



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월04일

(11) 등록번호 10-2681143

(24) 등록일자 2024년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/605 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/605 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0116327

(22) 출원일자 2018년09월28일

심사청구일자 2021년09월03일

(65) 공개번호 10-2019-0037181

(43) 공개일자 2019년04월05일

(30) 우선권주장

1020170126577 2017년09월28일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130078634 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한미약품 주식회사

경기도 화성시 팔탄면 무하로 214

(72) 발명자

최재혁

경기도 화성시 동탄기흥로 550

김민영

경기도 화성시 동탄기흥로 550

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 19 항

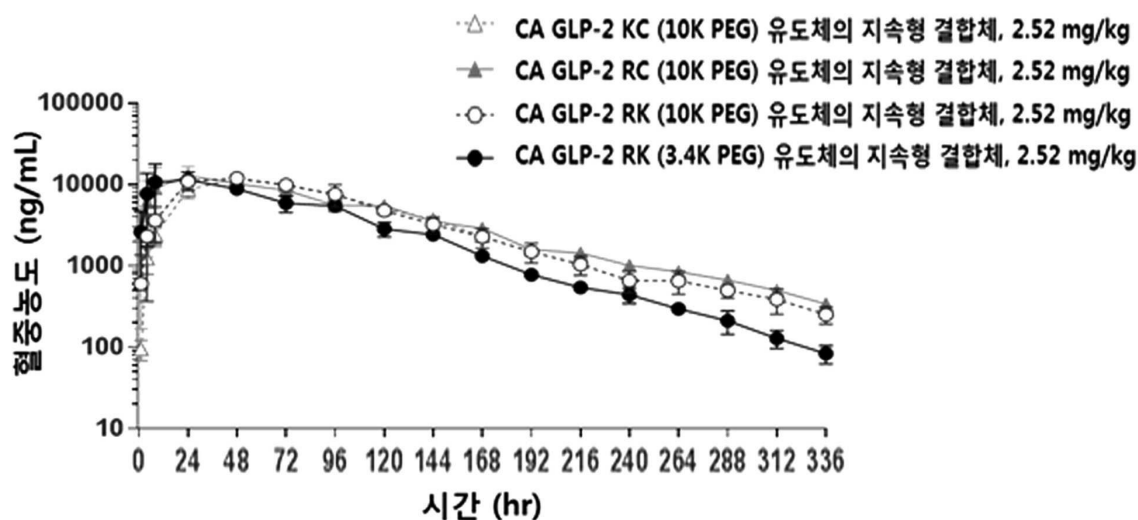
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 유도체의 지속형 결합체

(57) 요약

본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 유도체, 이의 결합체 및 이들의 이용에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 유도체 및 이의 결합체의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 2317/53 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

최인영

경기도 화성시 동탄기흥로 550

정성엽

경기도 화성시 동탄기흥로 550

명세서

청구범위

청구항 1

글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 유도체와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 각각 공유결합으로 연결되어 있는 GLP-2 결합체로서,

상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고,

상기 GLP-2 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 GLP-2 결합체:

[일반식 1]

$X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 9)

여기서,

X_1 은 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;

X_2 는 글라이신이며;

X_{30} 은 아르지닌이고;

X_{34} 는 라이신임.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 4의 아미노산 서열인 GLP-2 결합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 GLP-2 유도체의 하이드록실기, 티올기, 아미노기 또는 아지드기에 결합된 GLP-2 결합체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화됨을 특징으로 하는 GLP-2 결합체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지영역을 포함하는 GLP-2 결합체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 GLP-2 결합체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜이고, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 GLP-2 결합체.

청구항 12

하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 GLP-2 유도체:

[일반식 1]

$X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 9)

여기서,

X_1 은 이미다조아세틸데스히스티딘, 데스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일데스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일데스히스티딘이고;

X_2 는 글라이신이며;

X_{30} 은 아르지닌이고;

X_{34} 는 라이신임.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는, GLP-2 유도체.

청구항 18

제12항 또는 제17항 중 어느 한 항의 GLP-2 유도체를 코딩하는 분리된 핵산.

청구항 19

제18항에 따른 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 20

제19항에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 형질전환체.

청구항 21

하기 단계를 포함하는 제12항 또는 제17항 중 어느 한 항의 GLP-2 유도체를 제조하는 방법:

- a) 제12항 또는 제17항 중 어느 한 항의 GLP-2 유도체를 코딩하는 핵산을 포함하는 형질전환체를 배양하여 GLP-2 유도체를 발현시키는 단계; 및
- b) 발현된 GLP-2 유도체를 분리 및 정제하는 단계.

청구항 22

- (a) 2 이상의 말단 반응기를 가지는 비펩타이드성 중합체와 제12항 또는 제17항 중 어느 한 항의 GLP-2 유도체 또는 면역글로불린 Fc 영역 중 하나를 반응시켜, GLP-2 유도체 또는 면역글로불린 Fc 영역이 한쪽 말단에 부착되고, 다른 쪽 말단에 반응기를 가지는, 연결체를 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계에서 제조된 연결체와 면역글로불린 Fc 영역 또는 GLP-2 유도체 중 연결체에 부착되지 않은 다른 하나를 반응시켜, GLP-2 유도체와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된, 결합체를 제조하는 단계를 포함하는 GLP-2 결합체의 제조방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 비펩타이드성 중합체는 알데히드 그룹, 프로피온알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 반응기를 갖는 것인 GLP-2 결합체의 제조방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 석시니미드 유도체는 석시니미딜 카복시메틸, 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석시니미드인 또는 석시니미딜 카보네이트인 GLP-2 결합체의 제조방법.

청구항 25

제1항 및 제6항 내지 제11항 중 어느 한 항의 GLP-2 결합체, 또는 제12항 또는 제17항 중 어느 한 항의 GLP-2

유도체를 포함하는, 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 장질환은 단장증후군, 과민성 장질환, 염증성 장질환, 크론씨병, 결장염, 대장염, 췌장염, 회장염, 점막염 또는 장 위축인 약학적 조성물.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 위질환은 위경련, 위염, 위궤양, 십이지장염, 또는 십이지장궤양인 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 유도체, 이의 결합체 및 이들의 이용에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 유도체 및 이의 결합체의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)는 섭취된 영양분에 반응하여 소장의 L-세포에서 생성되는 33개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬이다. GLP-2는 소장, 대장에서 점막 성장을 유도하고, 장세포와 선화(crypt) 세포의 성장 촉진 및 세포사멸(apoptosis)을 억제한다. 또한 GLP-2는 소장에서 영양분의 흡수를 증가시키고 장 투과성을 감소시킨다. 위 배출(Gastric emptying) 및 위산 분비를 억제하고, 장 혈류 속도를 증가시키고, 장 평활근을 이완시킨다. GLP-2는 에너지 흡수 및 보호, 장 세포 기능의 활성화 등의 특징으로 다양한 장 질환과 장손상의 실험모델에서 치료제로서 유망한 가능성을 보여왔다.

[0004] 그런데 GLP-2를 약물로 상용화하기 위하여서는 먼저 해결해야 할 문제점들이 있다. GLP-2와 같은 펩타이드는 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 체내 단백질 가수 분해 효소에 의해 분해되어 그 활성을 잃으며, 또한 상대적으로 크기가 작아 신장을 통해 쉽게 제거되기 때문에 약리 성분으로 펩타이드를 포함하는 의약품의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 펩타이드 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나 펩타이드 약물은 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되며, 따라서 생리활성 펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사하게 되는데, 이는 환자의 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 다양한 시도가 있어왔다. 그 중 하나로 펩타이드 약물의 생체막 투과도를 증가시켜 구강 또는 비강을 통한 흡입으로 펩타이드 약물을 체내로 전달하려는 시도가 있었다. 그러나 이러한 방법은 주사제에 비해 펩타이드의 체내 전달 효율이 낮으며, 따라서 아직까지는 펩타이드 약물의 체내 활성을 요구되는 조건으로 유지하는데 어려움이 많다.

[0005] 특히, GLP-2는 생리 활성 반감기가 7분 이하로 매우 짧다. 이는 디펩티딜 펩티다아제 IV(이하 DPPIV)에 의한 GLP-2의 아미노산 2번(Ala)와 3번(Asp) 사이의 절단에 의한 GLP-2의 역가 상실에 기인한다(Bolette H. et al., The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000, 85(8): 2884-2888). 이러한 GLP-2의 생리 활성 반감기를 증가시키기 위하여 주로 아미노산 치환을 통한 해결 시도가 있어왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 GLP-2 유도체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 GLP-2 유도체를 코딩하는 분리된 핵산, 이를 포함하는 재조합 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 GLP-2 유도체 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 GLP-2 유도체 및 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이 연결

된, GLP-2 결합체를 제공하는 것이다.

- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 GLP-2 결합체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 GLP-2 결합체를 포함하는, 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 GLP-2 지속성 제제를 제공한다.
- [0013] 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 GLP-2 유도체 및/또는 GLP-2 결합체를 포함하는 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 GLP-2 유도체, GLP-2 결합체 또는 이를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 약제의 제조에 있어 상기 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 용도를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료에 있어 상기 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본 발명의 하나의 양태는 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2) 유도체와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 각각 공유결합으로 연결되어 있는 GLP-2 결합체로서,
- [0019] 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, GLP-2 결합체이다.
- [0020] 하나의 구체예로서, 상기 GLP-2 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 GLP-2 결합체를 특징으로 한다:
- [0021] [일반식 1]
- [0022] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 9)
- [0023] 여기서,
- [0024] X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, N -디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;
- [0025] X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;
- [0026] X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;
- [0027] X_{34} 는 부존재하거나, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘, 6-아지도라이신, 또는 시스테인이고;
- [0028] 다만, 일반식 1의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 제외한다.
- [0029] 다른 구체예로서, 상기 GLP-2 유도체는 일반식 1에서 (1) X_2 가 글라이신이거나, (2) X_{30} 이 아르지닌이거나, 또는 (3) X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌인 GLP-2 결합체를 특징으로 한다.
- [0030] 다른 구체예로서, 상기 GLP-2 유도체는 일반식 1에서
- [0031] (1) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [0032] (2) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 라이신이거나,
- [0033] (3) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 라이신이거나,
- [0034] (4) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 6-아지도라이신이거나,

- [0035] (5) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [0036] (6) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나, 또는
- [0037] (7) X_1 이 히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인인, GLP-2 결합체를 특징으로 한다.
- [0038] 다른 구체예로서, 상기 GLP-2 유도체는 적어도 하나의 잔기가 시스테인, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘 또는 6-아지도라이신인 GLP-2 결합체를 특징으로 한다.
- [0039] 다른 구체예로서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 2 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열인 GLP-2 결합체를 특징으로 한다.
- [0040] 다른 구체예로서, 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 면역글로불린 Fc 영역과 GLP-2 유도체의 하이드록실기, 티올기, 아미노기 또는 아지드기에 결합된 GLP-2 결합체를 특징으로 한다.
- [0041] 다른 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화됨을 특징으로 하는 GLP-2 결합체를 특징으로 한다.
- [0042] 다른 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지영역을 추가로 포함하는 GLP-2 결합체를 특징으로 한다.
- [0043] 다른 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 GLP-2 결합체를 특징으로 한다.
- [0045] 본 발명의 다른 하나의 양태는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는 GLP-2 유도체이다:
- [0046] [일반식 1]
- [0047] $X_1X_2DGSFDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 9)
- [0048] 여기서,
- [0049] X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸데스히스티딘, 데스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일데스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일데스히스티딘이고;
- [0050] X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;
- [0051] X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;
- [0052] X_{34} 는 부존재하거나, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘, 6-아지도라이신, 또는 시스테인이고;
- [0053] 다만, 일반식 1의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 제외한다.
- [0054] 다른 구체예로서, 상기 GLP-2 유도체는 일반식 1에서 (1) X_2 가 글라이신이거나, (2) X_{30} 이 아르지닌이거나, 또는 (3) X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌인 GLP-2 유도체를 특징으로 한다.
- [0055] 다른 구체예로서, 상기 GLP-2 유도체는 일반식 1에서
- [0056] (1) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [0057] (2) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 라이신이거나,
- [0058] (3) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 라이신이거나,
- [0059] (4) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 6-아지도라이신이거나,
- [0060] (5) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [0061] (6) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나, 또는
- [0062] (7) X_1 이 히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인인, GLP-2 유도체를 특징으로 한다.
- [0064] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 GLP-2 유도체를 코딩하는 분리된 핵산이다.
- [0066] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터이다.

- [0068] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 재조합 발현 벡터를 포함하는, 형질전환체이다.
- [0070] 본 발명의 다른 하나의 양태는 하기 단계를 포함하는 상기 GLP-2 유도체를 제조하는 방법이다:
- [0071] a) 상기 GLP-2 유도체를 코딩하는 핵산을 포함하는 형질전환체를 배양하여 GLP-2 유도체를 발현시키는 단계; 및
- [0072] b) 발현된 GLP-2 유도체를 분리 및 정제하는 단계.
- [0074] 본 발명의 다른 하나의 양태는 (a) 2 이상의 말단 반응기를 가지는 비펩타이드성 중합체와 상기 GLP-2 유도체 또는 면역글로불린 Fc 영역 중 하나를 반응시켜, GLP-2 유도체 또는 면역글로불린 Fc 영역이 한쪽 말단에 부착되고, 다른 쪽 말단에 반응기를 가지는, 연결체를 제조하는 단계; 및
- [0075] (b) 상기 (a) 단계에서 제조된 연결체와 면역글로불린 Fc 영역 또는 GLP-2 유도체 중 연결체에 부착되지 않은 다른 하나를 반응시켜, GLP-2 유도체와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된, 결합체를 제조하는 단계를 포함하는 GLP-2 결합체의 제조방법이다.
- [0076] 다른 구체예로서, 상기 비펩타이드성 중합체는 알데히드 그룹, 프로피온알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 반응기를 갖는 것인 GLP-2 결합체의 제조방법을 특징으로 한다.
- [0077] 다른 구체예로서, 상기 석시니미드 유도체는 석시니미딜 카르복시메틸, 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석시니미드인 또는 석시니미딜 카보네이트인, GLP-2 결합체의 제조방법을 특징으로 한다.
- [0079] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 GLP-2 결합체를 포함하는, 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 GLP-2 지속성 제제이다.
- [0081] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 GLP-2 결합체, 또는 GLP-2 유도체를 포함하는, 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [0082] 다른 구체예로서, 상기 장질환은 단장증후군, 과민성 장질환, 염증성 장질환, 크론씨병, 결장염, 대장염, 췌장염, 회장염, 점막염 또는 장 위축인 약학적 조성물을 특징으로 한다.
- [0083] 다른 구체예로서, 위질환은 위경련, 위염, 위궤양, 십이지장염, 또는 십이지장궤양인 약학적 조성물을 특징으로 한다.
- [0085] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 GLP-2 유도체, GLP-2 결합체 또는 이를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환을 예방 또는 치료하는 방법이다.
- [0087] 본 발명의 다른 하나의 양태는 약제의 제조에 있어 상기 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 용도이다.
- [0088] 다른 구체예로서, 상기 약제는 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환을 예방 또는 치료하기 위한 것인 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 용도를 특징으로 한다.
- [0090] 본 발명의 다른 하나의 양태는 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료에 있어 상기 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 용도이다.

발명의 효과

- [0092] 본 발명의 GLP-2 유도체 및 이의 지속형 결합체는 활성이 월등히 높고, 생체 내 우수한 효력 지속 효과를 가지므로, 장질환, 장손상 및 위질환 예방, 개선 및 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0094] 도 1은 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 순도를 역상컬럼으로 분석한 결과이다.
- 도 2는 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 혈중농도 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 Teduglutide 및 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 혈중농도 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 Teduglutide 및 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 *in vivo* 효과(A: 소장의 무게, B: 소장 용모 길이)를

확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0095] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0096] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0097] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0098] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(2-aminoisobutyric acid), _{AZ}K(6-azidolysine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.
- | | | |
|--------|--------------|---------------|
| [0099] | 알라닌 Ala, A | 아르지닌 Arg, R |
| [0100] | 아스파라긴 Asn, N | 아스파르트산 Asp, D |
| [0101] | 시스테인 Cys, C | 글루탐산 Glu, E |
| [0102] | 글루타민 Gln, Q | 글리신 Gly, G |
| [0103] | 히스티딘 His, H | 이소류신 Ile, I |
| [0104] | 류신 Leu, L | 라이신 Lys, K |
| [0105] | 메티오닌 Met, M | 페닐알라닌 Phe, F |
| [0106] | 프롤린 Pro, P | 세린 Ser, S |
| [0107] | 트레오닌 Thr, T | 트립토판 Trp, W |
| [0108] | 티로신 Tyr, Y | 발린 Val, V |
- [0110] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태는 GLP-2 유도체를 제공한다.
- [0111] 본 발명에서 "GLP-2 유도체"는 천연형 GLP-2와 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드; 천연형 GLP-2 서열을 개질(modification)을 통하여 변형시킨 펩타이드; 천연형 GLP-2와 같이 장손상, 장질환 및 위질환 예방, 치료 및/또는 개선 기능을 가진 천연형 GLP-2의 모방체를 포함하며, GLP-2 수용체에 대해 in vitro 및/또는 in vivo에서 우수한 활성을 갖는 유도체를 포함한다.
- [0112] 본 발명의 용어 "글루카곤 유사 펩타이드-2 (Glucagon-like peptide-2, GLP-2)"는 장손상, 장질환, 및 위질환 예방, 치료 및/또는 개선 기능을 가진 펩타이드로서, 천연형 GLP-2뿐만 아니라, 이의 아고니스트(agonist), 단편(fragment), 변이체(variant) 및 유도체(derivative)등도 포함한다.
- [0113] 본 발명에서 "GLP-2 아고니스트"는 GLP-2의 구조와 상관없이 생체 내 GLP-2 수용체와 결합하여 천연형 GLP-2와 동일한 혹은 유사한 생리활성을 일으키는 물질을 말한다.
- [0114] 본 발명에서 "GLP-2 단편"은 GLP-2의 N- 말단 또는 C- 말단에 한 개 이상의 아미노산이 추가 또는 삭제된 펩타이드를 의미하며, 이 때 추가된 아미노산은 비 천연형 아미노산(예; D형 아미노산)도 가능하다.
- [0115] 본 발명에서 "GLP-2 변이체"는 천연형 GLP-2와 하나 이상의 아미노산이 다른 펩타이드를 의미하며 천연형 아미노산 이외에 비 천연형 아미노산의 치환도 가능하다.
- [0116] 본 발명에서 천연형 GLP-2의 아고니스트, 단편, 변이체 및 유도체의 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질 혹은 번역 후 변형 (예, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 분자 내 공유결합 등) 함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다.
- [0117] 이러한 천연형 GLP-2의 아고니스트, 단편, 변이체 및 유도체는 장손상, 장질환 및 위 질환의 예방, 치료 및 개

선 기능을 가질 수 있다.

- [0118] 아고니스트, 단편, 변이체 및 유도체 제조를 위한 여러 방법들의 조합으로 본 발명에 적용되는 천연형 GLP-2의 아고니스트, 단편, 변이체 및 유도체를 제조할 수 있다.
- [0119] 본 발명에서 사용한 GLP-2는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 제조합 방법으로도 생산 가능하다.
- [0121] 하나의 구체적인 실시 형태에서 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2에서 일부 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion) 및 수식(modification) 중 어느 하나의 방법 또는 이러한 방법들의 조합을 통하여 변형된 것일 수 있다.
- [0122] 상기 천연형 GLP-2의 아미노산 서열은 아래와 같다.
- [0123] GLP-2(1-33)
- [0124] HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (서열번호 1)
- [0126] 구체적으로, GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글라이신 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)으로의 치환, 30번째 아미노산인 라이신의 아르지닌으로의 치환, 또는 이들의 조합을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0127] 구체적으로, GLP-2의 유도체는 천연형 GLP-2와 아미노산 서열에서 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성을 보이는 것일 수 있고/있거나, GLP-2의 아미노산 한 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; α -methylation, α -hydroxylation), 제거(예; deamination) 또는 수식(예; N-methylation)된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0129] 구체적으로, GLP-2 유도체는 GLP-2에 티올(thiol)기, 아미노(amino)기 또는 아지드(azide)기가 도입될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 GLP-2 유도체는 GLP-2 수용체에 대해 in vitro 및/또는 in vivo에서 우수한 활성을 가지며, GLP-2 유도체의 지속성 결합체 제조 시 상기 도입된 그룹에서 결합이 일어나므로, 이를 이용하여 결합 위치가 선택적으로 조절된 GLP-2 결합체를 제조할 수 있다. 구체적으로, GLP-2 유도체의 하이드록실기, 티올기, 아미노기 또는 아지드기에 비펩타이드성 중합체의 한 쪽 말단이 결합되고, 비펩타이드성 중합체의 다른 말단에 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)이 결합될 수 있다. 상기 티올기, 아미노기 또는 아지드기는 GLP-2에 아미노산을 추가하여 도입시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 티올기는 GLP-2에 시스테인(C)을 추가시켜 도입되고; 아미노기는 라이신(K), 아르지닌(R), 글루타민(Q) 또는 히스티딘(H)을 추가시켜 도입되고; 아지드기는 6-아지도라이신(6-azidolysine, $_{AZ}K$)을 추가시켜 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0130] 구체적으로, GLP-2 유도체는 적어도 하나의 잔기가 시스테인, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘 또는 6-아지도라이신일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0132] 하나의 구체적인 실시 형태에서, GLP-2 유도체는 N-말단 아미노기가 치환, 제거, 또는 수식될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 GLP-2 유도체는 지속성 결합체 제조 시 GLP-2 유도체의 생체 내 활성에 중요한 부위인 N-말단에 결합이 일어나는 것을 방지하기 위해, N-말단 히스티딘의 알파 아미노기를 제거하는 방법, N-말단 아미노기를 하이드록실(hydroxyl)기 또는 카복실(carboxyl)기로 치환하여 합성하는 방법, N-말단 히스티딘의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기를 제거하여 이미다조-아세틸(imidazo-acetyl) 작용기만을 남겨두는 방법, N-말단 아미노기를 2개의 메틸기로 수식하는 방법 등을 통해 제조될 수 있다.
- [0133] 구체적으로, GLP-2의 유도체는 GLP-2의 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸테스히스티딜 GLP-2(imidazoacetyl-deshistidyl-GLP-2, CA-GLP-2), GLP-2의 N-말단 아미노기가 제거된 데스아미노히스티딜 GLP-2(desaminohistidyl GLP-2, DA-GLP-2), GLP-2의 N-말단 아미노기가 하이드록실기로 치환된 베타-히드록시이미다조프로피온일테스히스티딜 GLP-2(β -hydroxyimidazopropionyl-deshistidyl GLP-2, HY-GLP-2), GLP-2의 N-말단 아미노기가 2개의 메틸기로 수식된 N-디메틸히스티딜 GLP-2(N-dimethylhistidyl GLP-2, DM-GLP-2), 또는 GLP-2의 N-말단 아미노기가 카복실기로 치환된 베타-카복시이미다조프로피온일테스히스티딜-GLP-2(β -carboxyimidazopropionyl-deshistidyl GLP-2, CX-GLP-2)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0135] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글라이신으로의 치환 및 C-

말단에 티올기(예들 들어, 시스테인)의 도입을 포함하며, 더욱 구체적으로 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸테스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0136] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글라이신으로의 치환 및 C-말단에 아미노기(예들 들어, 라이신)의 도입을 포함하며, 더욱 구체적으로 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸테스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 3의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0137] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글라이신으로의 치환, 천연형 GLP-2의 30번째 아미노산인 라이신의 아르지닌으로의 치환 및 C-말단에 아미노기(예들 들어, 라이신)의 도입을 포함하며, 더욱 구체적으로 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸테스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0138] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글라이신으로의 치환 및 C-말단에 아지드기(예들 들어, 6-아지도라이신)의 도입을 포함하며, 더욱 구체적으로 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸테스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 5의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0139] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글라이신으로의 치환, 천연형 GLP-2의 30번째 아미노산인 라이신의 아르지닌으로의 치환 및 C-말단에 티올기(예들 들어, 시스테인)의 도입을 포함하며, 더욱 구체적으로 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸테스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 6의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0140] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글라이신으로의 치환 및 C-말단에 티올기(예들 들어, 시스테인)의 도입을 포함하며, 그 예로 서열번호 8의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 더욱 구체적으로 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸테스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 7의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0141] 상기 서열번호 2 내지 8의 GLP-2 유도체를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

명칭	서열	서열번호
CA GLP-2 KC	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	2
CA GLP-2 KK	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDK	3
CA GLP-2 RK	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTRITDK	4
CA GLP-2 K _{Az} K	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD _{Az} K	5
CA GLP-2 RC	_{ca} HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTRITDC	6
CA GLP-2 Aib	_{ca} HAibDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	7
GLP-2 Aib	HAibDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	8

[0144] 상기 표 1에서 _{ca}H는 히스티딘 대신 이미다조아세틸테스히스티딘으로 치환된 것을, Aib는 2-아미노이소부티릭산(2-aminoisobutyric acid)을, _{Az}K는 6-아지도-L-라이신(6-azido-L-lysine)을 가리킨다.

[0145] 본 발명에 따른 GLP-2 유도체는 상기 기술된 특정 서열을 포함하는 펩타이드, 상기 기술된 특정 서열로 (필수적으로) 구성된 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0146] 한편, 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는' 펩타이드 또는 GLP-2 유도체라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 또는 GLP-2 유도체와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우

에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

- [0148] 하나의 구체적인 실시 형태에서, GLP-2 유도체는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0149] [일반식 1]
- [0150] $X_1X_2\text{DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX}_{30}\text{ITDX}_{34}$ (서열번호 9)
- [0151] 여기서,
- [0152] X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;
- [0153] X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;
- [0154] X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;
- [0155] X_{34} 는 부존재하거나, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘, 6-아지도라이신, 또는 시스테인이고;
- [0156] 다만, 일반식 1의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 제외한다.
- [0158] 구체적으로, GLP-2 유도체는 일반식 1에서 (1) X_2 가 글라이신이거나, (2) X_{30} 이 아르지닌이거나, 또는 (3) X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0159] 구체적으로, GLP-2 유도체는 일반식 1에서
- [0160] (1) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [0161] (2) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 라이신이거나,
- [0162] (3) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 라이신이거나,
- [0163] (4) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 6-아지도라이신이거나,
- [0164] (5) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [0165] (6) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나, 또는
- [0166] (7) X_1 이 히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0168] 한편, 상기 GLP-2 유도체는 펩타이드 그 자체, 이의 염 (예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함한다.
- [0169] 또한, 펩타이드 또는 GLP-2 유도체는 약학적으로 허용되는 임의의 형태일 수 있다.
- [0170] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0171] 상기 용어, "약학적으로 허용되는"은 의약학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 또는 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 원하는 용도에 효과적으로 사용 가능한 물질을 의미한다.
- [0172] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용되는 염" 이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0173] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

- [0175] 본 발명의 GLP-2 유도체는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 재조합 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있다.
- [0177] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 상기 GLP-2 유도체를 코딩하는 분리된 핵산, 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터, 및 상기 재조합 발현 벡터를 포함하는, 형질전환체를 제공한다.
- [0178] 상기 GLP-2 유도체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0180] 본 발명에서 용어, "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)로, 게놈 DNA, cDNA 및 이로부터 전사되는 RNA를 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오티드는 자연의 뉴클레오티드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990). 본 발명의 핵산은 표준 분자생물학 기술을 이용하여 분리 또는 제조할 수 있다. 예를 들어, 적절한 프라이머 서열을 이용하여 천연형 GLP-2 유전자 서열로부터 PCR(중합효소 연쇄반응)을 통해 증폭할 수 있고, 자동화된 DNA 합성기를 이용하는 표준 합성기술을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0182] 본 발명에서 용어, "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 핵산 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 핵산 구조물(construct)을 의미한다. 본 발명은 GLP-2 유도체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제조할 수 있는데, 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection) 시킴으로써, 본 발명의 GLP-2 유도체를 수득할 수 있다.
- [0183] 본 발명에 따른 재조합 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있고, 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주세포로 하여 구축될 수 있다.
- [0185] 본 발명에서 GLP-2 유도체를 코딩하는 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0186] 본 발명에서 용어, "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 핵산 발현 조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 라이보솜 결합부위, 전사 종결서열 등)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0187] 본 발명에서 용어, "프로모터"는 폴리머라제에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 하위 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 대개 코딩 영역의 상위(upstream)에 위치한 비해독된 핵산 서열, 즉, 폴리머라제가 결합하여 유전자의 전사를 개시하도록 하는 DNA 영역을 말하며, mRNA 전사 개시부위의 5'-부위에 위치할 수 있다.
- [0188] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 재조합 벡터이고 원핵세포를 숙주로 하는 경우에, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예: tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합부위 및 전사/해독 종결서열을 포함하는 것이 일반적이다.
- [0189] 또한, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈, pPICZ α 시리즈, pUC19 등), 파지(예: λ gt10, λ B, λ -Charon, λ gt11 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0190] 한편, 본 발명의 벡터가 재조합 벡터이고 진핵세포를 숙주로 하는 경우에, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 우두바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열)을 일반적으로 갖는다.
- [0191] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 선택 마커로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 사용될 수 있다.
- [0192] 본 발명의 재조합 벡터는 회수되는 목적 단백질, 즉 GLP-2 유도체의 정제를 용이하게 하기 위하여 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 추가로 포함될 수 있는 서열은 단백질 정제용 태그 서열일 수 있으며, 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA)

및 6개 히스티딘(hexahistidine) 등이 있으나, 상기 예들에 의하여 목적 단백질의 정제를 위하여 필요한 서열의 종류가 제한되는 것은 아니다.

- [0193] 상기와 같은 태그 서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6개 히스티딘 태그가 이용된 경우에는 Ni-NTA 칼럼을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다.
- [0194] 본 발명에서 용어, "형질전환(transformation)"이란 DNA를 숙주세포 내로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로, 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.
- [0195] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl_2 침전법, CaCl_2 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원제를 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환법 등이 있다.
- [0196] 본 발명에 따른 GLP-2 유도체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.
- [0197] 목적 핵산인 GLP-2 유도체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포 내로 도입함으로써 본 발명의 형질전환체(transformant)를 획득할 수 있다.
- [0198] 본 발명에 적합한 숙주는 본 발명의 핵산을 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*) 속 세균; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*) 속 세균; 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)와 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 세균; 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모; 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충세포; 및 CHO, COS, BSC 등과 같은 동물세포가 있다. 구체적으로는, 숙주세포로 대장균을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0200] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 상기 형질전환체를 이용하여 GLP-2 유도체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0202] 구체적으로, 하기 단계를 포함하는 상기 GLP-2 유도체를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0203] a) 상기 GLP-2 유도체를 코딩하는 핵산을 포함하는 형질전환체를 배양하여 GLP-2 유도체를 발현시키는 단계; 및
- [0204] b) 발현된 GLP-2 유도체를 분리 및 정제하는 단계.
- [0206] 본 발명에서 형질전환체의 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 숙주세포 배양의 요건을 충족해야 한다. 숙주세포의 성장을 위하여 배지 중에 포함될 수 있는 탄소원은 제조된 형질전환체의 종류에 따라 당업자의 판단에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 배양 시기 및 양을 조절하기 위해 적당한 배양 조건을 채택할 수 있다.
- [0207] 사용될 수 있는 당원으로는 글루코스, 사카로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.
- [0208] 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.
- [0209] 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다.
- [0210] 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양 도중에 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로

또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 염기성 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예: 공기)를 주입한다.

- [0211] 본 발명에 따른 형질전환체의 배양은 보통 20℃ 내지 45℃, 구체적으로는 25℃ 내지 40℃의 온도에서 수행된다. 또한 배양은 원하는 GLP-2 유도체의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 지속되는데, 이러한 목적으로 배양은 보통 10 내지 160시간 동안 지속될 수 있다.
- [0212] 전술한 바와 같이 숙주세포에 따라 적절한 배양 조건을 조성해주면 본 발명에 따른 형질전환체는 GLP-2 유도체를 생산하게 되며, 벡터의 구성 및 숙주세포의 특징에 따라 생산된 GLP-2 유도체는 숙주세포의 세포질 내, 원형질막 공간(periplasmic space) 또는 세포 외로 분비될 수 있다.
- [0213] 숙주세포 내 또는 외에서 발현된 단백질은 통상의 방식으로 정제될 수 있다. 정제 방법의 예로는 염석(예: 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전 등), 용매 침전(예: 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전 등), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합하여 적용할 수 있다.
- [0215] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 GLP-2 유도체의 반감기 및 생체 이용율을 증가시키거나, 활성을 지속적으로 유지시키는 제제를 제공한다. 구체적으로, 상기 제제는 GLP-2 유도체에 직접 공유결합하는 캐리어를 포함하는 제제나, 또는 직접적인 공유결합은 없더라도 GLP-2 유도체의 생체 내 활성 유지를 높일 수 있는 성분을 포함하는 제제를 말한다.
- [0217] 또한, 본 발명의 또 하나의 다른 양태는 GLP-2 유도체와 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질을 결합시킨, GLP-2 결합체를 제공한다. 또한, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2에 비해 높은 활성을 가지고, 이의 지속형 결합체는 혈중 반감기가 현저히 증가되어 장질환, 장손상 또는 위질환의 예방, 치료 및/또는 개선에 유용하게 이용할 수 있다.
- [0218] 상기 GLP-2 유도체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0219] 하나의 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 결합체는 GLP-2 유도체 및 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질이 링커를 통해 연결될 수 있다.
- [0220] 본 발명의 GLP-2 결합체는, 상기 GLP-2 유도체에 도입된 티올기, 아미노기 또는 아지드기와 링커가 공유결합을 형성하여, GLP-2 유도체와 링커의 결합 위치가 선택적으로 조절될 수 있다.
- [0221] 또한, GLP-2 결합체는, 상기 GLP-2 유도체의 N-말단 아미노기가 치환, 제거 또는 수식되어, 생체 내 활성에 중요한 부위인 N-말단에 링커가 결합되는 것이 방지됨으로써, GLP-2 유도체와 링커의 결합 위치가 선택적으로 조절될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0223] 본 발명에서 "생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질"은 GLP-2 유도체에 결합되어 이의 반감기를 연장시킬 수 있는 물질을 의미한다. 상기 "생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질"은 본 발명에서 "생체적합성 물질" 또는 "캐리어"와 혼용되어 사용된다.
- [0224] 상기 생체적합성 물질 또는 캐리어는 GLP-2 유도체에 결합되어 이의 반감기를 연장시킬 수 있는 물질이라면 모두 포함하며, 그 예로 폴리에틸렌글리콜, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직 혹은 그 유도체, 뉴클레오타이드, 파이프록베티, 트랜스페린(Transferrin), 당류(saccharide) 및 고분자 중합체로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0225] 상기 생체적합성 물질 또는 캐리어는 공유 또는 비공유 결합으로 GLP-2 유도체에 결합될 수 있다. 또한, GLP-2 유도체와 상기 생체적합성 물질 또는 캐리어와의 연결은 유전자 재조합 방법과 고분자 또는 저분자 화합물질을 이용한 in vitro 결합 등을 포함하며, 어느 결합방식에 한정되지 않는다.
- [0226] 본 발명에서 폴리에틸렌 글리콜을 캐리어로 사용시 위치특이적으로 폴리에틸렌글리콜을 부착할 수 있는 Ambrx사의 Recode기술이 포함될 수 있으며, 당쇄부위에 특이적으로 부착할 수 있는 Neose사의 당페길화(glycopegylation) 기술이 포함될 수 있다. 또한, 생체 내에서 폴리에틸렌글리콜이 천천히 제거되는 releasable PEG 기술이 이에 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 PEG를 이용하여 생체 내 이용율을 높인 기술들이 포

함될 수 있다.

- [0227] 또한, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜-프로필렌글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산과 같은 하나 이상의 고분자 중합체 역시 상기 기술에 의해 GLP-2 유도체에 결합될 수 있다.
- [0228] 본 발명에서 알부민을 캐리어로 사용할 경우 알부민 혹은 알부민 단편을 GLP-2 유도체에 직접 공유결합하여 생체 내 안정성을 높일 수 있는 기술이 포함될 수 있으며 알부민을 직접 결합하지 않더라도 알부민에 결합하는 물질, 예를 들어 알부민 특이적 결합 항체 혹은 항체 단편을 GLP-2 유도체에 결합시켜 알부민에 결합하게 하는 기술 및 알부민에 결합력을 가진 특정 펩타이드/단백질 (예를 들어 Affibody사의 albumod 기술을 이용하여 생산된 알부민 결합 펩타이드)을 GLP-2 유도체에 결합하는 기술이 포함될 수 있으며, 알부민에 결합력을 가진 지방산 등을 결합시키는 기술들이 이에 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 알부민을 이용한 생체내 안정성을 높일 수 있는 어떤 기술, 결합방식 등이 이에 포함될 수 있다.
- [0229] 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 항체 혹은 항체 단편을 캐리어로 사용하여 GLP-2 유도체에 결합시키는 기술도 본 발명에 포함될 수 있다. FcRn 결합 부위를 갖는 항체 혹은 항체 단편일 수 있으며, Fab등 FcRn 결합부위를 포함하지 않는 어떠한 항체 단편일 수 있다. Catalytic 항체를 이용하는 CovX사의 CovX-body 기술이 이에 포함될 수 있으며, 면역글로불린 Fc 영역을 이용하여 생체 내 반감기를 증가시키는 기술도 본 발명에 포함될 수 있다.
- [0231] 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역일 수 있다.
- [0232] 본 발명에서 사용된 용어 "면역글로불린 Fc 영역"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역 (CL)을 제외한 나머지 부분을 의미하며, 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 영역을 추가로 포함하기도 한다. 특히 면역글로불린 Fc 영역 전체 및 이의 일부를 포함하는 단편일 수 있어, 본 발명에서는 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 단편 또는 면역글로불린 불변영역과 혼용될 수 있다.
- [0233] 천연형 Fc는 중쇄 불변영역 1에서 Asn297 부위에 당쇄가 존재하지만, 대장균 유래 재조합 Fc는 당쇄가 없는 형태로 발현된다. Fc에서 당쇄가 제거되면 중쇄 불변영역 1에 결합하는 Fc 감마 수용체 1,2,3 과 보체(c1q)의 결합력이 저하되어 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거된다.
- [0234] 본 발명에서, "면역글로불린 불변영역"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역, 중쇄 불변영역 1(CH1)과 경쇄 불변영역(CL)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및 중쇄 불변영역 3(CH3) (또는 중쇄 불변영역 4(CH4) 포함)부분을 포함하는 Fc 단편을 의미할 수 있으며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 또한, 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 천연형과 실질적으로 동등 하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄 불변영역(CL)을 포함하는 확장된 면역글로불린 불변영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다. 즉, 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 (1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, (2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, (3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, (4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, (5) 1개 또는 2개의 이상의 불변영역 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)과의 조합, (6) 중쇄 불변영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있다. 면역글로불린 Fc 단편을 비롯한 불변영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 단편은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라, 아미노산 서열이 항체마다 달라 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분이 제거되기 때문에, 물질의 동질성이 크게 증가되고, 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다.
- [0235] 한편, 면역글로불린 불변영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물 기원일 수 있으며, 구체적으로는 인간기원이다. 또한, 면역글로불린 불변영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 불변영역으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 구체적으로는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래일 수 있다. 본 발명에서 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체일 수 있다.
- [0236] 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 불변영역 (구체적으로는 Fc 영역)을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것

을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

[0237] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단백질의 면역글로불린 불변영역(구체적으로는 Fc 영역)내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 불변영역에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지영역을 추가로 포함할 수 있다.

[0238] IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화된 형태도 가능하다. 구체적으로는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 더욱 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, Complement-dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역일 수 있다.

[0239] 또한, 면역글로불린 불변영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 불변영역 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, 면역글로불린 불변영역에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 불변영역은 보체(c1q)의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 불변영역이라 할 것이다. 따라서, 더욱더 구체적으로는, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역, 즉 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역을 사용할 수 있다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직할 수 있다.

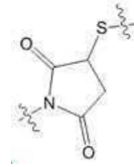
[0240] 또한, 본 발명의 면역글로불린 불변영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열유도체(mutant)를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다. 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다. 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가되는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예를 들어 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 불변영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

[0241] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation), 아밀화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[0243] 상기 기술한 면역글로불린 불변영역 유도체는 본 발명의 면역글로불린 불변영역과 동일한 생물학적 활성을 나타내나, 면역글로불린 불변영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 유도체일 수 있다. 또한, 이러한 면역글로불린 불변영역은 인간 및 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 얻을 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다.

[0244] 구체적으로는 인간 유래의 면역글로불린 불변영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 불변영역일 수 있다.

- [0246] 본 발명에서 링커는 상기 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질의 N-말단, C-말단, 티올기(예를 들어, 시스테인), 아미노기(예를 들어, 라이신, 아르지닌, 글루타민 또는 히스티딘), 및/또는 하이드록실기에 결합되고, GLP-2 유도체의 N-말단, C-말단, 티올기(예를 들어, 시스테인), 아미노기(예를 들어, 라이신, 아르지닌, 글루타민 또는 히스티딘), 아지드기(예를 들어, 6-아지도라이신) 및/또는 하이드록실기에 결합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0248] 상기 링커는 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커일 수 있다.
- [0249] 상기 비펩타이드성 링커로서 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체를 사용하여, GLP-2 유도체의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질과 유사하게 GLP-2 유도체의 혈중반감기를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 상기와 같은 역할, 즉 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 비펩타이드성 중합체이면 제한없이 사용될 수 있다.
- [0250] 본 발명에서 "비펩타이드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함하고, "비펩타이드성 링커"와 혼용된다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 본 발명에서 비펩타이드성 중합체는 말단에 반응기를 포함하여, 결합체를 구성하는 다른 구성 요소와 반응을 통해 결합체를 형성할 수 있다. 이와 같은 비펩타이드성 중합체는 양 말단 또는 세 말단을 가질 수 있다.
- [0251] 본 발명에서 "비펩타이드성 중합체 연결부(linkage moiety)"는 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체가 각 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 영역 및 GLP-2 유도체와 결합하여 형성한 결합체 내의 일 구성 요소를 의미한다.
- [0252] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 GLP-2 유도체는 양쪽 말단에 면역글로불린 Fc 영역 및 GLP-2 유도체와 결합될 수 있는 반응기를 포함하는 비펩타이드성 중합체를 통하여, 면역글로불린 Fc 영역 및 GLP-2 유도체가 서로 공유결합적으로 연결된 것일 수 있다.
- [0253] 구체적으로, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(polylactic acid) 및 PLGA(polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 보다 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0254] 상기 링커에 의한 결합은 비공유화학 결합 혹은 공유화학결합 등 어떠한 화학적 결합일 수 있으며, 그 제한은 없다.
- [0255] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 중합체는 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있으나, 구체적으로 비펩타이드성 중합체의 분자량은 0 초과 200 kDa 범위, 구체적으로, 1 내지 100 kDa 범위, 보다 구체적으로, 1 내지 50 kDa 범위, 보다 더 구체적으로, 1 내지 20kDa 범위, 보다 더 구체적으로 3.4kDa 내지 10 kDa, 범위, 보다 더 구체적으로 약 3.4kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0256] 또한, 상기 캐리어, 특히 면역글로불린 Fc 영역과 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 중합체는 한 종류의 중합체 뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [0258] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단은 면역글로불린 Fc 영역의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 GLP-2 유도체의 티올기, 아미노기, 아지드기, 하이드록실기에 결합할 수 있다.
- [0259] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 및 GLP-2 유도체와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 면역글로불린 Fc 영역의 시스테인의 티올기; N-말단, 라이신, 아르지닌, 글루타민 및/또는 히스티딘에 위치한 아미노기; 및/또는 C-말단에 위치한 하이드록실기와 결합되고, GLP-2 유도체의 시스테인의 티올기; 라이신, 아르지닌, 글루타민 및/또는 히스티딘의 아미노기; 아지도라이신의 아지드기; 및/또는 하이드록실기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0260] 보다 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 알데히드 그룹, 프로피온알데히드 그룹, 부틸 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0261] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0262] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 상기 석시니미드 유도체는 석시니미딜 카르복시메틸, 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석시니미드인 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0263] 상기 비펩타이드성 중합체는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 및 GLP-2 유도체에 연결되어, 비펩타이드성 중합체 연결부로 전환될 수 있다.
- [0264] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원적 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에 선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 리신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.
- [0265] 본 발명의 비펩타이드성 중합체의 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 상기 비펩타이드성 중합체는 말단에 알데히드 그룹 반응기를 갖는 것일 수 있고, 또한 상기 비펩타이드성 중합체는 말단에 각각 알데히드 그룹 및 말레이미드 반응기를 가질 수 있거나, 말단에 각각 알데히드 그룹 및 석시니미드 반응기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0266] 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 또 한 가지 예로, 한쪽 말단에는 석시니미딜 그룹을, 다른 쪽 말단에는 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 가질 수 있다.
- [0267] 프로피온쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)을 이용하여 본 발명의 결합체를 제조할 수 있다.
- [0268] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기가 GLP-2 유도체의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0269] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 GLP-2 유도체의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 면역글로불린 Fc의 -NH₂ 기와 환원적 알킬화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0270] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단 아미노기가 -CH₂CH₂CH₂-의 구조를 가지는 링커 작용기를 통해 서로 연결되어, -PEG-O-CH₂CH₂CH₂NH-면역글로불린 Fc와 같은 구조를 형성할 수 있고, 티오에테르 결합을 통하여 PEG의 한쪽 말단이 GLP-2 유도체의 시스테인에 위치한
-
- 황 원자에 연결된 구조를 형성할 수 있다. 상술한 티오에테르 결합은 의 구조를 포함할 수 있다.
- [0271] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0272] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 중합체의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0273] 또한, 상기 결합체에서, GLP-2 유도체는 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [0274] 본 발명에서 "C-말단"은, 펩타이드의 카르복시 말단을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 비펩타이드성 중합체와 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0276] 하나의 구체적인 실시 형태에서, GLP-2 유도체와 생체 내 반감기를 연장할 수 있는 물질의 연결은 유전자 재조

합 방법일 수 있다.

- [0278] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 GLP-2 결합체는 GLP-2 유도체와 면역글로불린 Fc 영역이 비펩타이드성 중합체를 통해 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단에서 각각 공유결합으로 연결되어 있는 GLP-2 결합체로서,
- [0279] 상기 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌 글리콜-프로필렌 글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐에틸에테르, 지질 중합체, 키틴류, 히알루론산 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 GLP-2 결합체일 수 있다.
- [0280] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 도입된 티올기, 아미노기 또는 아지드기가 링커인 비펩타이드성 중합체와 공유결합을 형성할 수 있어, 본 발명의 GLP-2 유도체를 이용하는 경우 결합 위치가 선택적으로 조절된 GLP-2 결합체를 얻을 수 있다.
- [0281] 또한, 본 발명의 GLP-2 유도체는 N-말단 아미노기가 치환, 제거 또는 수식되어, 비펩타이드성 중합체가 생체 내 활성에 중요한 부위인 N-말단에 결합되는 것이 방지되고, 결합 위치가 선택적으로 조절된 GLP-2 결합체를 얻을 수 있다.
- [0282] 본 발명에서 GLP-2 결합체는 GLP-2 유도체의 결합체, GLP-2 유도체의 지속형 결합체, 또는 지속형 GLP-2 유도체의 결합체와 혼용된다.
- [0284] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 GLP-2 유도체 및 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질을 연결하는 단계를 포함하는, GLP-2 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0285] 상기 GLP-2 유도체, 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질 및 GLP-2 결합체는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0286] 구체적으로, 상기 방법은
- [0287] (a) 2 이상의 말단 반응기를 가지는 비펩타이드성 중합체와 GLP-2 유도체 또는 캐리어(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역) 중 하나를 반응시켜, GLP-2 유도체 또는 캐리어가 한쪽 말단에 부착되고, 다른 쪽 말단에 반응기(reactive end group)를 가지는, 연결체를 제조하는 단계; 및
- [0288] (b) 상기 (a) 단계에서 제조된 연결체와 캐리어 또는 GLP-2 유도체 중 연결체에 부착되지 않은 다른 하나를 반응시켜, GLP-2 유도체와 캐리어가 비펩타이드성 중합체를 통하여 연결된, 결합체를 제조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0289] 상기 비펩타이드성 중합체, 캐리어, GLP-2 유도체와 이들의 연결 구성에 대해서는 앞서 기술한 설명이 모두 적용된다.
- [0290] 본 발명에서 용어 "연결체"란 비펩타이드성 중합체와 GLP-2 유도체 또는 캐리어 중 하나만이 공유결합으로 연결된 중간체로서, 상기 연결체의 GLP-2 유도체 또는 캐리어가 연결되지 않은 비펩타이드성 중합체의 말단에, 연결체에 부착되지 않은 GLP-2 유도체 또는 캐리어가 결합될 수 있다.
- [0292] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 GLP-2 결합체를 포함하는, 생체 내 지속성 및 안정성이 증가된 GLP-2 지속성 제제를 제공한다.
- [0293] 한편, 생체이용율을 증가 혹은 지속적인 활성유지를 할 수 있는 제제로는 PLGA, 히알루론산, 키토산등을 이용한 마이크로 파티클, 나노파티클 등에 의한 서방성(sustained release) 제형이 이에 포함될 수 있다.
- [0294] 또한, 생체이용율을 증가 혹은 지속적인 활성유지를 할 수 있는 다른 양태의 제제로는 임플란트(implant), 흡입제(inhalation), 나зал(nasal) 제제, 패치(patch)와 같은 형태의 제제일 수 있다.
- [0295] 이러한 본 발명의 GLP-2 결합체는 기존의 GLP-2의 생체 내 활성이 유지될 뿐만 아니라, GLP-2 유도체의 혈중 반감기 및 이로 인한 상기 펩타이드의 생체 내 효력 지속효과가 획기적으로 증가하게 하므로, 장질환, 장손상 및 위질환의 치료에 유용하다.
- [0297] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 GLP-2 유도체 및/또는 GLP-2 결합체를 포함하는 조성물, 예컨대, 약학적 조성물을 제공한다.
- [0298] 상기 약학적 조성물은 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.

- [0299] 상기 GLP-2 유도체 및 GLP-2 결합체에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0300] 본 발명에서 용어, "장질환"은 단장증후군, 과민성 장질환, 염증성 장질환, 크론씨병, 결장염, 대장염, 췌장염, 회장염, 점막염 또는 장 위축일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0301] 본 발명에서 용어, "위질환"은 위경련, 위염, 위궤양, 십이지장염, 또는 십이지장궤양일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0302] 본 발명에서 사용된 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여로 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0304] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0305] 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0306] 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 및 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 그 외에도 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐 및 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0307] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 인산칼슘, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0308] 또한, 본 출원의 GLP-2 유도체 및/또는 GLP-2 결합체는 본 출원의 조성물의 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 10 중량%로 포함될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0310] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 상기 GLP-2 유도체, GLP-2 결합체 및/또는 이를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0311] 상기 GLP-2 유도체, GLP-2 결합체, 약학적 조성물, 장질환, 장손상, 위질환, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0312] 본 발명에서 용어 "개체"는 장질환, 장손상, 위질환 질환이 의심되는 개체로서, 상기 질환 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나, 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물을 의미하나, 본 발명의 GLP-2 유도체, GLP-2 결합체 또는 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.
- [0313] 본 발명에서 "투여"는, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 아날로그의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여 및 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여 시 펩티드는 소화되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0314] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 유효성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성이 우수하므로, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

- [0315] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다.
- [0316] 그러나 상기 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [0318] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 약제의 제조에 있어 상기 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 용도이다.
- [0319] 하나의 양태로서, 상기 약제는 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 예방 또는 치료용이나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0320] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 장질환, 장손상 및 위질환 중에서 선택되는 하나 이상의 예방 또는 치료에 있어 상기 GLP-2 유도체 또는 GLP-2 결합체의 용도이다.
- [0321] 상기 GLP-2 유도체, GLP-2 결합체, 장질환, 장손상, 위질환에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0323] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0325] **실시예 1. CA-GLP-2 KC-PEG(10K)-면역글로불린 Fc 결합체 또는 CA-GLP-2 RC-PEG(10K)-면역글로불린 Fc 결합체의 제조**
- [0327] 10 kDa MAL-ALD PEG(양 말단의 수소가 각각 3-[(3-*N*-말레이미딜)프로판오일]아미노프로필기와 프로필알데히드기로 개질된 분자량 10 kDa인 폴리에틸렌글리콜, 일본 NOF사)을 CA-GLP-2 KC 또는 CA-GLP-2 RC(CPC, Chinese Peptide Co, 중국)의 34번 시스테인 잔기에 폐길화시키기 위하여 CA-GLP-2 KC 또는 CA-GLP-2 RC와 PEG의 물비를 1:1~2, 펩타이드 농도를 1~3 mg/ml로 하여 1~3 시간 반응시켰다. 이 때 반응은 50mM 트리스(Tris) pH 7.5와 아이소프로판올의 혼합 용매에서 이루어졌다. 반응액은 구연산 나트륨 pH 2.0, 에탄올이 포함된 버퍼와 염화칼륨 농도 구배를 이용한 SP Sepharose High Performance(GE, 미국) 컬럼을 사용하여 모노 폐길화된(mono-PEGylated) CA-GLP-2 KC 또는 모노 폐길화된 CA-GLP-2 RC를 정제하였다.
- [0328] 다음으로, 상기 정제된 모노 폐길화된 CA-GLP-2 KC 또는 모노 폐길화된 CA-GLP-2 RC와 면역 글로불린 Fc 단편의 물비가 1:2~1:6가 되도록 하고, 전체 단백질 농도를 30~35 mg/mL로 하여 2~8℃에서 12~20시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)과 아이소프로판올에 환원제로서 20mM 소듐 시아노보로하이드라이드[sodium cyanoborohydride(NaCNBH₃)]를 첨가하였다.
- [0329] 반응이 종결된 후 반응액은 비스-트리스(bis-Tris) pH 6.5 버퍼와 염화나트륨 농도 구배를 이용하여 Source15Q(GE, 미국) 컬럼에 적용하고, 황산 암모늄과 구연산 나트륨 pH 5.0~5.2의 농도 구배를 이용하여 Source 15IS0(GE, 미국)에 적용하여, 면역글로불린 Fc에 CA-GLP-2 KC 또는 CA-GLP-2 RC가 PEG에 의해 공유결합으로 연결된 결합체인 CA-GLP-2 KC(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체 CA-GLP-2 KC-PEG(10K)-면역글로불린 Fc와 CA-GLP-2 RC(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체 CA-GLP-2 RC-PEG(10K)-면역글로불린 Fc를 정제하였다. HPLC 역상 분석 결과 결합체의 순도는 각각 92.9%, 95.6%이었고, 그 결과는 도 1과 같다.
- [0331] **실시예 2. CA-GLP-2 RK-PEG(3.4K 또는 10K)-면역글로불린 Fc 결합체의 제조**
- [0333] 3.4 kDa 또는 10 kDa ALD(2) PEG(양 말단의 수소가 프로필알데히드기로 개질된, 분자량 3.4 kDa의 폴리에틸렌글리콜, 일본 NOF사)를 CA-GLP-2 RK(CPC, Chinese Peptide Co., 중국)의 34번 라이신 잔기에 폐길화시키기 위하여 CA-GLP-2 RK와 PEG의 물비를 1:5~1:20, 펩타이드 농도를 5~10 mg/ml로 하여 2~8℃에서 4~16시간 반응시켰다. 이 때 반응은 20 mM 헤페스(HEPES) pH 7.5와 에탄올에서 이루어 졌으며 환원제인 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하여 반응시켰다. 반응액은 구연산나트륨 pH 2.0, 에탄올이 포함된 완충 용액과 염화칼륨 농도 구배를 이용한 Source 15S (GE, 미국) 컬럼을 사용하여 모노 폐길화된 CA-GLP-2 RK를 정제하였다.

[0334] 다음으로, 상기 정제된 모노 폐길화된 CA-GLP-2 RK와 면역 글로불린 Fc의 결합체를 상기 실시예 1와 같은 반응 및 정제 조건에 따라, 제조 및 정제하였다. HPLC 역상 분석 결과 면역글로불린 Fc에 CA-GLP-2 RK가 PEG에 의해 공유결합으로 연결된 결합체인 CA-GLP-2 RK(3.4K PEG) 유도체의 지속형 결합체 CA-GLP-2 RK-PEG(3.4K)-면역글로불린 Fc와 CA GLP-2 RK(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체 CA-GLP-2 RK-PEG(10K)-면역글로불린 Fc의 순도는 각각 94.3%, 92.6%이었고, 그 결과는 도 1과 같다.

[0336] 실시예 3. CA-GLP-2 KK-PEG(10K)-면역글로불린 Fc 결합체 및 CA-GLP-2 K_{AZ}K-PEG(10K)-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

[0338] 실시예 2의 방법에 따라 CA-GLP-2 KK 및 CA-GLP-2 K_{AZ}K를 이용하여, 면역글로불린 Fc에 CA-GLP-2 KK 또는 CA-GLP-2 K_{AZ}K가 PEG에 의해 공유결합으로 연결된 결합체인 CA GLP-2 KK(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체 CA-GLP-2 KK-PEG(10K)-면역글로불린 Fc와 CA GLP-2 K_{AZ}K(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체 CA-GLP-2 K_{AZ}K-PEG(10K)-면역글로불린 Fc를 제조 및 정제하였다.

[0340] 실시예 4. GLP-2 유도체 및 이의 지속형 결합체의 *in vitro* 활성 확인

[0342] 앞선 실시예에서 얻은 GLP-2 유도체 및 GLP-2 유도체 지속형 결합체들의 활성을 측정하기 위하여, GLP-2 수용체가 형질전환된 세포주를 이용하여 *in vitro*에서 세포활성을 측정하는 방법을 사용하였다. 상기 세포주는 CHO(Chinese hamster ovary)-K1에 인간 GLP-2 수용체를 발현하도록 형질 전환된 것으로서, GLP-2의 활성을 측정하기에 적합하다(DiscoverX, USA).

[0343] GLP-2 유도체와 이의 지속형 결합체의 활성 측정을 위해 인간 GLP-2와 Teduglutide(Gattex®, Shire)를 166.7 nM 부터 3배씩 0.0028 nM까지, GLP-2 유도체를 500 nM부터 3배씩 0.0085 nM까지, GLP-2 유도체의 지속형 결합체를 3000 nM부터 3배씩 0.0508 nM까지 연속적으로 희석하였다. 상기 배양된 인간 GLP-2 수용체가 발현된 CHO-K1 세포에서 배양액을 제거하고, 연속적으로 희석된 각 물질들을 5 µl씩 상기 세포에 첨가한 다음, cAMP 항체가 포함된 완충액을 5 µl씩 추가한 뒤 15분 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 세포용해완충액(cell lysis buffer)이 포함된 detection mix를 10 µl씩 가하여 세포를 용해시키고, 60분 동안 상온에서 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 세포용해물을 LANCE cAMP kit(PerkinElmer, USA)에 적용하여 측정된 cAMP를 통해 EC₅₀값을 산출한 후, 상호 비교하였다. 인간 GLP-2 대비 상대 역가는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0344] GLP-2 유도체의 상대적 역가 비율

GLP-2 유도체	인간 GLP-2 대비 <i>in vitro</i> 활성(%)	GLP-2 유도체의 지속형 결합체	인간 GLP-2 대비 <i>in vitro</i> 활성(%)
Teduglutide	147.5	-	-
CA GLP-2 KC	149.3	CA GLP-2 KC(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체	9.7
CA GLP-2 KK	205.6	CA GLP-2 KK(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체	ND
CA GLP-2 RC	120.0	CA GLP-2 RC(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체	46.0
CA GLP-2 RK	333.2	CA GLP-2 RK(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체	52.0
		CA GLP-2 RK(3.4K PEG) 유도체의 지속형 결합체	52.6

[0345] ND = 측정하지 않음

[0347] 상기에서 제조한 신규한 GLP-2 유도체 및 이의 지속형 결합체는 GLP-2 수용체를 활성화시킬 수 있는 기능을 가지며, 인간 GLP-2 대비 GLP-2 유도체의 상대적 역가가 월등히 우수한 것을 확인 할 수 있었다. 또한 서열번호 4의 GLP-2 유도체(CA GLP-2 RK)와 서열번호 6의 GLP-2 유도체(CA GLP-2 RC)의 지속형 결합체들은 서열번호 2의 GLP-2 유도체(CA GLP-2 KC)의 지속형 결합체 대비 높은 활성이 확인된 바, 목적하는 질환의 치료적 물질로 이용될 수 있다.

[0349] 실시예 5. GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 SD 랫드에서 약물동태 확인

[0351] GLP-2 유도체의 지속형 결합체들의 약물동태를 정상 랫드에서 비교하였다. 8주령의 정상 랫드를 CA GLP-2 KC(10K PEG) 유도체, CA GLP-2 RC(10K PEG) 유도체, CA GLP-2 RK(10K PEG) 유도체, 그리고 CA GLP-2 RK(3.4K PEG) 유도체의 지속형 결합체 투여군(2.52 mg/kg)으로 각각 나누었다. 정상 랫드에 상기 시험물질을 각 군마다 3마리씩 단회 피하투여 한 후, CA GLP-2 KC(10K PEG) 유도체의 지속형 결합체에서는 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 및 168 시간에 미정맥 채혈을 통해 전혈을 얻었고, 그 이외의 CA GLP-2 유도체의 지속형 결합체들에서는 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 및 336 시간에 미정맥 채혈을 통해 전혈을 얻었다. 전혈을 1.5 mL 용량의 마이크로튜브에 넣고 5,000 rpm으로 10분간 상온에서 원심 분리하여 혈청을 분리한 뒤, -20 °C에 보관하였다. 보관된 각 군의 혈청은 ELISA 분석법을 이용하여 혈청 내 농도를 정량화하였다. CA GLP-2 유도체 지속형 결합체들의 경우 바이오틴이 표지된 GLP-2 다클론 항체(Phoenix Pharmaceuticals, #B-028-14)를 스트렙타비딘(Streptavidin)이 코팅된 플레이트(Roche, #11645692001)에 결합시킨 후, 혈청과 한 시간 동안 반응 시켰다. 세척 후 항 인간 IgG4-HPR (Alpha Diagonosis, #10124)를 넣고, 한 시간 동안 상온에서 반응시킨 뒤, TMB 시약으로 발색 반응시키고, 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하는 방식으로 하였다. 혈청 내 농도를 이용하여 약물동력학 파라미터들을 산출하였다.

[0352] 그 결과 모든 CA GLP-2 유도체의 지속형 결합체에서 유사한 AUC 및 반감기를 확인할 수 있었다. 특히, CA GLP-2 RK(3.4K PEG) 유도체의 지속형 결합체의 경우 짧은 PEG로 인해 반감기가 다소 짧아지는 양상을 보이나 AUC에서는 큰 차이가 없었다. 결과는 도 2와 표 3에 나타내었다.

표 3

[0353] GLP-2 유도체의 지속형 결합체들의 약물동태 파라미터

GLP-2 유도체	AUC _{last} (ng x hr/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	T _{1/2} (hr)	MRT _{last} (hr)
CA GLP-2 KC (10K PEG) 유도체의 지속형 결합체	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) 유도체의 지속형 결합체	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) 유도체의 지속형 결합체	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) 유도체의 지속형 결합체	1058834.3 ±177030.1	12607.7 ±4030.1	13.3±9.2	37.0±2.2	71.7±11.2

[0354] - AUC_{last}: 약물의 체내 노출도를 나타내며, 약물의 효력/독성과도 밀접한 연관성을 갖는 PK파라미터(체내에서 약물이 효력을 나타내려면 일정 수준 이상의 체내 노출도를 보여야 하며, 과도한 체내 노출도는 독성 작용을 나타낼 수 있음)

[0355] - MRT_{last}: 약물의 평균체류시간(mean residence time)으로 약물이 체내에서 소실되기까지의 평균시간이며, MRT가 길수록 약물이 체내에서 오래 머무르는 것으로 MRT가 짧은 약물 대비 더 긴 지속성을 갖는 것으로 평가할 수 있음

[0357] 실시예 6. GLP-2 유도체의 지속형 결합체와 teduglutide의 SD 랫드에서 약물동태 비교

[0359] Teduglutide 및 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 약물동태를 비교하였다. 8주령의 정상 랫드를 Teduglutide 투여군(2.5 mg/kg)과 CA GLP-2 RK(3.4K PEG) 유도체의 지속형 결합체 투여군(0.705 mg/kg)으로 각각 나누었다. 정상 랫드에 상기 시험물질을 각 군마다 3마리씩 단회 피하투여 한 후, Teduglutide 투여군은 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 및 24시간, CA GLP-2 RK 유도체의 지속형 결합체 투여군은 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 및 336 시간에 미정맥 채혈을 통해 전혈을 얻었다. 전혈을 1.5 mL 용량의 마이크로 튜브에 넣고 5,000 rpm으로 10분간 상온에서 원심 분리하여 혈청을 분리한 뒤, -20 °C에 보관하

였다. 보관된 각 군의 혈청은 ELISA 분석법을 이용하여 혈청 내 농도를 정량화하였다. Teduglutide의 경우 GLP-2 ELISA Kit(Alpco, #48-GP2HU-E01.1)을 이용하였다. CA GLP-2 RK 유도체의 지속형 결합체의 경우 바이오틴으로 표지된 GLP-2 다클론 항체(Phoenix Pharmaceuticals, #B-028-14)를 스트렙트아비딘(Streptadivin)이 코팅된 플레이트(Roche, #11645692001)에 결합시킨 후, 혈청과 한 시간 동안 반응시켰다. 세척 후 항 인간 IgG4-HPR(Alpha Diagonosis, #10124)를 넣고, 한 시간 동안 상온에서 반응시킨 뒤, TMB 시약으로 발색 반응시키고, 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하는 방식으로 하였다. 혈청 내 농도를 이용하여 약물동력학 파라미터들을 산출하였다.

[0360] 그 결과 CA GLP-2 RK 유도체의 지속형 결합체의 경우 Teduglutide 대비하여 AUC, 반감기가 모두 크게 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 결과는 도 3와 표 4에 나타내었다.

표 4

[0361] Teduglutide 및 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 약물동태 파라미터

GLP-2 유도체	AUC _{last} (ng x hr/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	T _{1/2} (hr)	MRT _{last} (hr)
Teduglutide	2596.6 ±580.7	1675.5±744.0	0.7 ±0.3	0.6 ±0.1	1.4 ±0.1
CA GLP-2 RK 유도체의 지속형 결합체	199738.9 ±28544.5	2442.1±392.6	24.0 ±0.0	42.3 ±3.4	71.1 ±3.1

[0363] 실시예 7. GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 정상 마우스에서 *in vivo* 장무게 증가 효력 확인

[0365] Teduglutide 및 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 *in vivo* 장 무게 증가효력을 정상 마우스에서 확인하였다.

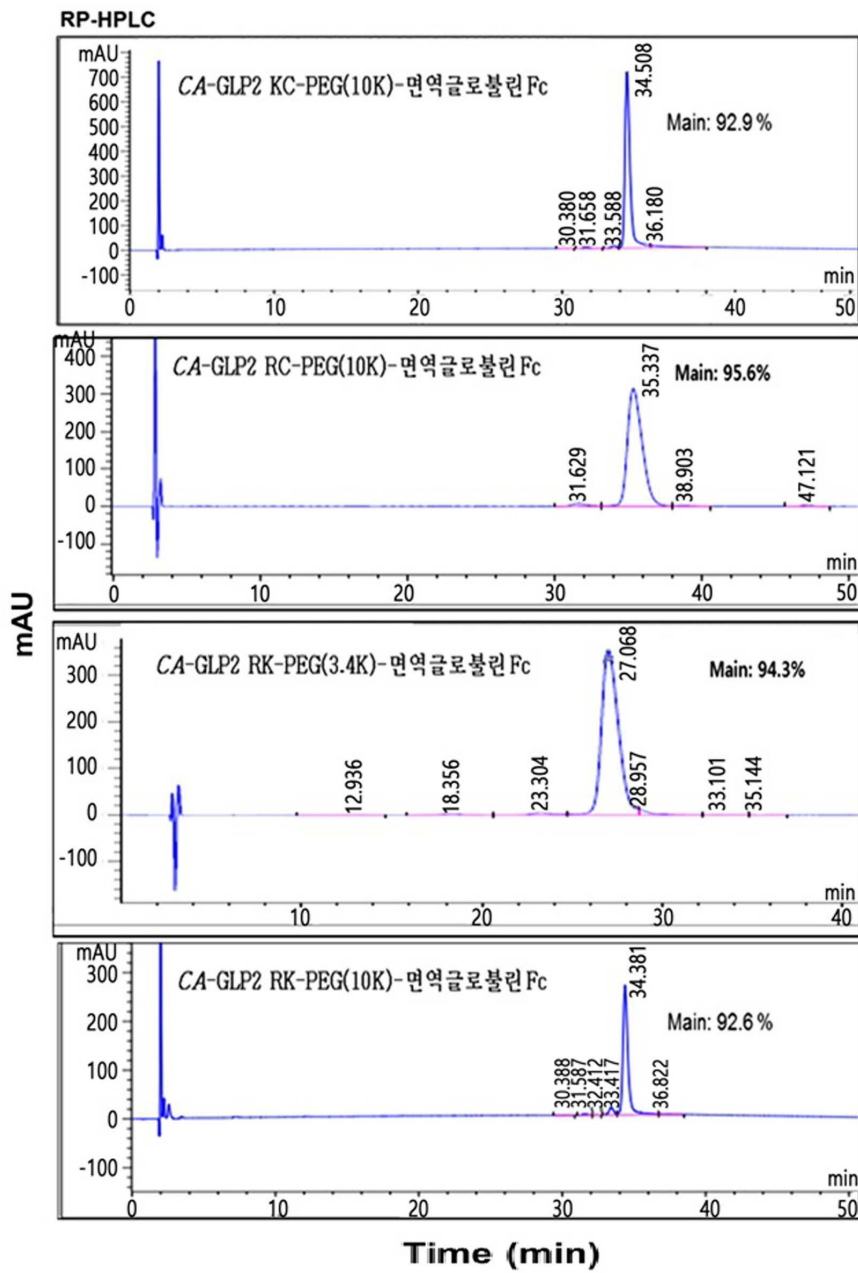
[0366] 7주령의 C57BL/6 마우스를 vehicle, Teduglutide 투여군(7.5 & 15 nmol/kg/BID)과 CA GLP-2 RK(3.4K PEG) 유도체의 지속형 결합체 투여군(4.15, 7.5, 15, 30 nmol/kg/Q2D)으로 각각 나누었다. 각 군마다 5마리씩 배치하였으며 13일간 투여 후 부검하였다. 장을 관류한 후, 소장의 무게와 소장 내 용모길이를 측정 하였다.

[0367] 그 결과 Teduglutide와 CA GLP-2 RK 유도체의 지속형 결합체 모두 체중으로 보정된 소장의 무게가 투여용량 의존적으로 증가하였으며(도 4A), 용모의 길이 증가와 연관성이 있는 것(도 4B)으로 보아 소장의 무게 증가가 용모의 증가에 의한 것임을 유추할 수 있었다. Teduglutide의 최대 효력을 보이는 것으로 알려져 있는 고용량 투여군(15 nmol/kg/BID)의 경우, CA GLP-2 RK 유도체의 지속형 결합체 투여군의 저용량 투여군(4.15 nmol/kg/Q2D)과 유사하였으며, 용량 의존적으로 Teduglutide의 최대 효력을 능가하는 것이 확인되었다. 결과는 도 4에 나타내었다.

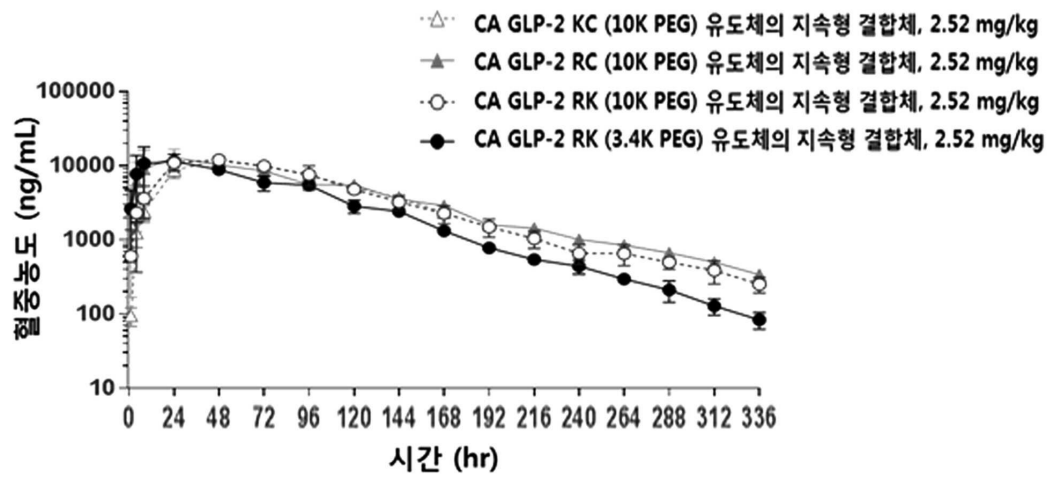
[0369] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

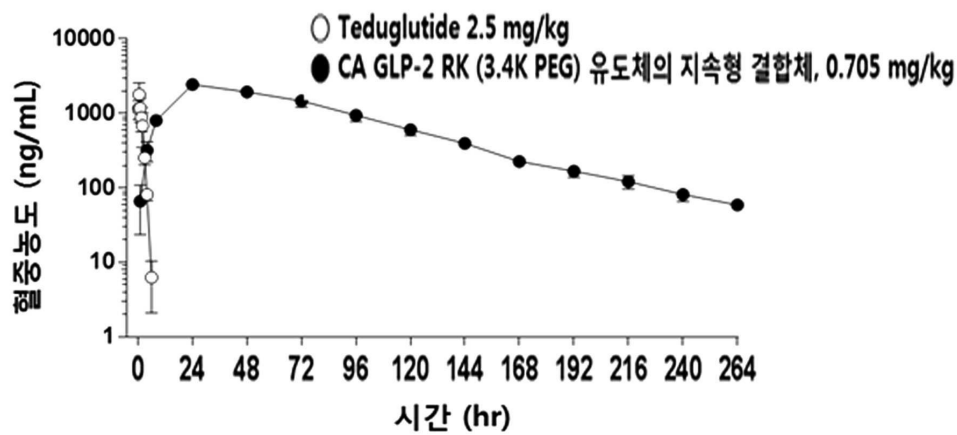
도면1



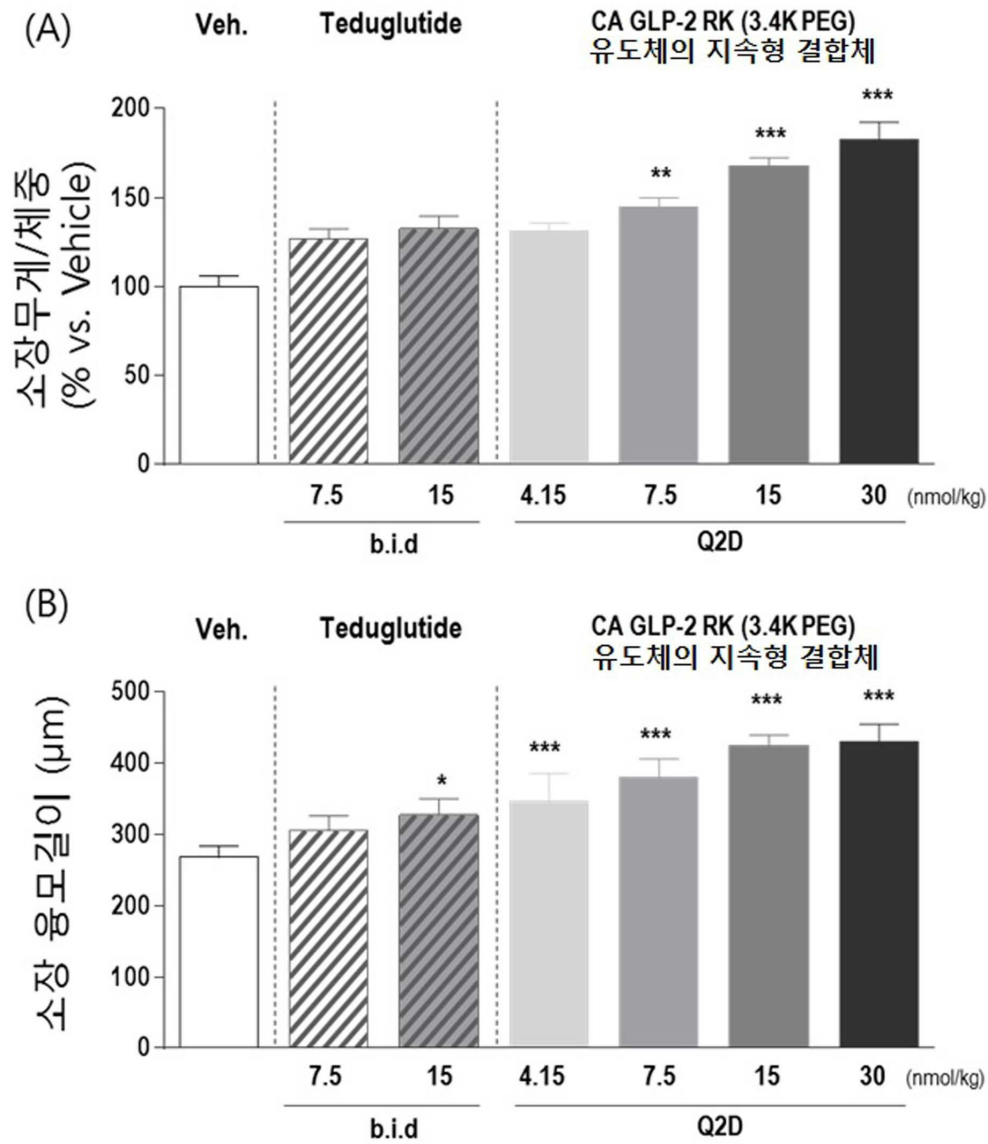
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> HANMI PHARM. CO., LTD.
- <120> Long-acting conjugates of GLP-2 derivatives
- <130> KPA171073-KR-P1
- <150> KR 10-2017-0126577
- <151> 2017-09-28
- <160> 9
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 33
- <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-2 derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa is imidazoacetyldeshistidine

<400> 2

Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Cys

<210> 3

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-2 derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa is imidazoacetyldeshistidine

<400> 3

Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15
 Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 20 25 30
 Asp Lys

<210> 4
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-2 derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa is imidazoacetyldeshistidine
 <400> 4

Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Arg Ile Thr
 20 25 30
 Asp Lys

<210> 5
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLP-2 derivative

<
 220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa is imidazoacetyldeshistidine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (34)
 <223> Xaa is 6-azidolysine
 <400> 5

Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15
 Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 20 25 30
 Asp Xaa

<210> 6
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-2 derivative
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa is imidazoacetyldeshistidine
 <400> 6

Xaa Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Arg Ile Thr
 20 25 30
 Asp Cys

<210> 7
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLP-2 derivative

<
 220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa is imidazoacetyldeshistidine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa is Aib(2-aminoisobutyric acid)
 <400> 7

Xaa Xaa Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15
 Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 20 25 30
 Asp Cys

<210> 8

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-2 derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is Aib(2-aminoisobutyric acid)

<400> 8

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

1 5 10 15
 Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 20 25 30

Asp Cys

<210> 9

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLP-2 derivative

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa = Histidine, imidazoacetyldeshistidine, desaminohistidine,
 beta-hydroxyimidazopropionyl-deshistidine, N-dimethylhistidine, or
 beta-carboxyimidazopropionyl-deshistidine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is Alanine, Glycine, or Aib(2-aminoisobutyric acid)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa is Lysine, or Arginine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)

<223> Xaa is absent, Lysine, Arginine, Glutamine, Histidine,

6-azidolysine, or Cysteine

<400> 9

Xaa Xaa Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Xaa