



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111433221 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 27

(21) 申请号 201880074180.4
 (22) 申请日 2018.09.28
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111433221 A
 (43) 申请公布日 2020.07.17
 (30) 优先权数据
 10-2017-0126577 2017.09.28 KR
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.05.15
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2018/011586 2018.09.28
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/066586 KO 2019.04.04

(73) 专利权人 韩美药品株式会社
 地址 韩国京畿道
 (72) 发明人 崔宰赫 金玟永 崔仁荣 郑圣烨
 (74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
 专利代理师 张全信
 (51) Int.Cl.
 C07K 14/605 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 104144697 A, 2014.11.12
 WO 2005103087 A1, 2005.11.03
 WO 2010042145 A1, 2010.04.15
 审查员 杨芥嘉

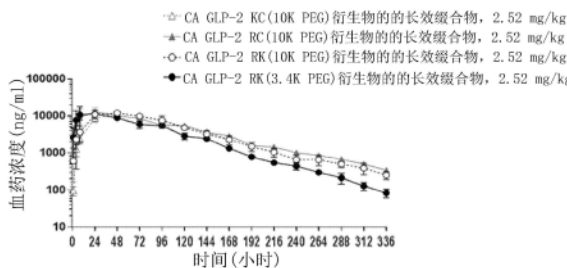
权利要求书3页 说明书23页
 序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 衍生物的长效缀合物

(57) 摘要

本发明涉及胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 衍生物、其缀合物及其用途。另外,本发明涉及用于制备胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 衍生物及其缀合物的方法。



1. 一种胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 缀合物, 其中GLP-2衍生物和免疫球蛋白Fc区各自经由非肽基聚合物在所述非肽基聚合物的两个末端处共价连接,

其中所述非肽基聚合物是聚乙二醇,

其中所述GLP-2衍生物通过所述GLP-2衍生物的C-末端与所述非肽基聚合物连接, 并且

其中所述GLP-2衍生物由以下通式1的氨基酸序列组成:

[通式1]

$X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (SEQ ID NO:9),

其中, 在上式中,

X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸;

X_2 是甘氨酸;

X_{30} 是精氨酸; 和

X_{34} 是赖氨酸或半胱氨酸。

2. 根据权利要求1所述的GLP-2缀合物, 其中 X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸; X_2 是甘氨酸; X_{30} 是精氨酸; 和 X_{34} 是赖氨酸或半胱氨酸。

3. 根据权利要求1所述的GLP-2缀合物, 其中所述GLP-2衍生物为SEQ ID NO:4或6的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的GLP-2缀合物, 其中所述非肽基聚合物的一端与所述免疫球蛋白Fc区缀合, 并且其另一端与所述GLP-2衍生物的羟基、巯基、氨基或叠氮基缀合。

5. 根据权利要求1所述的GLP-2缀合物, 其中所述免疫球蛋白Fc区是非糖基化的。

6. 根据权利要求1所述的GLP-2缀合物, 其中所述免疫球蛋白Fc区包括铰链区。

7. 根据权利要求1所述的GLP-2缀合物, 其中所述免疫球蛋白Fc区为IgG4Fc区。

8. 根据权利要求1所述的GLP-2缀合物,

其中所述非肽基聚合物是聚乙二醇, 并且

其中所述GLP-2衍生物由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成。

9. 一种GLP-2衍生物, 其由以下通式1的氨基酸序列组成:

[通式1]

$X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (SEQ ID NO:9),

其中, 在上式中,

(a) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸;

X_2 是甘氨酸;

X_{30} 是赖氨酸; 和

X_{34} 是赖氨酸, 或者

(b) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸;

X_2 是甘氨酸;

X_{30} 是精氨酸; 和

X_{34} 是赖氨酸或半胱氨酸。

10. 根据权利要求9所述的GLP-2衍生物, 其中 X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸; X_2 是甘氨酸; X_{30} 是赖氨酸; 和 X_{34} 是赖氨酸。

11. 根据权利要求9所述的GLP-2衍生物, 其中 X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸; X_2 是甘氨酸;

X_{30} 是精氨酸;和 X_{34} 是赖氨酸或半胱氨酸。

12. 根据权利要求9所述的GLP-2衍生物,

其中所述GLP-2衍生物选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

13. 一种分离的核酸,其编码根据权利要求9至12中任一项所述的GLP-2衍生物。

14. 一种重组表达载体,其包括根据权利要求13所述的核酸。

15. 一种转化体,其包括根据权利要求14所述的重组表达载体。

16. 一种用于制备根据权利要求9至12中任一项所述的GLP-2衍生物的方法,所述方法包括:

a) 培养包括核酸的转化体,所述核酸编码根据权利要求9至12中任一项所述的GLP-2衍生物以表达所述GLP-2衍生物;和

b) 分离并纯化所表达的GLP-2衍生物。

17. 一种用于制备GLP-2缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 通过使具有两个或更多个末端反应基团的非肽基聚合物与GLP-2衍生物和免疫球蛋白Fc区中的一种反应来制备复合体,使得所述复合体具有附接至所述非肽基聚合物的一个末端的GLP-2衍生物或免疫球蛋白Fc区,和在另一个末端的反应基团;和

(b) 通过使在步骤(a)中制备的复合体与没有附接至所述复合体的免疫球蛋白Fc区和GLP-2衍生物中的一种反应来制备缀合物,使得所述GLP-2衍生物和所述免疫球蛋白Fc区经由非肽基聚合物连接,

其中所述GLP-2衍生物通过所述GLP-2衍生物的C-末端与所述非肽基聚合物连接,

其中所述GLP-2衍生物由以下通式1的氨基酸序列组成:

[通式1]

$X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (SEQ ID NO:9),

其中,在上式中,

X_1 是咪唑乙酰基去组氨酸;

X_2 是甘氨酸;

X_{30} 是精氨酸;和

X_{34} 是赖氨酸或半胱氨酸,

其中所述非肽基聚合物是聚乙二醇。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述非肽基聚合物包括选自醛基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物的一个或多个反应基团。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述醛基是丙醛基或丁醛基。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中所述琥珀酰亚胺衍生物是琥珀酰亚胺基羧甲基、琥珀酰亚胺基戊酸酯、琥珀酰亚胺基丁酸甲酯、琥珀酰亚胺基丙酸甲酯、琥珀酰亚胺基丁酸酯、琥珀酰亚胺基丙酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺或琥珀酰亚胺基碳酸酯。

21. 根据权利要求1至8中任一项所述的GLP-2缀合物或包含所述GLP-2缀合物的组合物、或根据权利要求9至12中任一项所述的GLP-2衍生物或包含所述GLP-2衍生物的组合物用于制备用于预防或治疗选自短肠综合症、过敏性肠道疾病、炎症性肠道疾病、粘膜炎症和肠道萎缩的一种或多种疾病的药物的用途。

22. 根据权利要求1至8中任一项所述的GLP-2缀合物或包含所述GLP-2缀合物的组合

物、或根据权利要求9至12中任一项所述的GLP-2衍生物或包含所述GLP-2衍生物的组合物用于制备用于预防或治疗结肠炎或回肠炎的药物的用途。

23. 根据权利要求21所述的用途,其中所述炎症性肠道疾病是克罗恩氏病。

24. 一种药物组合物,其用于预防或治疗选自胰腺炎、十二指肠炎和十二指肠溃疡的一种或多种疾病,包括根据权利要求1-8中任一项所述的GLP-2缀合物或根据权利要求9-12中任一项所述的GLP-2衍生物。

胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 衍生物的长效缀合物

技术领域

[0001] 本发明涉及胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 衍生物、其缀合物及其用途。另外,本发明涉及用于制备胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 衍生物及其缀合物的方法。

背景技术

[0002] 胰高血糖素样肽2 (GLP-2) 是在营养物质摄入后由肠道内分泌L细胞产生的一种33个氨基酸的肽激素。GLP-2刺激小肠和大肠的粘膜生长,并抑制肠道细胞和隐窝细胞的生长促进和凋亡。此外,GLP-2增强了小肠中营养物质的吸收并降低了肠道通透性。另外,GLP-2抑制了胃排空和胃酸分泌,同时增加了肠的血流速度并使肠道平滑肌松弛。因为GLP-2具有吸收和保护能量并激活肠道细胞功能的能力,所以已在各种肠道疾病和损伤的体内模型中显示出很高的治疗潜力。

[0003] 然而,GLP-2在开发为商业药物方面仍具有局限性。肽比如GLP-2由于稳定性低而容易变性,由于在体内被蛋白酶降解而失去活性,并且由于其相对较小的尺寸而容易通过肾脏去除。因此,为了维持最佳的血药浓度和肽药物的滴度,需要更频繁地施用肽药物。然而,大多数肽药物以各种类型的注射施用,并且需要频繁注射以维持肽药物的血药浓度,这导致患者剧烈的疼痛。在这方面,已经进行了许多尝试来解决这些问题,其中之一已经开发出一种增加肽药物的膜通透性的方法,该方法导致通过口服或鼻内吸入将肽药物递送至体内。然而,与注射其相比,该方法具有低的肽药物递送效率的局限性,并且因此仍然难以保持肽药物的足够的生物活性以用于治疗用途。

[0004] 具体地,GLP-2由于被二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 灭活而具有极短的体内半衰期(7分钟或更短),该二肽基肽酶-IV在GLP-2的2位(Ala)和3位(Asp)的氨基酸之间切割(Bolette H.等人,The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism.85(8):2884-2888,2000)。已经尝试主要通过氨基酸取代来增加GLP-2的体内半衰期。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明的目的是提供GLP-2衍生物。

[0007] 本发明的另一个目的是提供编码GLP-2衍生物的分离的核酸、包括其的重组表达载体以及包括该重组表达载体的转化体。

[0008] 本发明的又一个目的是提供用于制备GLP-2衍生物的方法。

[0009] 本发明的又一个目的是提供GLP-2缀合物,其中GLP-2衍生物和能够增加其体内半衰期的材料连接。

[0010] 本发明的又一个目的是提供用于制备GLP-2缀合物的方法。

[0011] 本发明的又一个目的是提供具有增加的体内耐久性和稳定性的GLP-2的长效制剂,其中该长效制剂包括GLP-2缀合物。

[0012] 本发明的又一个目的是提供用于预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的

一种或多种疾病的药物组合物,该药物组合物包括GLP-2衍生物和/或GLP-2缀合物。

[0013] 本发明的又一个目的是提供用于预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病的方法,该方法包括将GLP-2衍生物、GLP-2缀合物或包含其的药物组合物作为活性成分施用至需要其的受试者。

[0014] 本发明的又一个目的是提供GLP-2衍生物或GLP-2缀合物在制备药物中的用途。

[0015] 本发明的又一个目的是提供GLP-2衍生物或GLP-2缀合物在预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病中的用途。

[0016] 技术方案

[0017] 在一个方面中,本发明提供了胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 缀合物,其中GLP-2衍生物和免疫球蛋白Fc区各自经由非肽基聚合物在该非肽基聚合物的两个末端处共价连接,和

[0018] 其中该非肽基聚合物选自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚乙氧基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基乙醚、脂质聚合物、几丁质、透明质酸及其组合。

[0019] 在一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中GLP-2衍生物包括以下通式1的氨基酸序列:

[0020] [通式1]

[0021] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (SEQ ID NO:9),

[0022] 其中,在上式中,

[0023] X_1 是组氨酸、咪唑基乙酰基去组氨酸、去氨基组氨酸、 β -羟基咪唑基丙酰基去组氨酸、N-二甲基组氨酸或 β -羧基咪唑基丙酰基去组氨酸;

[0024] X_2 是丙氨酸、甘氨酸或2-氨基异丁酸(Aib);

[0025] X_{30} 是赖氨酸或精氨酸;和

[0026] X_{34} 不存在,或是赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、6-叠氮基-赖氨酸或半胱氨酸;条件是排除通式1中与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相同的任何序列。

[0027] 在另一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中在GLP-2衍生物的通式1中,(1) X_2 是甘氨酸,(2) X_{30} 是精氨酸,或(3) X_2 是甘氨酸和 X_{30} 是精氨酸。

[0028] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中

[0029] (1) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是半胱氨酸;

[0030] (2) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是赖氨酸;

[0031] (3) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是精氨酸,和 X_{34} 是赖氨酸;

[0032] (4) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是6-叠氮基-赖氨酸;

[0033] (5) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是精氨酸,和 X_{34} 是半胱氨酸;

[0034] (6) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是Aib, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是半胱氨酸;或

[0035] (7) X_1 是组氨酸, X_2 是Aib, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是半胱氨酸。

[0036] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中GLP-2衍生物的至少一个残基是半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸或6-叠氮基-赖氨酸。

[0037] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中GLP-2衍生物为选自SEQ ID NO:2至8的氨基酸序列。

[0038] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中非肽基聚合物的一端与免疫球蛋白Fc区缀合,和其另一端与GLP-2衍生物的羟基、巯基、氨基或叠氮基缀合。

[0039] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中免疫球蛋白Fc区是非糖基化的。

[0040] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中免疫球蛋白Fc区进一步包括铰链区。

[0041] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中免疫球蛋白Fc区为IgG4 Fc区。

[0042] 在另一方面中,本发明提供了包括以下通式1的氨基酸序列的GLP-2衍生物:

[0043] [通式1]

[0044] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (SEQ ID NO:9),

[0045] 其中,在上式中,

[0046] X_1 是组氨酸、咪唑基乙酰基去组氨酸、去氨基组氨酸、 β -羟基咪唑基丙酰基去组氨酸、N-二甲基组氨酸或 β -羧基咪唑基丙酰基去组氨酸;

[0047] X_2 是丙氨酸、甘氨酸或2-氨基异丁酸(Aib);

[0048] X_{30} 是赖氨酸或精氨酸;和

[0049] X_{34} 不存在,或是赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、6-叠氮基-赖氨酸或半胱氨酸;条件是排除通式1中与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相同的任何序列。

[0050] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2衍生物,其中在通式中,(1) X_2 是甘氨酸,(2) X_{30} 是精氨酸,或(3) X_2 是甘氨酸和 X_{30} 是精氨酸。

[0051] 在又一个具体实施方式中,本发明提供了GLP-2衍生物,其中

[0052] (1) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是半胱氨酸;

[0053] (2) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是赖氨酸;

[0054] (3) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是精氨酸,和 X_{34} 是赖氨酸;

[0055] (4) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是6-叠氮基-赖氨酸;

[0056] (5) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是甘氨酸, X_{30} 是精氨酸,和 X_{34} 是半胱氨酸;

[0057] (6) X_1 是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 是Aib, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是半胱氨酸;或

[0058] (7) X_1 是组氨酸, X_2 是Aib, X_{30} 是赖氨酸,和 X_{34} 是半胱氨酸。

[0059] 在又另一方面中,本发明提供了编码GLP-2衍生物的分离的核酸。

[0060] 在又另一方面中,本发明提供了包括核酸的重组表达载体。

[0061] 在又另一方面中,本发明提供了包括重组表达载体的转化体。

[0062] 在又另一方面中,本发明提供了用于制备GLP-2衍生物的方法,包括:

[0063] a) 培养包括编码GLP-2衍生物的核酸的转化体以表达GLP-2衍生物;和

[0064] b) 分离并纯化表达的GLP-2衍生物。

[0065] 在又另一方面中,本发明提供了用于制备GLP-2缀合物的方法,包括:

[0066] (a) 通过使具有两个或更多个末端反应基团的非肽基聚合物与GLP-2衍生物和免疫球蛋白Fc区中的一种反应来制备复合体,使得该复合体具有附接至非肽基聚合物的一个末端的GLP-2衍生物或免疫球蛋白Fc区,和在另一个末端的反应基团;和

[0067] (b) 通过使步骤(a)中制备的复合体与没有附接至复合体的免疫球蛋白Fc区和GLP-2衍生物中的一种反应来制备缀合物,使得GLP-2衍生物和免疫球蛋白Fc区经由非肽基聚合物连接。

[0068] 在又另一个具体实施方式中,本发明提供了制备方法,其中非肽基聚合物包括选自醛基、丙醛基、丁醛基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物的一个或多个反应基团。

[0069] 在又另一个具体实施方式中,本发明提供了制备方法,其中琥珀酰亚胺衍生物是琥珀酰亚胺基羧甲基、琥珀酰亚胺基戊酸酯、琥珀酰亚胺基丁酸甲酯、琥珀酰亚胺基丙酸甲酯、琥珀酰亚胺基丁酸酯、琥珀酰亚胺基丙酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺或琥珀酰亚胺基碳酸酯。

[0070] 在又另一方面中,本发明提供了具有增加的体内耐久性和稳定性的GLP-2的长效制剂,其中该长效制剂包括GLP-2缀合物。

[0071] 在又另一方面中,本发明提供了用于预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病的药物组合物,该药物组合物包括GLP-2缀合物或GLP-2衍生物。

[0072] 在又另一个实施方式中,本发明提供了药物组合物,其中肠道疾病是短肠综合症、过敏性肠道疾病、炎症性肠道疾病、克罗恩氏病、结肠炎、大肠炎、胰腺炎、回肠炎、粘膜炎或肠道萎缩。

[0073] 在又另一个实施方式中,本发明提供了药物组合物,其中胃病是胃痉挛、胃炎、胃溃疡、十二指肠炎或十二指肠溃疡。

[0074] 在又另一方面中,本发明提供了用于预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病的方法,该方法包括将GLP-2缀合物、GLP-2衍生物或包括其的药物组合物作为活性成分施用至需要其的受试者。

[0075] 在又另一方面中,本发明提供了GLP-2衍生物或GLP-2缀合物在制备药物中的用途。

[0076] 在又具体实施方式中,本发明提供了GLP-2衍生物或GLP-2缀合物的用途,其中该药物用于预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病。

[0077] 在又另一方面中,本发明提供了GLP-2衍生物或GLP-2缀合物在预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病中的用途。

[0078] 有益效果

[0079] 因为本发明的GLP-2衍生物及其长效缀合物具有显著高的活性和优异的体内持续效果,这些可以有效地用于预防、改善和治疗肠道疾病、肠道损伤和胃病。

附图说明

[0080] 图1显示了通过反相柱分析GLP-2衍生物的长效缀合物的纯度的结果。

[0081] 图2是显示GLP-2衍生物的长效缀合物的血药浓度的变化的图。

[0082] 图3是图显示了替度鲁肽(Teduglutide)和GLP-2衍生物的长效缀合物的血药浓度的变化的图。

[0083] 图4是显示替度鲁肽和GLP-2衍生物的长效缀合物的体内效果(A:小肠的重量,B:小肠绒毛的长度)的图。

具体实施方式

[0084] 以下将描述本发明的具体细节。具体地,本发明中公开的说明和实施方式可以分别应用于其他说明和实施方式。即,本发明中公开的各种要素的所有组合都属于本发明的范围。此外,本发明的范围不应由下文提供的具体公开内容限制。

[0085] 另外,基于常规实验,本领域技术人员将能够识别或证实本申请中描述的本发明的具体实施方式的许多等同形式,并且这些等同形式旨在包括在本发明中。

[0086] 在整个说明书中,不仅使用天然存在的氨基酸的常规的一个字母或三个字母代码,而且使用其他氨基酸通常允许的那些三个字母代码,例如Aib(2-氨基异丁酸)、^{AZ}K(6-叠氮基赖氨酸)等。此外,如下根据IUPAC-IUB规则描述了本文缩写中提到的氨基酸:

	丙氨酸	Ala, A;	精氨酸	Arg, R;
	天冬酰胺	Asn, N;	天冬氨酸	Asp, D;
	半胱氨酸	Cys, C;	谷氨酸	Glu, E;
	谷氨酰胺	Gln, Q;	甘氨酸	Gly, G;
	组氨酸	His, H;	异亮氨酸	Ile, I;
[0087]	亮氨酸	Leu, L;	赖氨酸	Lys, K;
	甲硫氨酸	Met, M;	苯丙氨酸	Phe, F;
	脯氨酸	Pro, P;	丝氨酸	Ser, S;
	苏氨酸	Thr, T;	色氨酸	Trp, W;
	酪氨酸	Tyr, Y;	缬氨酸	Val, V.

[0088] 在一个方面中,本发明提供了GLP-2衍生物。

[0089] 在本发明中,“GLP-2衍生物”包括与天然GLP-2相比具有一个或多个氨基酸序列差异的肽;通过修饰天然GLP-2序列修饰的肽;和天然GLP-2的模拟物,该模拟物具有与天然GLP-2相同的预防、治疗和/或减轻肠道疾病、肠道损伤和胃病的功能。另外,GLP-2的衍生物还包括对GLP-2受体具有优异的体外和/或体内活性的衍生物。

[0090] 如本文所使用的,术语“胰高血糖素样肽-2 (GLP-2)”是指具有预防、治疗和/或减轻肠道疾病、肠道损伤和胃病的功能的肽,并且其不仅包括GLP-2的天然形式,而且还包括其激动剂、片段、变体、衍生物等。

[0091] 如本文所使用的,术语“GLP-2激动剂”是指可以与GLP-2受体结合并诱导与天然GLP-2相同或相似的生理活性的物质,无论其与GLP-2的结构相似性如何。

[0092] 如本文所使用的,术语“GLP-2片段”是指在GLP-2的N末端或C末端添加或缺失一个或多个氨基酸的肽,其中添加的氨基酸可以是非天然存在的氨基酸(例如,D-氨基酸)。

[0093] 如本文所使用的,术语“GLP-2变体”是指具有与天然GLP-2不同的一个或多个氨基酸的肽。为此,可以诱导被非天然存在的氨基酸以及天然存在的氨基酸取代。

[0094] 在本发明中,用于制备天然GLP-2的激动剂、片段、变体和衍生物的修饰可以包括使用L型或D型氨基酸和/或非天然氨基酸的所有修饰;和/或天然序列的修饰或翻译后修饰(例如,甲基化、酰化、泛素化、分子内共价结合等)。

[0095] 天然GLP-2的这种激动剂、片段、变体和衍生物可以具有预防、治疗和减轻肠道疾病、肠道损伤和胃病的功能。

[0096] 适用于本发明的天然GLP-2的激动剂、片段、变体和衍生物可以通过用于制备激动剂、片段、变体和衍生物的几种方法的组合来制备。

[0097] 本发明中使用的GLP-2可以通过固相合成法合成,并且也可以通过重组法制备。

[0098] 在具体实施方式中,GLP-2的衍生物可以是通过天然GLP-2的一些氨基酸的取代、添加、缺失和修饰的任何一种方法或其组合制备的衍生物。

[0099] 天然GLP-2的氨基酸序列如下:

[0100] GLP-2(1-33)

[0101] HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD(SEQ ID NO:1)

[0102] 具体地,GLP-2衍生物包括用甘氨酸或Aib(2-氨基异丁酸)对天然GLP-2的第二个氨基酸处的丙氨酸的取代,用精氨酸对天然GLP-2的第30个氨基酸处的赖氨酸的取代,或其组合,但不限于此。

[0103] 具体地,GLP-2衍生物可以是与天然GLP-2相比在氨基酸序列中显示至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%的序列同源性的衍生物,和/或形式为其中GLP-2的氨基酸残基的一些基团通过化学取代(例如, α -甲基化, α -羟基化)、缺失(例如,去氨基)或修饰(例如,N-甲基化)来改变的衍生物,但是衍生物的序列同源性和形式不限于此。

[0104] 具体地,GLP-2衍生物可以是其中引入了巯基、氨基或叠氮基的形式,但不限于此。因为GLP-2衍生物对GLP-2受体具有优异的体外和/或体内活性,并且因为当制备GLP-2衍生物的长效缀合物时在引入的基团中发生缀合,所以这些可用于制备GLP-2缀合物,其结合位点被选择性控制。

[0105] 具体地,可以将GLP-2衍生物的羟基、巯基、氨基或叠氮基与非肽基聚合物的一端缀合,并且可以将能够增加体内半衰期的材料(例如,免疫球蛋白Fc区)与非肽基聚合物的另一端缀合。可以通过向GLP-2添加氨基酸来引入巯基、氨基或叠氮基,但不限于此。可以通过向GLP-2添加半胱氨酸(C)来引入巯基,可以通过向GLP-2添加赖氨酸(K)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)或组氨酸(H)来引入氨基,并且可以通过向GLP-2添加6-叠氮基-赖氨酸($_{AZ}$ K)来引入叠氮基,但是这些不限于此。

[0106] 具体地,在GLP-2衍生物中,至少一个残基可以是半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸或6-叠氮基-赖氨酸,但不限于此。

[0107] 在另一个具体实施方式中,在GLP-2衍生物中,N-末端氨基可以被取代、去除或修饰,但不限于此。为了防止在N-末端处结合,N-末端为GLP-2衍生物的体内活性导入位点,当制备长效缀合物时,本发明的GLP-2衍生物可以通过以下方法来制备:去除N-末端组氨酸的 α -氨基的方法、用羟基或羧基取代N-末端氨基的方法、去除N-末端组氨酸的 α -碳和与 α -碳缀合的N-末端氨基使得仅保留咪唑并-乙酰基的方法,以及用两个甲基修饰N-末端氨基的方法。

[0108] 具体地,GLP-2衍生物可以是通过去除组氨酸残基的 α -碳以及与其键合的N-末端氨基而制备的咪唑基乙酰基-去组氨酸基-GLP-2(CA-GLP-2),该组氨酸残基是在GLP-2的N-末端处的第一个氨基酸;通过缺失GLP-2的N-末端氨基而制备的去氨基-组氨酸GLP-2(DA-GLP-2);通过用羟基取代GLP-2的N-末端氨基而制备的 β -羟基咪唑基丙酰基去组氨酸基

GLP-2 (HY-GLP-2) ;通过用两个二甲基修饰GLP-2的N-末端氨基而制备的N-二甲基-组氨酰GLP-2 (DM-GLP-2) ;或通过用羧基取代GLP-2的N-末端氨基而制备的 β -羧基咪唑基丙酰基-去组氨酸基-GLP-2 (CX-GLP-2) ;但不限于此。

[0109] 具体地,本发明的GLP-2衍生物可以包括用甘氨酸取代丙氨酸(其为天然GLP-2的第二个氨基酸)和将巯基(例如,半胱氨酸)引入GLP-2的C-末端;并且更具体地,GLP-2衍生物可以包括咪唑基乙酰基去组氨酸,其中组氨酸残基(其为GLP-2的N-末端的第一个氨基酸)的 α -碳和键合至 α -碳的N-末端氨基被去除(例如,它可具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列),但不限于此。

[0110] 具体地,本发明的GLP-2衍生物可以包括用甘氨酸取代丙氨酸(其为天然GLP-2的第二个氨基酸)和将氨基(例如,赖氨酸)引入C-末端;并且更具体地,GLP-2衍生物可以包括咪唑基乙酰基去组氨酸,其中组氨酸残基(其为GLP-2的N-末端的第一个氨基酸)的 α -碳和键合至 α -碳的N-末端氨基被去除(例如,它可具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列),但不限于此。

[0111] 具体地,本发明的GLP-2衍生物可以包括用甘氨酸取代丙氨酸(其为天然GLP-2的第二个氨基酸)、用精氨酸取代赖氨酸(其为天然GLP-2的第30个氨基酸)和将氨基(例如,赖氨酸)引入C-末端;并且更具体地,GLP-2衍生物可以包括咪唑基乙酰基去组氨酸,其中组氨酸残基(其为在GLP-2的N-末端处的第一个氨基酸)的 α -碳和键合至 α -碳的N-末端氨基被去除(例如,它可具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列),但不限于此。

[0112] 具体地,本发明的GLP-2衍生物可以包括用甘氨酸取代丙氨酸(其为天然GLP-2的第二个氨基酸)和将叠氮基(例如,6-叠氮基-赖氨酸)引入C-末端;并且更具体地,GLP-2衍生物可以包括咪唑基乙酰基去组氨酸,其中组氨酸残基(其为在GLP-2的N-末端处的第一个氨基酸)的 α -碳和键合至 α -碳的N-末端氨基被去除(例如,它可具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列),但不限于此。

[0113] 具体地,本发明的GLP-2衍生物可以包括用甘氨酸取代丙氨酸(其为天然GLP-2的第二个氨基酸)、用精氨酸取代赖氨酸(其为天然GLP-2的第30个氨基酸)和将巯基(例如,半胱氨酸)引入C-末端;并且更具体地,GLP-2衍生物可以包括咪唑基乙酰基去组氨酸,其中组氨酸残基(其为在GLP-2的N-末端处的第一个氨基酸)的 α -碳和键合至 α -碳的N-末端氨基被去除(例如,它可具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列),但不限于此。

[0114] 具体地,本发明的GLP-2衍生物可以包括用甘氨酸取代丙氨酸(其为天然GLP-2的第二个氨基酸)和将巯基(例如,半胱氨酸)引入C-末端(例如,它可具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列);并且更具体地,GLP-2衍生物可以包括咪唑基乙酰基去组氨酸,其中组氨酸残基(其为在GLP-2的N-末端处的第一个氨基酸)的 α -碳和键合至 α -碳的N-末端氨基被去除(例如,它可具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列),但不限于此。

[0115] 在下面表1中显示了SEQ ID NO:2至8的GLP-2衍生物。

[0116] [表1]

[0117]

名称	序列	SEQ ID NO:
CA GLP-2KC	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	2
CA GLP-2KK	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDK	3
CA GLP-2RK	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTRITDK	4

CA GLP-2K _{AZ} K	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD _{AZ} K	5
CA GLP-2RC	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTRITDC	6
CA GLP-2Aib	_{ca} HAibDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	7
GLP-2Aib	HAibDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	8

[0118] 在上面表1中, _{ca}H表示用咪唑基乙酰基去组氨酸代替组氨酸取代的衍生物; Aib表示2-氨基异丁酸; 和_{AZ}K表示6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0119] 根据本发明的GLP-2衍生物可以是包括以上具体序列的肽, 或可以是(基本上)由以上具体序列组成的肽, 但是GLP-2衍生物不限于此。

[0120] 同时, 尽管在本发明中描述为肽或GLP-2衍生物“由具体SEQ ID NO组成”, 但是这种表达不排除可以通过相应的SEQ ID NO的氨基酸序列上游或下游无意义的序列添加发生的肽或GLP-2衍生物中的突变, 或其中天然存在的突变, 或其中的沉默突变, 只要具有这种突变的肽或GLP-2衍生物具有与由相应的SEQ ID NO的氨基酸序列组成的肽或GLP-2衍生物相同的或相应的活性。即使当存在序列添加或突变时, 它显然也属于本发明的范围。

[0121] 在又一个具体实施方式中, GLP-2衍生物可以包括以下通式1的氨基酸序列, 但不限于此:

[0122] [通式1]

[0123] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (SEQ ID NO:9)

[0124] 其中, 在上式中,

[0125] X_1 是组氨酸、咪唑基乙酰基去组氨酸、去氨基组氨酸、 β -羟基咪唑基丙酰基去组氨酸、N-二甲基组氨酸或 β -羧基咪唑基丙酰基去组氨酸;

[0126] X_2 是丙氨酸、甘氨酸或2-氨基异丁酸(Aib);

[0127] X_{30} 是赖氨酸或精氨酸; 和

[0128] X_{34} 不存在, 或是赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、6-叠氮基-赖氨酸或半胱氨酸; 条件是排除通式1中与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相同的任何序列。

[0129] 具体地, 在通式1中, (1) X_2 可以是甘氨酸, (2) X_{30} 可以是精氨酸, 或(3) X_2 可以是甘氨酸和 X_{30} 可以是精氨酸, 但是这些不限于此。

[0130] 具体地, 在通式1中,

[0131] (1) X_1 可以是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 可以是甘氨酸, X_{30} 可以是赖氨酸, 和 X_{34} 可以是半胱氨酸;

[0132] (2) X_1 可以是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 可以是甘氨酸, X_{30} 可以是赖氨酸, 和 X_{34} 可以是赖氨酸;

[0133] (3) X_1 可以是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 可以是甘氨酸, X_{30} 可以是精氨酸, 和 X_{34} 可以是赖氨酸;

[0134] (4) X_1 可以是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 可以是甘氨酸, X_{30} 可以是赖氨酸, 和 X_{34} 可以是6-叠氮基-赖氨酸;

[0135] (5) X_1 可以是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 可以是甘氨酸, X_{30} 可以是精氨酸, 和 X_{34} 可以是半胱氨酸;

[0136] (6) X_1 可以是咪唑基乙酰基去组氨酸, X_2 可以是Aib, X_{30} 可以是赖氨酸, 和 X_{34} 可以是半胱氨酸; 或

[0137] (7) X_1 可以是组氨酸, X_2 可以是Aib, X_{30} 可以是赖氨酸, 和 X_{34} 可以是半胱氨酸, 但是这些不限于此。

[0138] 同时, GLP-2衍生物可以包括肽本身、其盐(例如, 肽的药学上可接受的盐) 或其溶剂化物的形式的所有那些。

[0139] 另外, 肽或GLP-2衍生物可以是任何药学上可接受的形式。

[0140] 盐的种类没有特别限制。然而, 盐优选地是对受试者例如哺乳动物安全并有效的那种, 但不特别限于此。

[0141] 术语“药学上可接受的”是指可以在药物医学决定范围内有效用于预期用途而不会引起过度毒性、刺激性、过敏反应等的材料。

[0142] 如本文使用的, 术语“药学上可接受的盐”指源自药学上可接受的无机酸、有机酸或碱的盐。合适的盐的实例可以包括盐酸、溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、甲苯-p-磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸等。源自合适的碱的盐的实例可以包括碱金属, 比如钠、钾等; 碱土金属比如镁; 铵等。

[0143] 另外, 如本文所使用的, 术语“溶剂化物”是指根据本发明的肽或其盐与溶剂分子之间形成的复合体。

[0144] 本发明的GLP-2衍生物可以通过固相合成法合成, 也可以通过重组法制备, 并且可以在商业上制备。

[0145] 在另一方面中, 本发明提供了编码GLP-2衍生物的分离的核酸、包括该核酸的重组表达载体以及包括该重组表达载体的转化体。

[0146] GLP-2衍生物为如上所述。

[0147] 如本文所使用的, 术语“核酸”是指以单链或双链形式存在的脱氧核糖核苷酸(DNA) 或核糖核苷酸(RNA), 包括从其转录的基因组DNA、cDNA和RNA, 并且作为基本组成单元的核苷酸不仅包括天然核苷酸, 而且还包括在糖或碱基上具有修饰的类似物(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Uhlman and Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584, 1990)。可以使用分子生物学中的标准技术分离或制备本发明的核酸。例如, 可以使用合适的引物序列通过PCR(聚合酶链反应) 从天然GLP-2基因序列中扩增核酸, 并且可以使用自动化DNA合成仪, 使用标准合成技术来制备核酸。

[0148] 如本文所使用的, 术语“载体”是指能够在合适的宿主细胞中表达靶蛋白的重组载体, 该重组载体是包括可操作地连接以使核酸插入物能够表达的必需调节因子的核酸构建体。在本发明中, 可以制备重组载体, 该重组载体包括编码GLP-2衍生物的核酸。另外, 可以通过将重组载体转化或转染到宿主细胞中来获得本发明的GLP-2衍生物。

[0149] 根据本发明的重组载体通常可以构建为克隆载体或表达载体, 并且也可以使用原核或真核细胞作为宿主细胞构建。

[0150] 在本发明中, 编码GLP-2衍生物的核酸与启动子可操作地连接。

[0151] 如本文所使用的, 术语“可操作地连接”是指核酸表达的调节序列(例如, 启动子、信号序列、核糖体结合位点、转录终止序列等) 与不同核酸序列之间的功能性连接, 并且该调节序列可以调节不同核酸序列的转录和/或翻译。

[0152] 如本文所使用的, 术语“启动子”是指位于编码区上游的未翻译核酸序列, 该序列

包括聚合酶结合位点并且具有开始位于启动子下游的基因转录成mRNA的活性,即与聚合酶结合并启动基因转录的DNA结构域,并且它可以位于mRNA转录起始位点的5'结构域。

[0153] 例如,当本发明的载体是重组载体并且使用原核细胞作为宿主细胞时,应该包括能够执行转录的强启动子(例如,tac启动子、lac启动子、lacUV5启动子、lpp启动子、pLλ启动子、pRλ启动子、rac5启动子、amp启动子、recA启动子、SP6启动子、trp启动子、T7启动子等),用于开始翻译的核糖体结合位点以及转录/翻译终止序列。

[0154] 另外,可以通过操纵本领域常用的质粒(例如,pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列、pPICZα系列、pUC19等)、噬菌体(例如,λgt4·λB、λ-Charon、λΔz1、M13等)或病毒(例如,SV40等)来制备用于本发明的载体。

[0155] 同时,当本发明的载体是重组载体并且使用真核细胞作为宿主细胞时,可以使用源自哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子、乳头瘤病毒的7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒启动子和HSV的tk启动子),并且通常包括多聚腺苷酸化序列(例如,牛科动物生长激素终止子和源自SV40的多聚腺苷酸化序列)作为转录终止序列。

[0156] 另外,本发明的重组载体包括本领域通常用作选择标记的抗生素抗性基因,并且可以包括例如对氨基青霉素、庆大霉素、羧苄青霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素、遗传霉素、新霉素和四环素具有抗性的基因。

[0157] 本发明的重组载体可以另外包括序列,以便于纯化所收集的靶蛋白,即GLP-2衍生物。另外包括的序列可以是用于蛋白质纯化的标签序列,例如谷胱甘肽S-转移酶(Pharmacia,美国)、麦芽糖结合蛋白(NEB,美国)、FLAG(ABI,美国)、六组氨酸等,但是纯化靶蛋白所需的序列的种类不限于此。

[0158] 由包括上述标签序列的重组载体表达的融合蛋白可以通过亲和色谱法纯化。例如,当融合谷胱甘肽-S-转移酶时,可以使用作为酶底物的谷胱甘肽,并且当使用6-组氨酸标签时,可以容易地通过Ni-NTA柱收集靶蛋白。

[0159] 如本文所使用的,术语“转化”是指将DNA引入宿主细胞中并使DNA作为染色体因子或通过完成染色体整合而在其中可复制的过程,这是通过将外源DNA引入细胞中人为地引起遗传改变的现象。

[0160] 本发明中使用的转化方法可以是任何转化方法,并且可以根据本领域中使用的常规方法容易地进行。常用的转化方法的实例可以包括CaCl₂沉淀法、在CaCl₂沉淀法中使用二甲基亚砜(DMSO)作为还原剂而具有提高效率的Hanahan方法、电穿孔、CaPO₄沉淀法、原生质体融合法、使用碳化硅纤维的搅拌方法、农杆菌介导的转化、使用PEG的转化、硫酸葡聚糖介导的转化、脂质体介导的转化和干燥/抑制介导的转化等。

[0161] 根据本发明用于转化包括编码GLP-2衍生物的核酸的重组载体的方法不限于这些方法,并且可以使用本领域常用的用于转化或转染的任何方法,但不限于其。

[0162] 可以通过将包括编码GLP-2衍生物的靶核酸的重组载体引入宿主细胞中来获得本发明的转化体。

[0163] 用于本发明的合适的宿主可以没有特别限制,而是可以使用可以表达本发明的核酸的任何宿主。合适的宿主的实例可以包括属于埃希杆菌属的细菌比如大肠杆菌,属于芽

孢杆菌属的细菌比如枯草芽孢杆菌,属于假单胞菌属的细菌比如恶臭假单胞菌,酵母比如毕赤酵母、酿酒酵母和裂殖酵母,昆虫细胞比如草地贪夜蛾(SF9),和动物细胞比如CHO、COS和BSC。具体地,大肠杆菌可以用作宿主细胞,但不限于此。

[0164] 在又另一方面中,本发明提供了使用转化体制备GLP-2衍生物的方法。

[0165] 具体地,本发明提供用于制备GLP-2衍生物的方法,包括:

[0166] a) 培养包括编码GLP-2衍生物的核酸的转化体以表达GLP-2衍生物;和

[0167] b) 分离并纯化表达的GLP-2衍生物。

[0168] 在本发明中,用于培养转化体的培养基必须以合适的方式满足宿主细胞培养的要求。可以根据本领域技术人员的决定,根据其制备的转化体的类型来适当地选择用于生长宿主细胞的培养基中所包含的碳源,并可以选择合适的培养条件,以便控制培养的时间和量。

[0169] 在培养基中使用的糖源的实例可以包括糖和碳水化合物,比如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、淀粉和纤维素;油和脂肪比如大豆油、葵花籽油、蓖麻油和椰子油;脂肪酸比如棕榈酸、硬脂酸和亚麻油酸;醇比如甘油和乙醇;和有机酸比如乙酸。这些材料可以单独使用或组合使用。

[0170] 所使用的氮源的实例可以包括蛋白胨、酵母提取物、肉汁、麦芽提取物、玉米浆、大豆粉和尿素,或无机化合物比如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵。氮源也可以单独使用或组合使用。

[0171] 所使用的磷源的实例可以包括磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或相应的含钠盐。另外,培养基可以包含生长必需的金属盐,例如硫酸镁或硫酸铁。

[0172] 最后,可以使用必需的生长物质,比如氨基酸和维生素。另外,也可以使用培养基的合适前体。上述来源可以在分批培养或连续培养的培养过程中适当地添加到培养物中。可以使用碱性化合物比如氢氧化钠、氢氧化钾和氨,或酸性化合物比如磷酸或硫酸来适当调节培养物的pH。另外,可以添加消泡剂比如脂肪酸聚乙二醇酯来防止泡沫产生。另外,为了维持培养物的有氧状态,可以将氧气或含氧气体(例如空气)注入培养物中。

[0173] 本发明的转化体可以在20°C至45°C,并且具体地在25°C至40°C下培养。另外,继续培养直至获得所需的GLP-2衍生物的最大产量,并且就此而言,培养通常可以持续10小时至160小时。

[0174] 如上所述,当根据宿主细胞提供合适的培养条件时,本发明的转化体可以产生GLP-2衍生物,并且可以将根据宿主细胞的载体组成和特性产生的GLP-2衍生物分泌到细胞质中或进入宿主细胞的周质空间或进入细胞外。

[0175] 可以通过常规方法纯化在宿主细胞内部或外部表达的蛋白质。纯化方法的实例可以包括盐析(例如,硫酸铵沉淀、磷酸钠沉淀等)、溶剂沉淀(例如,使用丙酮或乙醇的蛋白质级分沉淀等)、透析、凝胶过滤、离子交换或色谱比如反向柱色谱、超滤等,并且这些方法可以单独使用或组合使用。

[0176] 在另一方面,本发明提供了增加GLP-2衍生物的半衰期和生物利用度,或连续保持其活性的制剂。具体地,制剂是指含有与GLP-2衍生物直接共价结合的载体的制剂,或包含即使在没有直接共价键的情况下也能够增强GLP-2衍生物的体内活性的维持的组分的制剂。

[0177] 另外,在又另一方面中,本发明提供了GLP-2缀合物,其中GLP-2衍生物和能够增加GLP-2衍生物的体内半衰期的材料连接。另外,本发明的GLP-2衍生物具有比天然GLP-2更高的活性,并且其长效缀合物具有显著提高的血液半衰期。因此,本发明的GLP-2缀合物可以有效地用于预防、治疗和/或减轻肠道疾病、肠道损伤或胃病。

[0178] GLP-2衍生物如上所述。

[0179] 在具体实施方式中,在本发明的缀合物中,GLP-2衍生物和能够增加GLP-2衍生物的体内半衰期的材料可以通过接头连接。

[0180] 在本发明的GLP-2缀合物中,在接头和引入GLP-2衍生物的巯基、氨基或叠氮基之间形成共价键,并且从而可以选择性地调节GLP-2衍生物和接头的结合位点。

[0181] 另外,在GLP-2缀合物中,GLP-2衍生物的N-末端的氨基被取代、缺失或修饰,使得接头与N-末端的结合被阻止,N-末端是体内活性的重要位点,并且因此可以选择性地调节GLP-2衍生物和接头的结合位点,但不限于此。

[0182] 如本文所使用的,术语“能够增加体内半衰期的材料”是指可以与GLP-2衍生物连接从而延长GLP-2衍生物的半衰期的物质。如本文所使用的,术语“能够增加体内半衰期的材料”可以与术语“生物相容性材料”或“载体”互换使用。

[0183] 生物相容性材料或载体可以包括任何材料,只要它可以与GLP-2衍生物连接并延长GLP-2衍生物的半衰期,GLP-2衍生物为例如选自聚乙二醇、脂肪酸、胆固醇、白蛋白和其片段、白蛋白结合材料、特定氨基酸序列的重复单元的聚合物、抗体、抗体片段、FcRn-结合材料、体内结缔组织或其衍生物、核苷酸、纤连蛋白、转铁蛋白、糖和聚合物的那些,但不限于此。

[0184] 生物相容性材料或载体可以经由共价键或非共价键连接至GLP-2衍生物。另外,将GLP-2衍生物与生物相容性材料或载体连接的方法可以包括遗传重组技术和使用聚合物或低分子量化学物质的体外连接,但不限于任何具体的连接方法。

[0185] 在本发明中,当使用聚乙二醇作为载体时,可以包括Ambrx, Inc.的Recode技术(其实现聚乙二醇的位置特异性连接),并且还可以包括NeoseTechnologies, Inc.的糖基聚乙二醇化(glycopegylation)技术(其实现聚糖区域中的具体附接)。另外,该方法可以包括可释放的PEG技术,该技术能够使聚乙二醇在体内缓慢释放,但是该方法不限于此,并且还可以包括能够使用PEG提高体内生物利用度的技术。

[0186] 另外,可以通过上述技术将一种或多种聚合物,比如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚乙氧基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基醚、生物可降解的聚合物、脂聚合物、几丁质或透明质酸连接至GLP-2衍生物。

[0187] 在本发明中,当将白蛋白用作载体时,可以使用能够通过白蛋白或白蛋白片段与GLP-2衍生物之间的直接共价键合来提高体内稳定性的技术。另外,代替将白蛋白直接连接至GLP-2衍生物,可以使用通过将能够结合白蛋白的材料例如白蛋白特异性抗体或其抗体片段连接至GLP-2衍生物而间接地使白蛋白与GLP-2衍生物连接的技术;将与白蛋白具有结合亲和力的特定肽/蛋白质(例如,由亲合体AB经由白蛋白(Albumod)技术生产的白蛋白结合肽)与GLP-2衍生物连接的技术;和连接与白蛋白具有结合亲和力的脂肪酸等的技术,但该方法不限于此,并且可以使用使用白蛋白提高体内稳定性的任何技术或连接方法,但不限于其。

[0188] 为了增加体内半衰期,使用抗体或其抗体片段作为载体与GLP-2衍生物结合的技术可以包括在本发明的范围内。它可以是包括FcRn-结合区域的抗体或其抗体片段,或不包括FcRn-结合区域的任何抗体片段比如Fab等。可以包括由CovX Research LLC使用催化抗体的CovX-body技术,并且使用免疫球蛋白Fc区技术增加体内半衰期也可以包括在本发明的范围内。

[0189] FcRn-结合材料可以是免疫球蛋白Fc区。

[0190] 如本文所使用的,术语“免疫球蛋白Fc区”是指不包括免疫球蛋白的重链和轻链的可变区、重链恒定区1(CH1)和轻链恒定区(CL)的部分,并且可以进一步包括重链恒定区的铰链区。具体地,免疫球蛋白Fc区可以是包括部分或全部免疫球蛋白Fc区的片段,并且因此可以与术语“免疫球蛋白片段”或“免疫球蛋白恒定区”互换使用。

[0191] 天然Fc在重链恒定区1的Asn297位具有糖链,但源自大肠杆菌的重组Fc被表达为无糖基化形式。从Fc去除糖链导致Fc γ 受体1、2、3和补体(c1q)与重链恒定区1的结合亲和力降低,导致抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或补体依赖性细胞毒性的降低或丢失。

[0192] 如本文所使用的,术语“免疫球蛋白恒定区”是指不含轻链和重链的可变区、重链的恒定区1(CH1)和轻链的恒定区(CL)的免疫球蛋白片段,即由重链的恒定区2和3(CH2和CH3)(或包括重链的恒定区4(CH4))组成的Fc区。任选地,免疫球蛋白Fc区可以进一步包括在重链的恒定区中的铰链区。另外,本发明的免疫球蛋白恒定区可以是延伸的免疫球蛋白Fc区,其包括仅排除免疫球蛋白的重链和轻链的可变区以外的重链(CH1)的恒定区1和/或轻链(CL)的恒定区的一部分或整体,只要它显示出与天然免疫球蛋白恒定区的那些基本上相同或更优异的效果。进一步,本发明的免疫球蛋白恒定区可以缺少对应于CH2和/或CH3的氨基酸序列的显著部分。因此,本发明的免疫球蛋白恒定区可以包括(1)CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域,(2)CH1结构域和CH2结构域,(3)CH1结构域和CH3结构域,(4)CH2结构域和CH3结构域,(5)一个或多个恒定结构域和免疫球蛋白铰链区(或部分铰链区)的组合,或(6)重链的每个恒定结构域和the of the轻链的恒定区的二聚体。包括Fc区的免疫球蛋白恒定区为可以在体内代谢的生物可降解的多肽,使得它可以安全地用作药物载体。另外,在缀合物的产生、纯化和生产率方面,免疫球蛋白Fc区由于其相对低的分子量相对于整个免疫球蛋白分子是更有利的。进一步,因为没有Fab(由于一种抗体与另一种抗体的氨基酸序列不同,Fab展现出高度的非同质性),所以免疫球蛋白Fc单独提供具有显著增强的同质性的缀合物,并且降低诱导血液抗原性的可能性。

[0193] 另一方面,免疫球蛋白恒定区可以起源于人或动物,比如母牛、山羊、猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠、豚鼠等,并且具体地可以是人类起源的。另外,免疫球蛋白恒定区可以选自源自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM或其组合或杂交体的恒定区。具体地,恒定区源自血液中最丰富的IgG或IgM,并且最具体地源自已知提高配体结合蛋白的半衰期的IgG。在本发明中,免疫球蛋白Fc区可以由相同起源的结构域的单链免疫球蛋白组成的二聚体或多聚体。

[0194] 如本文使用的,术语“组合”意思是将编码相同起源的单链免疫球蛋白恒定区(优选地Fc区)的多肽连接至不同起源的单链多肽以形成二聚体或多聚体。即,可以从选自IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc的Fc片段中的两个或更多个片段来制备二聚体或多聚体。

[0195] 如本文使用的,术语“杂交”意思是编码不同起源的两个或更多个免疫球蛋白恒定

区的序列存在于免疫球蛋白恒定区(优选地,Fc区)的单链中。在本发明中,各种杂交形式是可能的。例如,杂交结构域可以由选自IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc和IgD Fc的CH1、CH2、CH3和CH4的一至四个结构域组成,并且可以进一步包括铰链区。

[0196] IgG可以分为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚类,并且本发明可以包括其组合或杂交体。优选的是IgG2和IgG4亚类,和最优选是IgG4的Fc区,其很少具有效应子功能,比如补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0197] 另外,免疫球蛋白恒定区的糖基化形式可以与天然形式相同或更大或更小,或者可以是去糖基化形式。增加或减少免疫球蛋白恒定区的糖基化或去糖基化可以通过典型的方法来实现,例如,通过使用化学方法、酶方法或使用微生物的基因工程方法。本文中,当去糖基化时,与免疫球蛋白恒定区结合的补体(C1q)变得显著减少,并且抗体依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性降低或去除,从而不会引起体内不必要的免疫应答。在该背景下,去糖基化或无糖基化的免疫球蛋白恒定区与药物载体的目的更加一致。相应地,免疫球蛋白Fc区更具体地可以是人源性IgG4的无糖基化的Fc区,即,人源性IgG4的无糖基化的Fc区。人源性Fc区相对于非人源性Fc区是更优选的,非人源性Fc区可能在人体内充当抗原并引起不良的免疫应答,比如产生针对抗原的新的抗体。

[0198] 进一步,本发明的免疫球蛋白恒定区不仅包括天然氨基酸序列,而且还包括其序列衍生物(突变体)。氨基酸序列衍生物意思是由于一个或多个氨基酸残基的缺失、插入、保守或非保守取代或其组合而使其具有与野生型氨基酸序列不同的氨基酸序列。例如,已知对连接重要的IgG Fc中第214至238位、第297至299位、第318至322位或第327至331位的氨基酸残基可以用作适合修饰的位点。可以使用各种衍生物,比如通过去除能够形成二硫键的位点,从天然Fc除去几个N-末端氨基酸,或将甲硫氨酸添加至天然Fc的N-末端而制备的那些。另外,可以消除补体结合(fixation)位点,例如C1q结合位点或ADCC位点,以去除效应子功能。在国际专利公开号WO 97/34631和WO 96/32478中公开了制备免疫球蛋白恒定区的序列衍生物的技术。

[0199] 不会改变分子活性的蛋白质或肽分子中的氨基酸取代是本领域众所周知的(H.Neurath,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,New York,1979)。最常见的取代在氨基酸残基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和Asp/Gly之间双向(in both directions)发生。任选地,可以通过磷酸化、硫酸化、丙烯酸化、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等来修饰氨基酸。

[0200] 上述免疫球蛋白恒定区衍生物可以是这样的衍生物,该衍生物具有与本发明的免疫球蛋白恒定区相当的生物活性,但是具有增强的免疫球蛋白恒定区对热、pH等的结构稳定性。进一步,免疫球蛋白恒定区可以由人或动物比如母牛、山羊、猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠、豚鼠等分离的天然类型获得,或者可以是由转化的动物细胞或微生物获得的它们的重组体或衍生物。在本文中,它们可以通过从人或动物生物体中分离出完整的免疫球蛋白并用蛋白水解酶处理它们而从天然免疫球蛋白中获得。木瓜蛋白酶将天然免疫球蛋白消化成Fab和Fc区,并且胃蛋白酶处理导致产生pF'c和F(ab)₂片段。这些片段可以经历例如尺寸排阻色谱法以分离Fc或pF'c。

[0201] 具体地,人源性免疫球蛋白恒定区可以从微生物获得的重组免疫球蛋白恒定

区。

[0202] 在本发明中,接头可以结合能够增加体内半衰期的材料的N-末端、C-末端、巯基(例如,半胱氨酸)、氨基(例如,赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺或组氨酸)和/或羟基;并且可以结合GLP-2衍生物的N-末端、C-末端、巯基(例如,半胱氨酸)、氨基(例如,赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺或组氨酸)、叠氮基(例如,6-叠氮基-赖氨酸)和/或羟基,但是这些不限于此。

[0203] 接头可以是肽基接头或非肽基接头。

[0204] 通过使用对蛋白酶具有抗性的聚合物作为肽基接头,可以类似于在能够增加GLP-2衍生物的体内半衰期的材料中保持GLP-2衍生物的血液半衰期。因此,可以不受限制地使用可用于本发明的非肽基接头,只要它是对体内蛋白酶具有抗性的非肽基聚合物。

[0205] 如本文所使用的,术语“非肽基聚合物”包括其中两个或更多个重复单元被缀合的生物相容性聚合物,并且与术语“非肽基接头”互换使用。重复单元通过任何共价键而不是肽键彼此连接。在本发明中,非肽基聚合物在其末端包括反应基团,并且因此可以通过与构成缀合物的其他组分反应来形成缀合物。这种非肽基聚合物可以具有两个末端或三个末端。

[0206] 如本文所使用的,术语“非肽基聚合物连接部分”是指缀合物中的构成元件,其通过将两端具有反应基团的非肽基聚合物通过非肽基聚合物的每个反应基团连接至免疫球蛋白Fc区和GLP-2衍生物而形成。

[0207] 在本发明的具体实施方式中,GLP-2缀合物可以是这样的缀合物,在该缀合物中免疫球蛋白Fc区和GLP-2衍生物通过非肽基聚合物连接在一起,该非肽基聚合物在两端包括可以连接至免疫球蛋白Fc区和GLP-2衍生物的反应基团。

[0208] 具体地,尽管不特别限于此,非肽基聚合物可以是选自下列中的一种:聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚乙氧基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基乙醚、生物可降解的聚合物比如聚乳酸(PLA)和聚乳酸-乙醇酸(PLGA)、脂质聚合物、几丁质、透明质酸、寡核苷酸及其组合。在更具体的实施方式中,非肽基聚合物可以是聚乙二醇,但不限于此。另外,本领域已知的上述材料的衍生物和在本领域技术水平上可容易产生的衍生物也属于本发明的范围。

[0209] 通过接头的结合可以是任何化学键,比如非共价化学键或共价化学键,但不限于此。

[0210] 可以不受限制地使用可用于本发明的非肽基聚合物,只要它是对体内蛋白酶具有抗性的聚合物。具体地,非肽基聚合物的分子量可以在大于0kDa至200kDa的范围中,具体地在1kDa至100kDa中,更具体地在1kDa至50kDa的范围中,进一步更具体地在1kDa至20kDa的范围中,仍进一步更具体地在3.4kDa至10kDa的范围中,和最具体地约3.4kDa,但不限于此。

[0211] 另外,与免疫球蛋白Fc区连接的载体,特别是本发明的非肽基聚合物,可以是一种聚合物或不同种聚合物的组合。

[0212] 在一个具体实施方式中,非肽基聚合物的两个末端可以结合至免疫球蛋白Fc区的巯基、氨基或羟基,并且可以结合至GLP-2衍生物的巯基、氨基、叠氮基或羟基。

[0213] 具体地,非肽基聚合物可以在两端包括能够结合免疫球蛋白Fc和GLP-2衍生物中的每个的反应基团。具体地,反应基团可以结合至半胱氨酸的巯基;位于赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺和/或组氨酸的N-末端处的氨基;和/或位于免疫球蛋白Fc区的C-末端并且可以结合

巯基的羟基；赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺和/或组氨酸的氨基；叠氮基-赖氨酸的叠氮基；和/或GLP-2衍生物的羟基，但是反应基团不限于此。

[0214] 更具体地，非肽基聚合物的反应基团可以是选自醛基、丙醛基、丁醛基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物中的一种或多种，但不限于此。

[0215] 在上文中，醛基的实例可以是丙醛基或丁醛基，但不限于此。

[0216] 在上文中，琥珀酰亚胺衍生物的实例可以是琥珀酰亚胺基羧甲基、琥珀酰亚胺基戊酸酯、琥珀酰亚胺基丁酸甲酯、琥珀酰亚胺基丙酸甲酯、琥珀酰亚胺基丁酸酯、琥珀酰亚胺基丙酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺或琥珀酰亚胺基碳酸酯，但不限于此。

[0217] 非肽基聚合物可以通过反应基团连接至免疫球蛋白Fc和GLP-2衍生物，以转化为非肽基聚合物接头部分。

[0218] 另外，通过经由醛键的还原烷基化产生的最终产物比通过酰胺键连接的最终产物稳定得多。醛反应基团在低pH下与N末端选择性地反应，并且可以在高pH例如pH 9.0下与赖氨酸残基形成共价键。

[0219] 本发明的非肽基聚合物的末端反应基团可以彼此相同或不同。非肽基聚合物可在两个末端均具有醛反应基团。可选地，非肽基聚合物可以在每个末端具有醛基和马来酰亚胺基，或者可以在每个末端具有醛基和琥珀酰亚胺反应基团，但不限于此。

[0220] 例如，非肽基聚合物在一个末端可以具有马来酰亚胺基，并在另一个末端可以具有醛基、丙醛基或丁醛基。作为另一个实例，非肽基聚合物在一个末端可以具有琥珀酰亚胺基，并在另一个末端可以具有丙醛基或丁醛基。

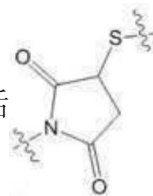
[0221] 当将在丙醛基末端具有羟基的聚(乙二醇)用作非肽基聚合物时，羟基可以通过已知的化学反应被各种反应基团激活，或具有商业上可获得的修饰反应性的官能团的聚(乙二醇)可用于制备本发明的缀合物。

[0222] 在一个具体实施方式中，可以将非肽基聚合物的反应基团连接至GLP-2衍生物的半胱氨酸残基，具体地连接至半胱氨酸的-SH基团，但不限于此。

[0223] 在使用马来酰亚胺-PEG-醛的情况下，可以通过硫醚键将马来酰亚胺基团连接至GLP-2衍生物的-SH基团，并且可以通过还原烷基化反应将醛基连接至免疫球蛋白Fc的-NH₂基团，但是本发明不限于此，并且这对应于一个实例。

[0224] 通过这种还原性烷基化将免疫球蛋白Fc区的N末端胺基通过具有-CH₂CH₂CH₂-结构的接头官能团与位于PEG的一个末端的氧原子连接，以形成-PEG-O-CH₂CH₂CH₂NH-免疫球蛋白Fc的结构。另外，通过硫醚键，可以形成其中PEG的一个末端与位于GLP-2衍生物的半胱氨酸

酸中的硫原子连接的结构。上述硫醚键可以包括



的结构。

[0225] 然而，本发明不特别限于上述实例，并且这对应于一个实例。

[0226] 另外，在该缀合物中，可以将非肽基聚合物的反应基团与位于免疫球蛋白Fc区的N-末端的-NH₂连接，但是这对应于一个实例。

[0227] 另外，在该缀合物中，可以通过GLP-2衍生物的C-末端将GLP-2衍生物的反应基团

与具有反应基团的非肽基聚合物连接,并且它对应于一个实例。

[0228] 如本文所使用的,出于本发明的目的,术语“C-末端”是指肽的羧基末端,并且是指能够与非肽基聚合物结合的位置。例如,C末端可以包括在C末端的最末端的氨基酸残基和在C末端附近的氨基酸残基这二者,并且具体地可以包括从末端开始的第1个至第20个氨基酸残基,但是C-末端不限于此。

[0229] 在一个具体实施方式中,可以通过遗传重组法进行能够延长GLP-2衍生物的体内半衰期的材料的连接。

[0230] 在一个具体实施方式中,本发明的GLP-2缀合物是这样的GLP-2缀合物,其中GLP-2衍生物和免疫球蛋白Fc区各自经由非肽基聚合物在非肽基聚合物的两个末端处共价连接。

[0231] 在本文中,非肽基聚合物可以选自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚乙氧基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯基乙醚、脂质聚合物、几丁质、透明质酸或其组合。

[0232] 具体地,在本发明的GLP-2衍生物中,可以在作为非肽基聚合物的接头与引入的巯基、氨基或叠氮基之间形成共价键。因此,当使用本发明的GLP-2衍生物时,可以获得其中结合位点被选择性调节的GLP-2缀合物。

[0233] 另外,因为在本发明的GLP-2衍生物中N-末端氨基被取代、缺失或修饰,所以非肽基聚合物与N-末端(体内活性的重要位点)的结合被阻止,并且从而获得其中结合位点被选择性调节的GLP-2缀合物。

[0234] 在本发明中,GLP-2缀合物与术语“GLP-2衍生物的缀合物”、“GLP-2衍生物的长效缀合物”或“长效GLP-2衍生物缀合物”互换使用。

[0235] 在又另一方面中,本发明提供了用于制备GLP-2缀合物的方法,包括将GLP-2衍生物连接至能够增加GLP-2衍生物的体内半衰期的材料。

[0236] GLP-2衍生物、能够增加GLP-2衍生物的体内半衰期的材料和GLP-2缀合物为如上所描述。

[0237] 具体地,该方法可以包括:

[0238] (a) 通过使具有两个或更多个末端反应基团的非肽基聚合物与GLP-2衍生物和载体(例如,免疫球蛋白Fc区)中的一种反应来制备复合体,使得该复合体具有附接至非肽基聚合物的一个末端的GLP-2衍生物或载体,和在另一个末端的反应性末端基团;和

[0239] (b) 通过使在步骤(a)中制备的复合体与没有附接至复合体的载体和GLP-2衍生物中的一种反应来制备缀合物,使得GLP-2衍生物和载体经由非肽基聚合物连接。

[0240] 上面的描述适用于非肽基聚合物、载体、GLP-2衍生物及其连接构造。

[0241] 如本文所使用的,术语“复合体”是指其中仅GLP-2衍生物和载体中的一种经由共价键连接至非肽基聚合物的中间体。可以将没有附接至复合体的GLP-2衍生物或载体连接至复合体的非肽基聚合物的末端,其中该末端没有连接至GLP-2衍生物或载体。

[0242] 在又另一方面中,本发明提供了具有增加的体内耐久性和稳定性的GLP-2的长效制剂,其包括GLP-2缀合物。

[0243] 同时,可以增加生物利用度或维持长效活性的制剂可以包括使用微粒的缓释制剂和使用PLGA、透明质酸、几丁质等的纳米颗粒。

[0244] 另外,可以增加生物利用度或维持长效活性的其他形式的制剂的实例可以包括植

入物、吸入剂、鼻制剂和贴剂。

[0245] 本发明的GLP-2缀合物可以维持常规GLP-2的体内活性,并且也可以增加GLP-2衍生物的血液半衰期,并显著增加肽的体内效力的持续时间,并且因此,GLP-2缀合物被用于治疗肠道疾病、肠道损伤和胃病。

[0246] 在又另一方面中,本发明提供了一种组合物,例如,包括GLP-2衍生物和/或GLP-2缀合物的药物组合物。

[0247] 药物组合物可以是用于预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病的药物组合物。

[0248] GLP-2衍生物和GLP-2缀合物为如上所述。

[0249] 如本文使用的,术语“肠道疾病”可以指短肠综合症、过敏性肠道疾病、炎症性肠道疾病、克罗恩氏病、结肠炎、大肠炎、胰腺炎、回肠炎、粘膜炎或肠道萎缩,但不限于此。

[0250] 如本文使用的,术语“胃病”可以指胃痉挛、胃炎、胃溃疡、十二指肠炎或十二指肠溃疡,但不限于此。

[0251] 如本文所使用的,术语“预防”是指通过施用药物组合物来抑制或延迟疾病发作的任何活性。术语“治疗”是指通过施用药物组合物来改善或有利地改变疾病症状的所有活性。

[0252] 根据本发明的药物组合物可以包括药学上可接受的载体。

[0253] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的”是指具有足够的量以表现出治疗效果而不会引起不良影响的特性,并且该特性可以由本领域技术人员基于医学领域众所周知的因素,比如疾病的种类,年龄,体重,健康状况,性别,患者的药物敏感性,施途径,施用方法,施用频率,治疗持续时间,同时混合或施用的药物(一种或多种)等容易地确定。

[0254] 药学上可接受的载体可以包括用于口服施用的粘结剂、助流剂、崩解剂、赋形剂、增溶剂、分散剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂、调味剂等;用于注射的缓冲剂、防腐剂、镇痛剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等,其可以组合使用;和用于局部施用的碱、赋形剂、润滑剂、防腐剂等。通过与上述药学上可接受的载体组合来制备各种各样的本发明的药物组合物制剂类型。例如,对于口服施用,组合物可以配制成片剂、锭剂、胶囊、酞剂、混悬剂、糖浆剂、薄片(wafer)等。对于注射,组合物可以配制成单剂量安瓿或多剂量容器。另外,组合物也可以配制成溶液、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂等。

[0255] 同时,合适的载体、赋形剂和稀释剂的实例可以包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油等。另外,组合物可以进一步包含填料、抗凝剂、润滑剂、保湿剂、调味剂、防腐剂等。

[0256] 另外,基于本发明的组合物的总重量,包含的本发明的GLP-2衍生物和/或GLP-2缀合物的量可以为0.001wt%至10wt%,但是没有特别限制。

[0257] 在又另一方面中,本发明提供了用于预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病的方法,包括将GLP-2衍生物、GLP-2缀合物和/或包含其的药物组合物作为活性成分施用至需要其的受试者。

[0258] GLP-2衍生物、GLP-2缀合物、药物组合物、肠道疾病、肠道损伤、胃病、预防和治疗

为如上所述。

[0259] 如本文所使用的,术语“受试者”是指怀疑患有肠道疾病、肠道损伤或胃病的受试者,并且怀疑患有该疾病的受试者是指患有该疾病或具有患上该疾病的风险的哺乳动物,包括人、大鼠、牛等,但是包括可以用本发明的GLP-2衍生物、GLP-2缀合物或包含其的组合物治疗的任何受试者,但不限于其。

[0260] 如本文所使用的,术语“施用”是指通过任何合适的方法将特定物质引入患者中,并且施用途径可以是能够将药物递送至靶组织的任何常规途径。这可以是腹膜内施用、静脉内施用、肌肉内施用、皮下施用、皮内施用、口服施用、局部施用、鼻内施用、肺内施用、直肠内施用等,但不限于此。然而,因为肽在口服施用时被消化,优选地将用于口服施用的组合物的活性成分包衣或配制用以防止在胃中降解,并且具体地,可以以可注射形式施用。另外,可以使用能够将活性成分运输到靶细胞中的某种装置来施用药物组合物。

[0261] 另外,本发明的药物组合物可以基于用作活性成分的药物类型,以及各种因素比如待治疗的疾病、施用途径、年龄、性别和患者体重、疾病的严重程度等来确定。由于本发明的药物组合物具有显著优异的体内持续时间,所以可以显著减少本发明的药物组合物的施用次数和施用频率。

[0262] 本发明的组合物的总有效剂量可以以单剂量施用至患者或可以根据分次治疗方案以多剂量长期施用。在本发明的药物组合物中,活性成分的含量可以根据疾病的严重程度而变化。具体地,本发明的GLP-2衍生物或GLP-2缀合物的总的日剂量可以是每1kg患者体重约0.0001mg至500mg。

[0263] 然而,除了药物组合物的施用途径和治疗频率以外,考虑各种因素包括患者的年龄、体重、健康状况、性别、疾病严重程度、饮食和排泄率来确定GLP-2衍生物或GLP-2缀合物的有效剂量。就此而言,本领域技术人员可以容易确定适合于本发明的药物组合物的特定用途的有效剂量。根据本发明的药物组合物对制剂以及施用途径和模式没有特别限制,只要它显示本发明的效果。

[0264] 在又另一方面中,本发明提供GLP-2衍生物或GLP-2缀合物在制备药物中的用途。

[0265] 在一个方面中,药物可用于预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病,但是不特别限于此。

[0266] 在又另一方面中,本发明提供了GLP-2衍生物或GLP-2缀合物在预防或治疗选自肠道疾病、肠道损伤和胃病的一种或多种疾病中的用途。

[0267] GLP-2衍生物、GLP-2缀合物、肠道疾病、肠道损伤和胃病为如上所述。

[0268] 实施例

[0269] 通过以下实施例进一步阐明本发明。然而,应该理解,这些实施例仅用于具体阐述本发明,而不应理解为它们以任何形式用于限制本发明。

[0270] 实施例1:制备CA-GLP-2KC-PEG (10K) -免疫球蛋白Fc缀合物或CA-GLP-2RC-PEG (10K) -免疫球蛋白Fc缀合物

[0271] 利用10kDa MAL-ALD PEG (具有10kDa的分子量的聚乙二醇,其中在每个末端的氢分别用3-[(3-N-马来酰亚胺基)丙酰基]氨基丙基和丙醛基修饰;NOF Inc.,日本)对CA-GLP-2KC或CA-GLP-2RC (CPC, Chinese Peptide Co, 中国) 的第34个半胱氨酸残基聚乙二醇化,该反应进行1至3小时,CA-GLP-2KC或CA-GLP-2RC与的摩尔比为1:1至2,并且肽浓度为

1mg/mL至3mg/mL。在本文中在50mM Tris (pH 7.5) 和异丙醇的混合溶剂中进行反应。利用氯化钾和含有乙醇和柠檬酸钠的缓冲液 (pH 2.0) 的浓度梯度,使用SPSepharose High Performance column (GE,U.S.A.) 从反应溶液纯化单-聚乙二醇化CA-GLP-2KC或单-聚乙二醇化CA-GLP-2RC。

[0272] 其后,该反应在2°C至8°C下进行12至20小时,纯化的单-聚乙二醇化CA-GLP-2KC或单-聚乙二醇化CA-GLP-2RC和免疫球蛋白Fc片段的摩尔比为1:2至1:6,并且总的蛋白质浓度为30mg/mL至35mg/mL。在本文中,该反应溶液含有20mM氰基硼氢化钠(NaCNBH₃),其作为还原剂被添加至100mM磷酸钾缓冲液 (pH 6.0) 和异丙醇中。

[0273] 在反应完成之后,通过使用双-Tris缓冲液 (pH 6.5) 和氯化钠的浓度梯度应用于Source15Q column (GE,U.S.A.),并通过使用硫酸铵和柠檬酸钠 (pH 5.0至5.2) 的浓度梯度应用于Source 15ISO column (GE,U.S.A.),从反应溶液纯化CA-GLP-2RC (10K PEG) 衍生物 (CA-GLP-2KC-PEG (10K) -免疫球蛋白Fc) 的长效缀合物和CA-GLP-2RC (10K PEG) 衍生物 (CA-GLP-2RC-PEG (10K) -免疫球蛋白Fc) 的长效缀合物,其中CA-GLP-2KC或CA-GLP-2RC通过PEG与免疫球蛋白Fc共价连接。作为HPLC反向分析的结果,缀合物的纯度分别确定为92.9%和95.6%,并将其结果显示在图1中。

[0274] 实施例2:制备CA-GLP-2RK-PEG (3.4K或10K) -免疫球蛋白Fc缀合物

[0275] 利用3.4kDa或10kDa ALD (2) PEG (具有3.4kDa的分子量的聚乙二醇,其中在每个末端的氢用丙醛基修饰;NOF Inc.,日本)对CA-GLP-2RK (CPC,Chinese Peptide Co.,中国) 的第34个赖氨酸残基聚乙二醇化,将该反应在2°C至8°C下进行4至16小时,CA-GLP-2RK与PEG的摩尔比为1:5至1:20,并且肽浓度为5mg/mL至10mg/mL。在本文中,反应在20mM HEPES (pH 7.5) 和乙醇中进行,并且通过添加20mM氰基硼氢化钠作为还原剂进行。利用氯化钾和含有乙醇和柠檬酸钠的缓冲液 (pH 2.0) 的浓度梯度,通过使用Source15S column (GE,U.S.A.) 从反应溶液纯化单-聚乙二醇化CA-GLP-2RK。

[0276] 其后,根据与实施例1中相同的反应和纯化条件来制备和纯化该纯化的单-聚乙二醇化CA-GLP-2RK和免疫球蛋白Fc的缀合物。作为HPLC反相分析的结果,CA-GLP-2RK (3.4K PEG) 衍生物 (CA-GLP-2RK-PEG (3.4K) -免疫球蛋白Fc) 的长效缀合物和CA GLP-2RK (10K PEG) 衍生物 (CA-GLP-2RK-PEG (10K) -免疫球蛋白Fc) 的长效缀合物 (其中CA-GLP-2RK通过PEG与免疫球蛋白Fc共价连接) 的纯度分别为94.3%和92.6%,并将其结果显示在图1中。

[0277] 实施例3:制备CA-GLP-2KK-PEG (10K) -免疫球蛋白Fc缀合物和CA-GLP-2K_{AZ}K-PEG (10K) -免疫球蛋白Fc缀合物

[0278] 通过根据实施例2的方法使用CA-GLP-2KK和CA-GLP-2K_{AZ}K,制备和纯化CA GLP-2KK (10K PEG) 衍生物 (CA-GLP-2KK-PEG (10K) -免疫球蛋白Fc) 的长效缀合物和CA GLP-2K_{AZ}K (10K PEG) 衍生物的长效缀合物,其中CA-GLP-2KK或CA-GLP-2K_{AZ}K通过PEG与免疫球蛋白Fc共价连接。

[0279] 实施例4:证实GLP-2衍生物及其长效缀合物的体外活性

[0280] 为了测量在先前实施例中获得的GLP-2衍生物和GLP-2衍生物的长效缀合物的活性,使用其中GLP-2受体被转化的细胞系来测量体外细胞活性。该细胞系是一种已被转化为在中国仓鼠卵巢 (CHO) -K1中表达人GLP-2受体的细胞系,并且因此适用于测量GLP-2的活性 (DiscoverX,U.S.A.)。

[0281] 为了测量GLP-2衍生物及其长效缀合物的活性,对人GLP-2和替度鲁肽(Shire)进行从166.7nM到0.0028nM的3倍连续稀释;对GLP-2衍生物进行从500nM至0.0085nM的3倍连续稀释;并对GLP-2衍生物的长效缀合物进行从3000nM至0.0508nM的3倍连续稀释。从表达人GLP-2受体的培养的CHO-K1细胞除去培养液,并且然后分别以5 μ L的量将每种连续稀释的材料添加到细胞中。其后,添加含有cAMP抗体的缓冲液(5 μ L),并且然后在室温下进行培养,持续15分钟。然后,向其添加包含细胞裂解缓冲液的检测混合物(10 μ L)以溶解细胞,并在室温下反应60分钟。在完成反应之后,将细胞裂解液应用到LANCE cAMP试剂盒(PerkinElmer, U.S.A.)以经由累积的cAMP来计算EC₅₀值,并将值彼此比较。表2中显示了与人GLP-2相比的相对滴度。

[0282] [表2]GLP-2衍生物的相对的滴度比

GLP-2 衍生物	与人 GLP-2 相比的体外活性(%)	GLP-2 衍生物的缀合物	与人 GLP-2 相比的体外活性 (%)
替度鲁肽	147.5	-	-
CA GLP-2 KC	149.3	CA GLP-2 KC (10K PEG)衍生物的长效缀合物	9.7
CA GLP-2 KK	205.6	CA GLP-2 KK(10K PEG)衍生物的长效缀合物	ND
CA GLP-2 RC	120.0	CA GLP-2 RC(10K PEG)衍生物的长效缀合物	46.0
CA GLP-2 RK	333.2	CA GLP-2 RK(10K PEG)衍生物的长效缀合物	52.0
		CA GLP-2 RK(3.4K PEG)衍生物的长效缀合物	52.6

[0284] ND=未确定

[0285] 已经证实,如上所述制备的新型GLP-2衍生物及其长效缀合物具有激活GLP-2受体的功能,并且GLP-2衍生物的相对滴度显著优于人GLP-2。另外,因为证实与SEQ ID NO:2的GLP-2衍生物(CA GLP-2KC)的长效缀合物相比,SEQ ID NO:4的GLP-2衍生物(CA GLP-2RK)的长效缀合物和SEQ ID NO:6的GLP-2衍生物(CA GLP-2RC)的长效缀合物具有更高的活性,这些可以用作用于治疗期望的疾病材料。

[0286] 实施例5:证实SD大鼠中GLP-2衍生物的长效缀合物的药代动力学

[0287] 在正常大鼠中比较了GLP-2衍生物的长效缀合物的药代动力学。

[0288] 将8-周大的正常大鼠分为以下几组:施用CA GLP-2KC (10K PEG) 衍生物的长效缀合物(2.52mg/kg)的组、施用CA GLP-2RC (10K PEG) 衍生物的长效缀合物(2.52mg/kg)的组、施用CA GLP-2RK (10K PEG) 衍生物的长效缀合物(2.52mg/kg)的组和施用CA GLP-2RK (3.4K PEG) 的长效缀合物(2.52mg/kg)的组。将测试材料一次皮下注射到各组的正常大鼠中(3只大鼠/组)。其后,对于施用CA GLP-2KC (10K PEG) 衍生物的长效缀合物的组,通过在1、4、8、24、48、72、96、120、144和168小时从尾骨静脉收集血液样品来获得全血。另外,对于施用CA GLP-2衍生物的长效缀合物的其他组,通过在1、4、8、24、48、72、96、120、144、168、192、216、

240、264、288、312和336小时从尾骨静脉收集血液样品来获得全血。将全血置于1.5mL微管中,在室温下以5,000rpm离心10分钟,并且然后分离血清,并在-20°C下存储。使用ELISA分析方法来定量每组中存储的血清的浓度。对于CA GLP-2衍生物的长效缀合物,将生物素标记的GLP-2多克隆抗体(Phoenix Pharmaceuticals, #B-028-14)与涂布有Streptavidin (Roche, #11645692001)的平板结合,并且然后与血清反应1小时。在洗涤之后,向其添加抗人IgG4-HPR(Alpha Diagonosis, #10124)并且使其在室温下反应1小时。其后,使用TMB试剂对所得物进行显色反应,并在450nm的波长下测量吸光度。使用血清浓度计算其药代动力学参数。

[0289] 结果证实,在CA GLP-2衍生物的所有长效缀合物中展现相似的AUC和半衰期。具体地,对于CA GLP-2RK (3.4K PEG) 衍生物的长效缀合物,由于短的PEG引起其半衰期实际上缩短,但是AUC没有显著差异。在图2和表3中显示了其结果。

[0290] [表3]GLP-2衍生物的长效缀合物的药代动力学参数

GLP-2 衍生物	AUC _{持续} (ng×hr/mL)	C _{最大} (ng/mL)	T _{最大} (hr)	T _{1/2} (hr)	MRT _{持续} (hr)
CA GLP-2 KC (10K PEG)衍生物的长效缀合物	1138923.0 ±110855.6	11745.9 ±957.4	48.0 ±0.0	42.2 ±3.6	74.7 ±2.0
CA GLP-2 RC (10K PEG)衍生物的长效缀合物	1384949.9 ±186817.6	13350.4 ±3611.4	26.7 ±20.1	54.4 ±6.9	88.9 ±9.4
CA GLP-2 RK(10K PEG)衍生物的长效缀合物	1329137.5 ±215962.4	12085.8 ±1970.7	32.0 ±13.9	58.6 ±1.8	86.9 ±3.7
CA GLP-2 RK(3.4K PEG)衍生物的长效缀合物	1058834.3 ±177030.1	12607.7 ±4030.1	13.3 ±9.2	37.0 ±2.2	71.7 ±11.2

[0292] -AUC_{持续}:PK参数,代表体内的药物暴露水平,并且与药物的效力/毒性密切相关(为了使药物在体内有效,应该考虑一定的体内药物暴露水平;过量的体内药物暴露水平可能表明有毒性作用。

[0293] -MRT_{持续}:这表示药物的平均停留时间,其为直到药物在体内消失的平均时间。较高的MRT值表示药物在体内保留长时间段,并且因此可以被评估为与具有较低的MRT值的药物相比,具有更长的持续时间。

[0294] 实施例6:比较在SD大鼠中GLP-2衍生物的长效缀合物和替度鲁肽之间的药代动力学

[0295] 比较了替度鲁肽和GLP-2衍生物的长效缀合物的药代动力学。将8-周大的正常大鼠分为施用替度鲁肽(2.5mg/kg)的组和施用CA GLP-2RK (3.4K PEG) 衍生物的长效缀合物的组。将测试材料一次皮下注射到各组中的正常大鼠中(3只大鼠/组)。其后,对于施用替度鲁肽的组,通过在0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8和24小时从尾骨静脉收集血液样品来获得全血;并且对于施用CA GLP-2RK衍生物的长效缀合物的组,通过在4、8、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240、264、288、312和336小时从尾骨静脉收集血液样品来获得全血。将全血置于1.5mL微管中,在室温下以5,000rpm离心10分钟,并且然后分离血清并在-20°C下存储。使用ELISA分析方法来定量每组中存储的血清的浓度。对于替度鲁肽,使用了GLP-2ELIS试剂盒(Alpco, #48-GP2HU-E01.1)。对于CA GLP-2RK衍生物的长效缀合物,将

生物素标记的GLP-2多克隆抗体(Phoenix Pharmaceuticals,#B-028-14)与涂布有链霉亲和素(Roche,#11645692001)的平板结合,并且然后与血清反应1小时。在洗涤之后,向其添加抗人IgG4-HPR(Alpha Diagnosis,#10124)并使其在室温下反应1小时。其后,使用TMB试剂对所得物进行显色反应,并在450nm的波长下测量吸光度。使用血清浓度计算其药代动力学参数。

[0296] 结果证实,与替度鲁肽的AUC和半衰期相比,CA GLP-2RK衍生物的长效缀合物的AUC和半衰期均显著增加。在图3和表4中显示了其结果。

[0297] [表4]替度鲁肽和GLP-2衍生物的长效缀合物的药代动力学参数

GLP-2 衍生物	AUC _{持续} (ng×hr/mL)	C _{最大} (ng/mL)	T _{最大} (hr)	T _{1/2} (hr)	MRT _{持续} (hr)
[0298] 替度鲁肽	2596.6 ±580.7	1675.5 ±744.0	0.7 ±0.3	0.6 ±0.1	1.4 ±0.1
CA GLP-2 RK 衍生物的长效缀合物	199738.9 ±28544.5	2442.1 ±392.6	24.0 ±0.0	42.3 ±3.4	71.1 ±3.1

[0299] 实施例7:证实在正常小鼠中GLP-2衍生物的长效缀合物增加体内肠道重量的作用

[0300] 在正常小鼠中研究了替度鲁肽和GLP-2衍生物的长效缀合物增加体内肠道重量的作用。

[0301] 将7-周大的C57BL/6小鼠分为施用媒介物的组、施用替度鲁肽(7.5&15nmol/kg/BID)的组和施用CA GLP-2RK(3.4K PEG)衍生物(4.15、7.5、15、30nmol/kg/Q2D)的长效缀合物的组。每组设置五只小鼠,并在施用13天之后进行尸检。灌注小肠,并测量小肠的重量和小肠内绒毛的长度。

[0302] 结果,在替度鲁肽和CA GLP-2RK衍生物的长效缀合物中,小肠的重量以剂量依赖性方式增加(图4A),并且基于肠道重量的增加与绒毛长度的增加相关的事实可以推断出小肠的重量的增加是由于绒毛长度的增加所致(图4B)。已知展现出替度鲁肽的最大效力的高剂量施用组(15nmol/kg/BID)与施用CA GLP-2RK衍生物的长效缀合物的组中的低剂量施用组(4.15nmol/kg/Q2D)相似,并且证实CA GLP-2RK衍生物的长效缀合物具有以剂量依赖性方式超过替度鲁肽的最大效力的作用。在图4中显示了其结果。

[0303] 根据前述,本发明所属领域普通技术人员将能够理解,在不修改本发明的技术概念或基本特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。在这方面,本文公开的示例性实施方式仅用于说明目的,并且不应被解释为限制本发明的范围。相反,本发明旨在不仅覆盖示例性实施方式,而且覆盖可以包括在由所附权利要求书限定的本发明的精神和范围内的各种替代方案、修改、等效物和其他实施方式。

[0001] <110> 韩美药品株式会社
 [0002] <120> 胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 衍生物的长效缀合物
 [0003] <130> OPA18231
 [0004] <150> KR 10-2017-0126577
 [0005] <151> 2017-09-28
 [0006] <160> 9
 [0007] <170> KoPatentIn 3.0
 [0008] <210> 1
 [0009] <211> 33
 [0010] <212> PRT
 [0011] <213> 智人
 [0012] <400> 1
 [0013] His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 [0014] 1 5 10 15
 [0015] Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 [0016] 20 25 30
 [0017] Asp
 [0018] <210> 2
 [0019] <211> 34
 [0020] <212> PRT
 [0021] <213> 人工序列
 [0022] <220>
 [0023] <223> GLP-2衍生物
 [0024] <220>
 [0025] <221> MISC_FEATURE
 [0026] <222> (1)
 [0027] <223> Xaa是咪唑基乙酰基去组氨酸
 [0028] <400> 2
 [0029] Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 [0030] 1 5 10 15
 [0031] Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 [0032] 20 25 30
 [0033] Asp Cys
 [0034] <210> 3
 [0035] <211> 34
 [0036] <212> PRT
 [0037] <213> 人工序列
 [0038] <220>

[0039] <223> GLP-2衍生物
 [0040] <220>
 [0041] <221> MISC_FEATURE
 [0042] <222> (1)
 [0043] <223> Xaa是咪唑基乙酰基去组氨酸
 [0044] <400> 3
 [0045] Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 [0046] 1 5 10 15
 [0047] Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 [0048] 20 25 30
 [0049] Asp Lys
 [0050] <210> 4
 [0051] <211> 34
 [0052] <212> PRT
 [0053] <213> 人工序列
 [0054] <220>
 [0055] <223> GLP-2衍生物
 [0056] <220>
 [0057] <221> MISC_FEATURE
 [0058] <222> (1)
 [0059] <223> Xaa是咪唑基乙酰基去组氨酸
 [0060] <400> 4
 [0061] Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 [0062] 1 5 10 15
 [0063] Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Arg Ile Thr
 [0064] 20 25 30
 [0065] Asp Lys
 [0066] <210> 5
 [0067] <211> 34
 [0068] <212> PRT
 [0069] <213> 人工序列
 [0070] <220>
 [0071] <223> GLP-2衍生物
 [0072] <220>
 [0073] <221> MISC_FEATURE
 [0074] <222> (1)
 [0075] <223> Xaa是咪唑基乙酰基去组氨酸
 [0076] <220>
 [0077] <221> MISC_FEATURE

[0078] <222> (34)
 [0079] <223> Xaa是6-叠氮基赖氨酸
 [0080] <400> 5
 [0081] Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 [0082] 1 5 10 15
 [0083] Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 [0084] 20 25 30
 [0085] Asp Xaa
 [0086] <210> 6
 [0087] <211> 34
 [0088] <212> PRT
 [0089] <213> 人工序列
 [0090] <220>
 [0091] <223> GLP-2衍生物
 [0092] <220>
 [0093] <221> MISC_FEATURE
 [0094] <222> (1)
 [0095] <223> Xaa是咪唑基乙酰基去组氨酸
 [0096] <400> 6
 [0097] Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 [0098] 1 5 10 15
 [0099] Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Arg Ile Thr
 [0100] 20 25 30
 [0101] Asp Cys
 [0102] <210> 7
 [0103] <211> 34
 [0104] <212> PRT
 [0105] <213> 人工序列
 [0106] <220>
 [0107] <223> GLP-2衍生物
 [0108] <220>
 [0109] <221> MISC_FEATURE
 [0110] <222> (1)
 [0111] <223> Xaa是咪唑基乙酰基去组氨酸
 [0112] <220>
 [0113] <221> MISC_FEATURE
 [0114] <222> (2)
 [0115] <223> Xaa是Aib(2-氨基异丁酸)
 [0116] <400> 7

[0117] Xaa Xaa Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 [0118] 1 5 10 15
 [0119] Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 [0120] 20 25 30
 [0121] Asp Cys
 [0122] <210> 8
 [0123] <211> 34
 [0124] <212> PRT
 [0125] <213> 人工序列
 [0126] <220>
 [0127] <223> GLP-2衍生物
 [0128] <220>
 [0129] <221> MISC_FEATURE
 [0130] <222> (2)
 [0131] <223> Xaa是Aib(2-氨基异丁酸)
 [0132] <400> 8
 [0133] His Xaa Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 [0134] 1 5 10 15
 [0135] Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 [0136] 20 25 30
 [0137] Asp Cys
 [0138] <210> 9
 [0139] <211> 34
 [0140] <212> PRT
 [0141] <213> 人工序列
 [0142] <220>
 [0143] <223> GLP-2衍生物
 [0144] <220>
 [0145] <221> MISC_特征
 [0146] <222> (1)
 [0147] <223> Xaa = 组氨酸、咪唑基乙酰基去组氨酸、去氨基组氨酸、 β -羟基咪唑基丙酰基去组氨酸、N-二甲基组氨酸或 β -羧基咪唑基丙酰基去组氨酸
 [0148] <220>
 [0149] <221> MISC_特征
 [0150] <222> (2)
 [0151] <223> Xaa是丙氨酸、甘氨酸或Aib(2-氨基异丁酸)
 [0152] <220>
 [0153] <221> MISC_特征
 [0154] <222> (30)

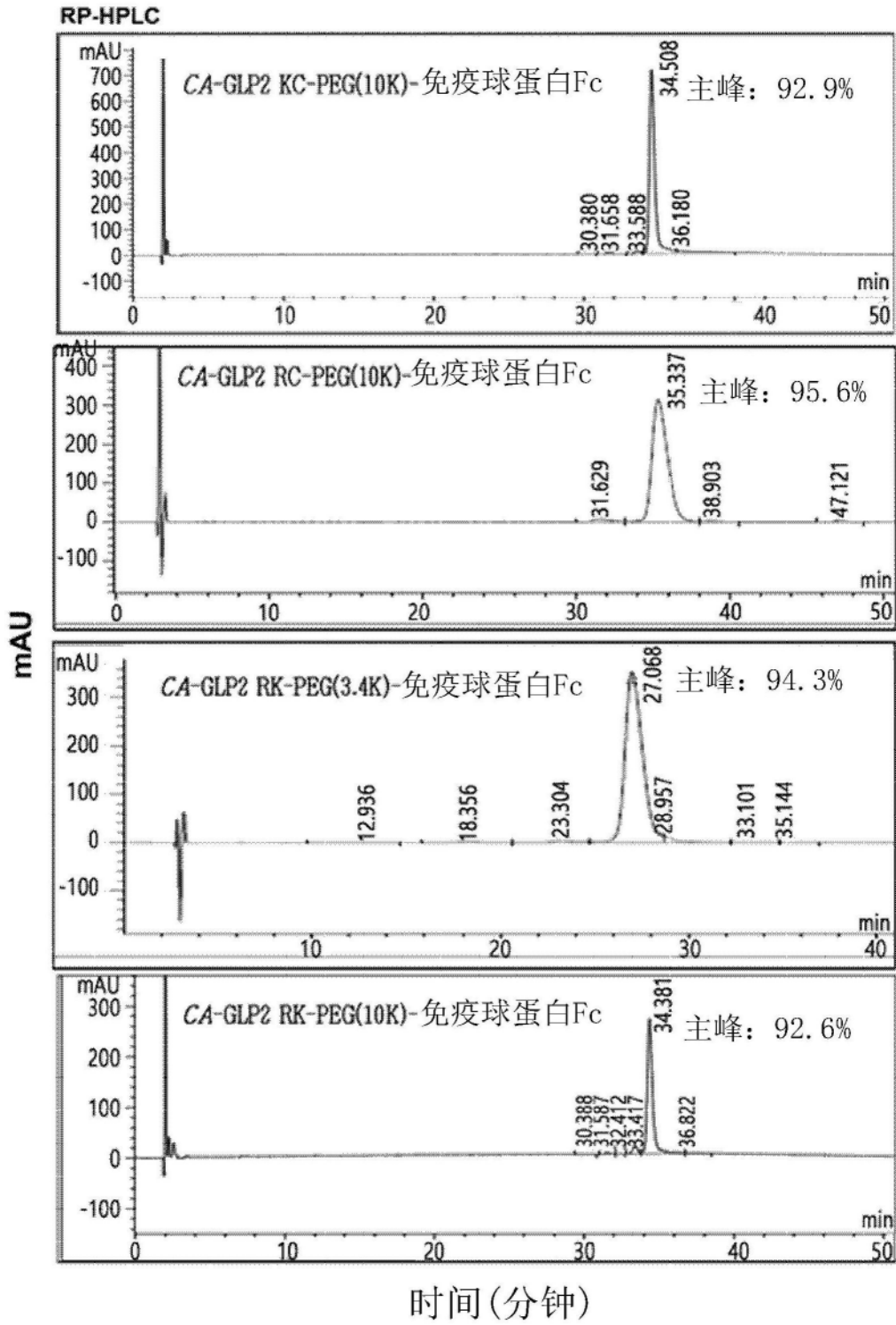


图1

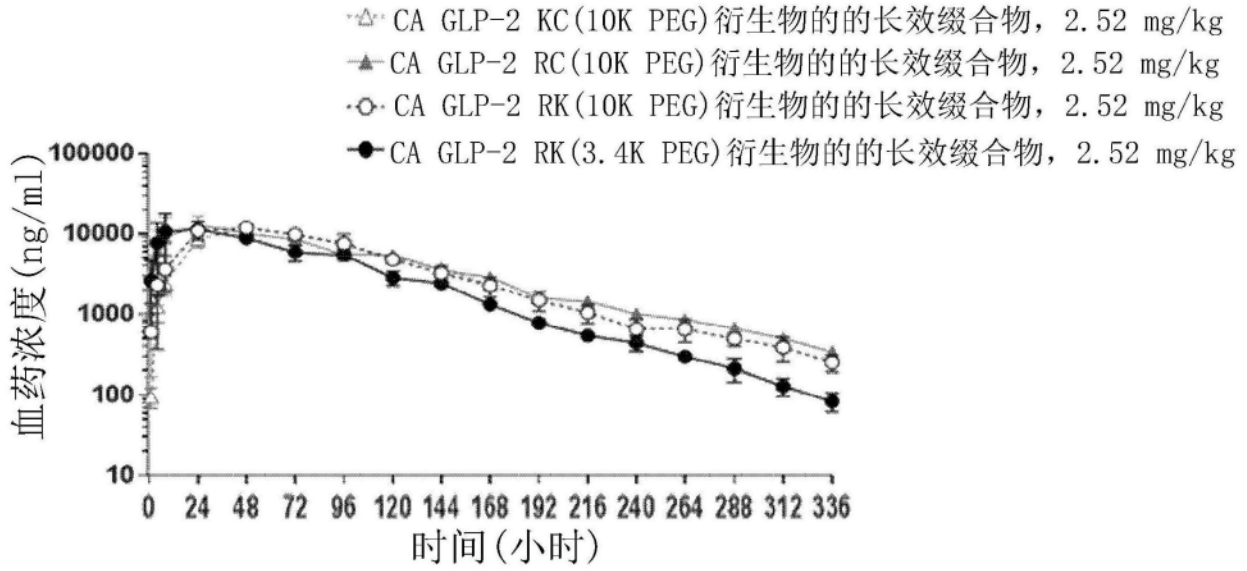


图2

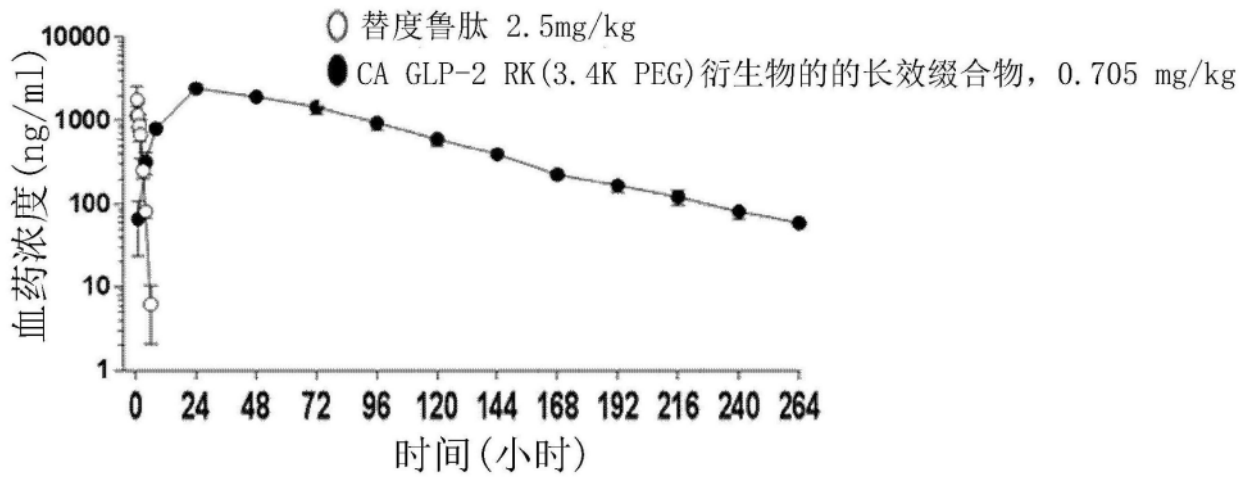


图3

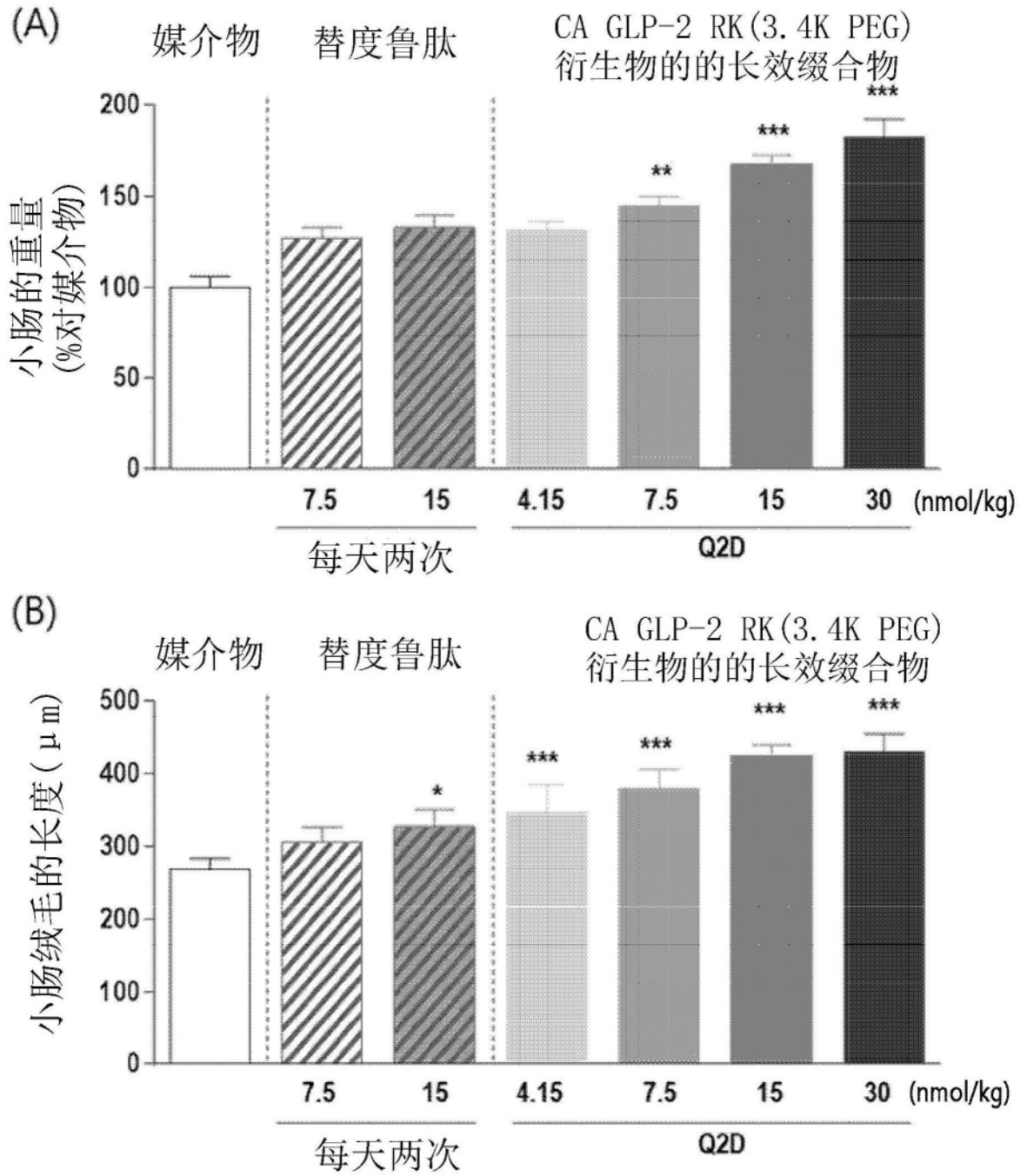


图4