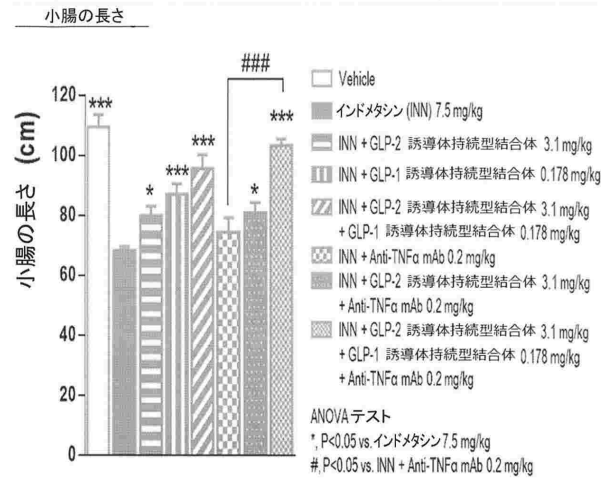
40

【 図 面 】

【 図 1 】



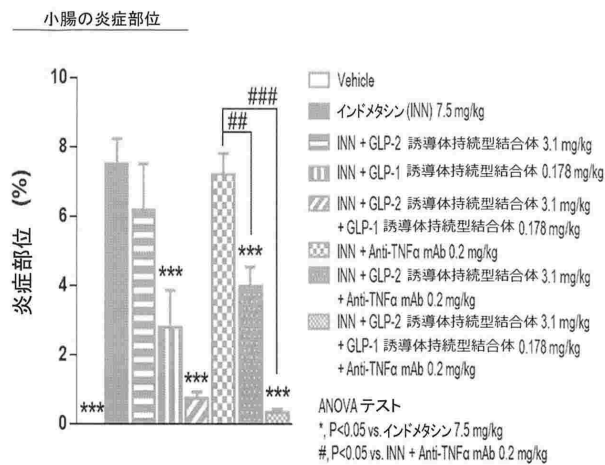
【 図 2 】



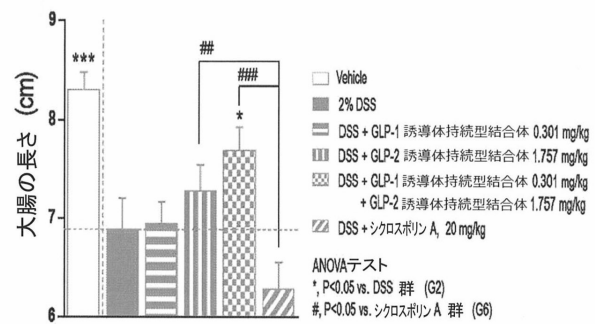
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

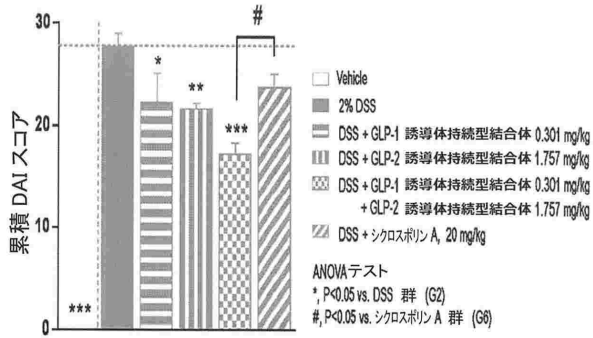


30

40

50

【 図 5 】



10

【 配列表 】

202551334500001.xml

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/005198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 38/26(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; C07K 14/605(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/26(2006.01); A61P 1/00(2006.01); C07K 14/605(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 글루카곤 유사 펩타이드-1(glucagon-like peptide-1), 글루카곤 유사 펩타이드-2(glucagon-like peptide-2), TNF α 억제제(TNF α inhibitor), 병용 투여(co-administration), 장질환(bowel disease)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	KR 10-2011-0110174 A (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 06 October 2011 (2011-10-06) See paragraphs [0006]-[1361]; and figure 10.	1-7,12-18,20,21,27,28 8-11,19,22-26
Y	KR 10-2019-0037181 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 05 April 2019 (2019-04-05) See paragraphs [0013]-[0367].	8-11,19,22-26
A	KR 10-2017-0078668 A (GUBRA APS) 07 July 2017 (2017-07-07) See entire document.	1-28
A	KR 10-2016-0083810 A (GENEXINE, INC.) 12 July 2016 (2016-07-12) See paragraphs [0018] and [0019].	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 July 2023		Date of mailing of the international search report 19 July 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/005198

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021-198195 A1 (ZEALAND PHARMA A/S) 07 October 2021 (2021-10-07) See claim 1.	1-28

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/005198

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed. b. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), <input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	<input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3.	Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/005198

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2011-0110174 A	06 October 2011	AR 074811 A1	16 February 2011
		BR P10922969 A2	24 September 2019
		CA 2747499 A1	24 June 2010
		CL 2011001498 A1	09 March 2012
		CN 102325539 A	18 January 2012
		EP 2376097 A1	19 October 2011
		EP 3075385 A1	05 October 2016
		IL 213113 A	31 July 2011
		IL 213113 B	28 September 2017
		IL 213113 D0	31 July 2011
		JP 2012-512903 A	07 June 2012
		JP 2015-180649 A	15 October 2015
		MX 2011006524 A	17 August 2011
		PE 03322012 A1	14 April 2012
		PE 20120332 A1	14 April 2012
		RU 2011129784 A	27 January 2013
		RU 2550696 C2	10 May 2015
		SG 172291 A1	28 July 2011
		US 2011-0288003 A1	24 November 2011
		US 8969288 B2	03 March 2015
WO 2010-071807 A1	24 June 2010		
KR 10-2019-0037181 A	05 April 2019	AR 113258 A1	11 March 2020
		AU 2018-339210 A1	16 April 2020
		BR 112020006189 A2	13 October 2020
		CA 3084326 A1	04 April 2019
		CN 111433221 A	17 July 2020
		EA 202090571 A1	30 July 2020
		EP 3689898 A1	05 August 2020
		IL 273528 A	31 May 2020
		IL 273528 D0	31 May 2020
		JP 2020-534840 A	03 December 2020
		MX 2020004453 A	24 July 2020
		PH 12020550105 A1	07 December 2020
		SG 11202002563 A	29 April 2020
		TW 201927806 A	16 July 2019
		TW 202142560 A	16 November 2021
		US 11530249 B2	20 December 2022
		US 2020-0262888 A1	20 August 2020
		US 2022-0251164 A1	11 August 2022
		US 2023-0090790 A1	23 March 2023
		WO 2019-066586 A1	04 April 2019
ZA 202001888 B	26 May 2021		
KR 10-2017-0078668 A	07 July 2017	CA 2965560 A1	06 May 2016
		EP 3212217 A1	06 September 2017
		JP 2017-537894 A	21 December 2017
		US 2018-0280480 A1	04 October 2018
		WO 2016-066818 A1	06 May 2016
KR 10-2016-0083810 A	12 July 2016	CN 107207618 A	26 September 2017
		CN 107207618 B	30 October 2020
		DK 3241850 T3	04 November 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/005198

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 3241850 A1	08 November 2017
		EP 3241850 B1	04 September 2019
		ES 2757812 T3	30 April 2020
		HK 1246321 A1	07 September 2018
		JP 2018-504111 A	15 February 2018
		JP 6379300 B2	22 August 2018
		KR 10-1825048 B1	05 February 2018
		KR 10-1825049 B1	05 February 2018
		KR 10-2017-0106258 A	20 September 2017
		PL 3241850 T3	31 January 2020
		TW 201636375 A	16 October 2016
		TW 201738278 A	01 November 2017
		TW I691513 B	21 April 2020
		US 10538569 B2	21 January 2020
		US 2017-0362293 A1	21 December 2017
		WO 2016-108654 A1	07 July 2016
WO 2021-198195 A1	07 October 2021	EP 4126004 A1	08 February 2023
		US 2023-0110689 A1	13 April 2023

10

20

30

40

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/005198

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 38/26(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; C07K 14/605(2006.01)i

B. 조사된 분야
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 38/26(2006.01); A61P 1/00(2006.01); C07K 14/605(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 글루카곤 유사 펩타이드-1(glucagon-like peptide-1), 글루카곤 유사 펩타이드-2(glucagon-like peptide-2), TNF α 억제제(TNF α inhibitor), 병용 투여(co-administration), 장질환(bowel disease)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	KR 10-2011-0110174 A (인디애나 유니버시티 리서치 엔드 테크놀로지 코퍼레이션) 2011.10.06 단락 [0006]-[1361]; 및 도 10	1-7,12-18,20,21,27,28 8-11,19,22-26
Y	KR 10-2019-0037181 A (한미약품 주식회사) 2019.04.05 단락 [0013]-[0367]	8-11,19,22-26
A	KR 10-2017-0078668 A (구브라 에이피에스) 2017.07.07 전체 문헌	1-28
A	KR 10-2016-0083810 A (주식회사 체넥신) 2016.07.12 단락 [0018], [0019]	1-28
A	WO 2021-198195 A1 (ZEALAND PHARMA A/S) 2021.10.07 청구항 1	1-28

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일: **2023년07월19일(19.07.2023)** / 국제조사보고서 발송일: **2023년07월19일(19.07.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소: **대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**
 팩스 번호 **+82-42-481-8578**
 심사관: **허주형**
 전화번호 **+82-42-481-5373**

서적 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사 보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/005198

제1기 재판 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 - 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

10

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

20

30

40

50

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/005198

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0110174 A	2011/10/06	AR 074811 A1	2011/02/16
		BR PI0922969 A2	2019/09/24
		CA 2747499 A1	2010/06/24
		CL 2011001498 A1	2012/03/09
		CN 102325539 A	2012/01/18
		EP 2376097 A1	2011/10/19
		EP 3075385 A1	2016/10/05
		IL 213113 A	2011/07/31
		IL 213113 B	2017/09/28
		IL 213113 D0	2011/07/31
		JP 2012-512903 A	2012/06/07
		JP 2015-180649 A	2015/10/15
		MX 2011006524 A	2011/08/17
		PE 03322012 A1	2012/04/14
		PE 20120332 A1	2012/04/14
		RU 2011129784 A	2013/01/27
		RU 2550696 C2	2015/05/10
SG 172291 A1	2011/07/28		
US 2011-0288003 A1	2011/11/24		
US 8969288 B2	2015/03/03		
WO 2010-071807 A1	2010/06/24		
KR 10-2019-0037181 A	2019/04/05	AR 113258 A1	2020/03/11
		AU 2018-339210 A1	2020/04/16
		BR 112020006189 A2	2020/10/13
		CA 3084326 A1	2019/04/04
		CN 111433221 A	2020/07/17
		EA 202090571 A1	2020/07/30
		EP 3689898 A1	2020/08/05
		IL 273528 A	2020/05/31
		IL 273528 D0	2020/05/31
		JP 2020-534840 A	2020/12/03
		MX 2020004453 A	2020/07/24
		PH 12020550105 A1	2020/12/07
		SG 11202002563 A	2020/04/29
		TW 201927806 A	2019/07/16
		TW 202142560 A	2021/11/16
		US 11530249 B2	2022/12/20
		US 2020-0262888 A1	2020/08/20
US 2022-0251164 A1	2022/08/11		
US 2023-0090790 A1	2023/03/23		
WO 2019-066586 A1	2019/04/04		
ZA 202001888 B	2021/05/26		
KR 10-2017-0078668 A	2017/07/07	CA 2965560 A1	2016/05/06
		EP 3212217 A1	2017/09/06
		JP 2017-537894 A	2017/12/21
		US 2018-0280480 A1	2018/10/04
		WO 2016-066818 A1	2016/05/06
KR 10-2016-0083810 A	2016/07/12	CN 107207618 A	2017/09/26
		CN 107207618 B	2020/10/30
		DK 3241850 T3	2019/11/04

10

20

30

40

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/005198

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 3241850 A1	2017/11/08
		EP 3241850 B1	2019/09/04
		ES 2757812 T3	2020/04/30
		HK 1246321 A1	2018/09/07
		JP 2018-504111 A	2018/02/15
		JP 6379300 B2	2018/08/22
		KR 10-1825048 B1	2018/02/05
		KR 10-1825049 B1	2018/02/05
		KR 10-2017-0106258 A	2017/09/20
		PL 3241850 T3	2020/01/31
		TW 201636375 A	2016/10/16
		TW 201738278 A	2017/11/01
		TW I691513 B	2020/04/21
		US 10538569 B2	2020/01/21
		US 2017-0362293 A1	2017/12/21
		WO 2016-108654 A1	2016/07/07
WO 2021-198195 A1	2021/10/07	EP 4126004 A1	2023/02/08
		US 2023-0110689 A1	2023/04/13

10

20

30

40

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	U
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	A 6 1 K	47/68	
C 0 7 K	14/715 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	Z N A
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 0 7 K	14/715	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 0 7 K	16/24	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/28 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
		C 1 2 N	15/28	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,M X,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,S T,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 松田 七重

- (72)発明者 チョイ ジェ ヒョク
大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギ - ド ファソン - シ ドンタンギフン - 口 5 5 0
- (72)発明者 リ ジン ボン
大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギ - ド ファソン - シ ドンタンギフン - 口 5 5 0
- (72)発明者 パク ウン ジン
大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギ - ド ファソン - シ ドンタンギフン - 口 5 5 0
- (72)発明者 リ サン ヒョン
大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギ - ド ファソン - シ ドンタンギフン - 口 5 5 0
- (72)発明者 キム サン ユン
大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギ - ド ファソン - シ ドンタンギフン - 口 5 5 0
- (72)発明者 パク スル ヒ
大韓民国 1 8 4 6 9 キョンギ - ド ファソン - シ ドンタンギフン - 口 5 5 0

F ターム (参考) 4C076 AA94 CC07 CC16 CC30 EE23 EE41 EE59
4C084 AA02 AA03 AA19 BA01 BA02 BA08 BA19 BA23 BA41 BA44
CA18 CA43 CA53 DA53 DB01 DB35 MA02 NA05 NA06 NA12 NA14
ZA661 ZA662 ZA681 ZA682 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZC75
4C085 AA14 BB17 EE03
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 BA57 CA40 DA30 DA76 EA25
FA74