



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I666219 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：101150930

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 28 日

(51)Int. Cl. : C07K14/605 (2006.01)

A61K47/50 (2017.01)

A61K38/26 (2006.01)

A61P1/04 (2006.01)

(30)優先權：2011/12/30 南韓

10-2011-0147684

(71)申請人：韓美科學股份有限公司 (南韓) HANMI SCIENCE CO., LTD. (KR)

南韓

(72)發明人：金承洙 KIM, SEUNG SU (KR)；林世榮 LIM, SE YOUNG (KR)；鄭聖燁 JUNG, SUNG YOUB (KR)；權世昌 KWON, SE CHANG (KR)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 101646451A

WO 2010107256A2

Roberts MJ et al., "Chemistry for peptide and protein PEGylation",
Advanced Drug Delivery Reviews Volume 54, Issue 4, Pages 459-476,
2002/06/17

Drucker DJ, "Glucagon-Like Peptide 2", The Journal of Clinical
Endocrinology & Metabolism, Volume 86, Issue 4, p1759-1764, 2001

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 37 頁

(54)名稱

使用免疫球蛋白片段之位點專一性 GLP-2 接合物

A SITE-SPECIFIC GLP-2 CONJUGATE USING AN IMMUNOGLOBULIN FRAGMENT

(57)摘要

本發明係關於一種類升糖素胜肽-2(GLP-2)接合物，包含經由非胜肽聚合物共價性連接之原始 GLP-2 或其衍生物與免疫球蛋白 Fc 片段，其中該原始 GLP-2 或其衍生物之 C-端具有硫醇基，以及該非胜肽聚合物之一端連接至除了 GLP-2 之 N-末端胺基以外之 GLP-2 的胺基酸殘基；一種製備該 GLP-2 接合物之方法；一種包含該 GLP-2 接合物之醫藥組成物；以及一種使用該 GLP-2 接合物以治療或預防腸疾病、腸損傷或胃酸過多(gastrosia)之方法。由於本發明 GLP-2 接合物具有顯著增加之 GLP-2 受體結合親和力，顯示延長體內半衰期並增進體外持久性與穩定性。因此，本發明 GLP-2 接合物可以相當低之劑量給藥，並展現增進之藥物依從性，而不使血糖濃度波動。因此，本發明之長效性 GLP-2 接合物可有效用於預防或治療腸疾病、腸損傷或胃酸過多。

The present invention relates to a glucagon-like peptide-2 (GLP-2) conjugate comprising native GLP-2 or its derivative and an immunoglobulin Fc fragment being covalently linked via a non-peptidyl polymer, wherein the native GLP-2 or its derivative has a thiol group introduced at its C-terminal end, and one end of the non-peptidyl polymer is linked to an amino acid residue of the GLP-2 other than the N-terminal amino group thereof; a method for preparing the GLP-2 conjugate; a pharmaceutical composition comprising the same; and a method for treating or preventing intestinal disease, intestinal injury, or gastrosia by using the same. Since the GLP-2 conjugate of the present invention has a remarkably increased binding affinity to a

GLP-2 receptor, it shows a prolonged in vivo half-life and an improved in vivo durability and stability. Thus, the GLP-2 conjugate of the present invention can be administered at a remarkably low dose and exhibit an improvement in drug compliance without fluctuation in blood glucose level. Accordingly, the long-acting GLP-2 conjugate of the present invention can be effectively used for preventing or treating intestinal disease, intestinal injury, or gastrosis.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

使用免疫球蛋白片段之位點專一性 GLP-2 接合物

A SITE-SPECIFIC GLP-2 CONJUGATE USING AN
IMMUNOGLOBULIN FRAGMENT

【技術領域】

【0001】本發明係關於一種類升糖素胜肽-2(GLP-2)接合物，其中，原始 GLP-2 或其衍生物係經由非胜肽聚合物共價性連接至免疫球蛋白 Fc 片段，其中該原始 GLP-2 或其衍生物之 C-端具有硫醇基，以及該非胜肽聚合物及免疫球蛋白 Fc 片段係位點專一性地連接至除了 GLP-2 或其衍生物之 N-末端胺基以外之胺基酸殘基；一種製備該 GLP-2 接合物之方法；一種包含該 GLP-2 接合物之醫藥組成物；以及一種使用該醫藥組成物以治療或預防腸疾病、腸損傷或胃酸過多(gastrosia)之方法。

【先前技術】

【0002】類升糖素胜肽-2 (GLP-2)為一種具有 33 個胺基酸之胜肽荷爾蒙，由腸內分泌 L 細胞於營養攝取後製造出。GPL-2 於小腸和大腸中刺激黏膜增長(DG Burrin 等人，Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279(6): G1249-1256, 2000)，並抑制腸細胞和隱窩細胞(crypt cell)之細胞凋亡(Bernardo Yusta 等人，Gastrpenterology 137(3): 986-996, 2009)。此外，GLP-2 促進小腸之養分吸收(PALLE BJ 等人，Gastrpenterology 120: 806-815, 2001)，以及降低腸通透性(Cameron HL 等人，Am J Physiol Gastrointest

Liver Physiol 284(6): G905-12, 2003)。此外，GLP-2 抑制胃排空和胃酸分泌(Meier JJ 等人，Gastronterology 130(1): 44-54, 2006)，同時增加腸血流速率(Bremholm L 等人，Scand J Gastroenterol. 44(3): 314-9, 2009)和鬆弛腸平滑肌(Amato A 等人，Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 296(3): G678-84, 2009)。

【0003】由於 GLP-2 有能力吸收與保護能量並活化腸細胞功能，已證實於各種體內腸疾病和損傷模式中具有高度治療潛力。作為一種調節營養吸收之荷爾蒙，GLP-2 對於短腸症候群(short bowel syndrome；SBS)之治療具有極大療效。SBS 係由先天性原因或後天之原因引起，係無原因如手術切除腸道，由於小腸吸收面積減少而導致營養缺乏。據報導，在有 SBS 之大鼠模式中，GLP-2 改善消化道營養攝取與吸收(Ljungmann K 等人，Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 281(3): G779-85, 2001)。

【0004】另外，克隆氏症(Crohn' s disease)係一種慢性發炎性腸疾病，可於口腔至肛門間消化道範圍內的任何部位引發。克隆氏症成因仍不明，但一般認為係身體對正常存活於消化道內之細菌細胞產生過度發炎反應伴隨環境和遺傳因素所引起。已知 GLP-2 可預防或緩解黏膜上皮細胞之損傷，尤其針對化療或遺傳因素造成之黏膜炎、腸炎或發炎性腸疾病(Qiang Xiao 等人，Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 278(4): R1057-R1063, 2000)。

【0005】化療引起之腹瀉(Chemotherapy-induced diarrhea；CID)乃侷限抗癌藥物劑量之一因素，且為最常見之抗癌化療副作用。大約 10%患者為末期癌症。約 80%末期癌症患者接受 5-FU (5-氟尿嘧啶，Aducril)/愛萊諾迪肯(Camptosar)之單獨/組合治療後，發生

CID 症狀，且其中約 30%出現 3 至 5 級之嚴重腹瀉症狀。此外，如果黏膜炎或嗜中性球減少症(neutropenia)同時出現於 CID 患者身上，可能會有死亡風險。於 CID 誘發大鼠模式中顯示，GLP-2 減緩 5-FU 誘發之腸重量減輕、絨毛高度和隱窩深度之減少，因而證實其於 CID 治療上之治療潛力(A. Tavakkolizadeh 等人，J Surg Res. 91(1): 77-82, 2000)。

【0006】儘管具有高療效潛力，要將 GLP-2 發展為商業藥物仍有限制。胜肽如 GLP-2 由於穩定性低容易被轉化，會被體內蛋白酶分解並失去活性，且由於其分子量相對較小，容易由腎臟排除。因此，為了維持胜肽藥物之理想血中濃度和力價，需要更頻繁投予胜肽藥物。然而，大多數胜肽藥物以各種類型之注射方式給藥，並需頻繁注射以維持胜肽藥物之血中濃度，導致患者嚴重疼痛。在此方面，已有許多嘗試解決這些問題之方法，其中之一為發展增加胜肽藥物之膜通透性，使胜肽藥物可經口或鼻途徑進入體內之方法。但是，相較於注射方式，此方法具有胜肽藥物傳輸效率低之限制，因此胜肽藥物仍難以維持足夠的生物活性，以作為治療之用。

【0007】特別的是，GLP-2 具有極短之體內半衰期(7 分鐘或更短)，因其胺基酸位置 2 (Ala)與位置 3 (Asp)之間會被二胜肽基胜肽酶 IV (DPP IV)切斷而失活(Bolette H. 等人，The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 85(8): 2884-2888, 2000)。目前已有人嘗試藉由胺基酸取代來增加 GLP-2 之體內半衰期。

【0008】目前，NPS Pharmaceuticals Inc. (U.S.A.)正開發 GLP-2 類似物 “Teduglutide”，以作為克隆氏症、SBS 和胃腸道疾病之治

療藥物，其中原始 GLP-2 之胺基酸位置 2 (Ala) 經天門冬醯胺酸(Asp) 取代。Teduglutide 係由於胺基酸位置 2 經取代，而能抵抗 DPPIV 切割，而增加其穩定性和功效。然而，儘管抵抗 DPPIV 切割之能力增加，但仍不足以延長 Teduglutide 之體內半衰期。因此，Teduglutide 亦需每日注射一次給藥，這對患者而言仍是一大負擔 (WO 2005/067368)。

【0009】 Zealand Pharma (丹麥) 目前正開發 GLP-2 類似物，係以原始 GLP-2 之胺基酸位置 3、8、16、24、28、31、32 和 33 經一或多個胺基酸取代。這些取代不僅增加胜肽穩定性和效力，亦可藉由下述方式選擇性地治療症狀根據取代之位置而使其於小腸之生長促進活性較於結腸中高，反之亦然。此外，Zealand Pharma 正開發 Elsiglutide (ZP1846)，為 GLP-2 類似物，針對胃腸道(GI)-黏膜炎和 CID，而 Elsiglutide 正進行第一期臨床試驗。然而，上述類似物亦不具足夠之體內半衰期，因此需要每日注射一次給藥 (WO 2006/117565)。

【0010】 聚乙二醇(PEG)非專一性結合至標的胜肽之一特定位置或多個位置上，並增加其分子量，藉此防止標的胜肽受腎臟清除和水解，而不引起任何副作用。舉例而言，美國專利第 4,179,337 號揭示了連結降鈣素(calcitonin)與 PEG 之方法，以增進降鈣素之體內半衰期和膜通透性。WO 2006/076471 揭示了增加 B 型鈉利尿胜肽(B-type natriuretic peptide; BNP)(其已使用作為充血性心臟衰竭之治療藥物)之體內半衰期之方法，係藉由以連結至 PEG 而達成。此外，美國專利第 6,924,264 號揭示了增加艾塞那肽-4 (exendin-4)體內半衰期之方法，係以 PEG 連結其離胺酸殘基而

達成。雖然這些方法可藉由連結 PEG 以增加分子量，並延長胜肽藥物之體內半衰期，但 PEG 分子量增加仍存在幾個問題，包括胜肽藥物力價降低，以及 PEG 與胜肽藥物之反應性下降，使產量減少。

【0011】WO 02/46227 揭示一種方法，係以人類血清白蛋白或免疫球蛋白 Fc 區製備 GLP-1、艾塞那肽-4 或其類似物之融合蛋白。美國專利第 6,756,480 號亦揭示一種方法，係用以製備副甲狀腺激素(PTH)或其類似物與免疫球蛋白 Fc 區之融合蛋白。這些方法可解決聚乙二醇化(pegylation)之問題，例如低產量和非專一性，但其增加胜肽藥物體內半衰期之效果不如預期顯著，且有時其力價仍低。欲使胜肽藥物之體內半衰期增加最大化，可使用多種胜肽連接物(linker)，但有誘發免疫反應之風險。另外，若使用具有雙硫鍵之胜肽藥物如 BNP，則錯誤折疊(misfolding)機率高。最終，若使用包含有非自然存在胺基酸之胜肽藥物，則無法以基因重組方式產生其融合蛋白。

【0012】在先前研究中，本發明人開發一種製備具延長體內半衰期之 GLP-2 接合物之方法，其中 GLP-2 接合物係經由非胜肽聚合物，共價性地連接 GLP-2 或其衍生物與免疫球蛋白 Fc 片段而製備。此方法中，GLP-2 衍生物，例如 β -羥基-咪唑基-丙醯基 GLP-2，其 N-端胺基係以羥基取代；去-胺基-組胺醯基 GLP-2，其 N-末端胺基係刪除；以及咪唑基-乙醯基-GLP-2，其第一個組胺酸之 α -碳與其相連之 N-末端胺基係刪除，顯示其抵抗 DPPIV 之能力增加，並維持生物活性，因此 GLP-2 接合物之體內半衰期顯著增加。

【0013】然而，在免疫球蛋白 Fc 片段位點專一性地連接至這些 GLP-2 衍生物之離胺酸殘基之情況下，所得 GLP-2 接合物對 GLP-2 受體顯示顯著降低的結合親和力，因此會有體內效力與持續期降低的問題。

【0014】以尋求可增加血中 GLP-2 之體內半衰期和體內持續期最大化之方法而言，本發明人已開發 GLP-2 接合物，係將其 C-端經導入硫醇基之 GLP-2 衍生物共價性地連接至非胜肽基聚合物與免疫球蛋白 Fc 片段，且發現 GLP-2 接合物對 GLP-2 受體顯現增加的結合親和力，且體內持續期明顯提升。特別的是，已發現當非胜肽聚合物與免疫球蛋白 Fc 片段，係位點專一性地連接至 C-端經導入半胱胺酸殘基之咪唑基-乙醯基-GLP-2 時，其第一個組胺酸之 α -碳與連接至其之 N-端胺基經刪除，造成其抵抗 DPPIV 切割之能力增加，以及咪唑基-乙醯基-GLP-2 接合物之體外效力顯著增加。

【發明內容】

【0015】因此，本發明之一目的係提供具有增加體內療效與穩定性之 GLP-2 結合物。

【0016】本發明之另一目的係提供一種製備 GLP-2 結合物之方法。

【0017】本發明之又一目的係提供一種醫藥組成物，包含作為活性成分之 GLP-2 結合物，以預防或治療腸疾病、腸損傷或胃酸過多。

[發明功效]

【0018】本發明之 GLP-2 結合物具有明顯高之 GLP-2 受體結

合親和力，因而顯示持久之體內療效和延長之體內半衰期。因此，本發明之 GLP-2 接合物可有效用於治療或預防腸疾病、腸損傷或胃酸過多，且給藥頻率明顯較低。

【圖式簡單說明】

【0019】

第 1 圖顯示 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-免疫球蛋白 Fc 接合物之純化情形，係以 Source Phe 管柱純化。

第 2 圖顯示 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-免疫球蛋白 Fc 接合物之純化情形，係以 Source 15Q 管柱純化。

第 3 圖顯示 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-免疫球蛋白 Fc 接合物之純化情形，係以 Source ISO 管柱純化。

第 4 圖顯示逆相 HPLC 之結果，係分析 CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-免疫球蛋白 Fc 接合物之純度。

第 5 圖顯示 GLP-2 衍生物與原始 GLP-2 之體外 GLP-2 受體結合親和力測定結果。

【實施方式】

【0020】本發明之一態樣中，係提供一種類升糖素胜肽-2(GLP-2)接合物，包含經由非胜肽聚合物共價性連接之原始 GLP-2 或其衍生物與免疫球蛋白 Fc 片段，其中該原始 GLP-2 或其衍生物之 C-端經導入硫醇基，以及該非胜肽聚合物之一端連接至除了 GLP-2 或其衍生物之 N-末端胺基以外之胺基酸殘基上。

【0021】使用於此，“類升糖素胜肽-2 (GLP-2)”一詞意指一種經由小腸分泌之激素，一般可促進胰島素之生合成和分泌、抑制升糖素分泌和促進細胞之葡萄糖吸收。GLP-2 經由結合至 GLP-2

受體而具有治療或預防腸疾病、腸損傷或胃酸過多之功能。GLP-2 含有 33 個胺基酸，其原始 GLP-2 胺基酸序列如下：

GLP-2(1-33)

HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (SEQ ID NO: 1)

【0022】本發明之 GLP-2 包括原始形式 GLP-2、其促效劑、衍生物、片段或變體及其類似物。

【0023】使用於此，“GLP-2 促效劑”一詞意指可結合至 GLP-2 受體，而不論其與 GLP-2 之結構相似性如何，並誘發與原始 GLP-2 相同或相似之生理活性之物質。

【0024】使用於此，“GLP-2 片段”一詞意指一胜肽，其具有於原始 GLP-2 之 N-端或 C-端加入或刪除一或多個胺基酸，其中加入之胺基酸可為非自然存在之胺基酸(如 D-胺基酸)。

【0025】在一較佳之實施例中，本發明之 GLP-2 包括在其 C-端具有經導入之硫醇基，其中硫醇基之導入係以於 GLP-2 之 C-端加入半胱胺酸殘基而達成，但不侷限於此。

【0026】使用於此，“GLP-2 變體”一詞意指一胜肽，其具有一或多個異於原始 GLP-2 之胺基酸。就此，可導入非自然存在胺基酸及自然存在胺基酸之取代反應。

【0027】使用於此，“GLP-2 衍生物”一詞意指一胜肽，其與原始 GLP-2 具有至少 80%胺基酸序列同源性，以及意指其中一部分胺基酸殘基可經化學取代(例如， α -甲基化、 α -羥基化)、刪除(例如，脫胺化)或修飾(例如，N-甲基化)之胜肽。較佳之情況為，本發明 GLP-2 衍生物係以取代、刪除或修飾該原始 GLP-2 之 N-端而製備，並可選自於由具有 GLP-2 功能之胜肽、片段與變體組

成之群組。

【0028】更佳之情況為，本發明之 GLP-2 衍生物可選自於由下列化合物組成之群組：

【0029】咪唑基-乙醯基-GLP-2(CA-GLP2)，其中原始 GLP-2 之 N-端第一個組胺酸殘基之 α -碳及連接至其之 N-端胺基經刪除；

【0030】去-胺基-組胺醯基-GLP-2(DA-GLP2)，其中原始 GLP-2 之 N-端胺基經刪除；

【0031】 β -羥基-咪唑基-丙醯基-GLP-2 (OH-GLP-2)，其中原始 GLP-2 之 N-端胺基經羥基取代；

【0032】二甲基-組胺醯基-GLP-2 (DM-GLP-2)，其中原始 GLP-2 之 N-端胺基經二甲基修飾；以及

【0033】 β -羧基-咪唑基-丙醯基-GLP-2 (CX-GLP2)，其中原始 GLP-2 之 N-端胺基經羧基取代。

【0034】尤佳之情況為，GLP-2 衍生物可為 CA-GLP-2，其中原始 GLP-2 之 N-端第一個胺基酸殘基，組胺酸之 α -碳及連接至其之 N-端胺基經刪除。

【0035】在一較佳之實施例中，本發明之 GLP-2 或其衍生物可為一胜肽，其中半胱胺酸殘基係導入至原始 GLP-2 之 C-端、其 N-端之 α -碳和連接至其之胺基經刪除，以及視需要地，第二個胺基酸，丙胺酸經甘胺酸取代。

【0036】本發明之原始 GLP-2 與 GLP-2 衍生物可利用固相合成法或重組技術合成。

【0037】使用於此，“非胜肽聚合物”一詞意指生物可相容聚合物，其包括經胜肽鍵以外之任何共價鍵彼此連接之至少兩個

重複單元。本發明適用之非胜肽聚合物係選自於由聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇與丙二醇共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多醣、葡聚醣、聚乙烯基乙基醚、生物可降解聚合物，如聚乳酸(PLA)與聚乳酸乙醇酸(PLGA)、脂質聚合物、幾丁質、透明質酸及其組合物組成之群組，較佳為聚乙二醇。此外，本發明非胜肽聚合物之範疇包括以上所列聚合物之衍生物，係由習知技藝所知或易於由相關技藝製備。

【0038】融合蛋白所使用之胜肽連接物係以傳統讀框(in-frame)融合法製備，其缺點為易於被水解酶分解，因此由於需使用載體，生理活性胜肽難以獲得明顯增加之體內半衰期。然而，本發明使用之聚合物具有抵抗此水解酶之能力，因此生理活性胜肽之體內半衰期可維持與載體類似。

【0039】因此，任何非胜肽聚合物皆可用於本發明而無侷限，只要其為具有抵抗水解酶能力之聚合物。本發明適用之非胜肽聚合物具有分子量範圍 1 至 100 kDa，且較佳為 1 至 20 kDa。同時，連接至免疫球蛋白 Fc 片段之本發明非胜肽基聚合物可由單一種聚合物或不同種類聚合物之組合組成。

【0040】本發明之非胜肽聚合物具有末端反應性基團，該基團可於 2 端結合免疫球蛋白 Fc 片段和胜肽藥物。非胜肽聚合物之兩末端反應性基團較佳為選自於由反應性乙醛基、丙醛基、丁醛基、馬來醯亞胺基和琥珀醯亞胺衍生物組成之群組。琥珀醯亞胺衍生物之範例為丙酸琥珀醯亞胺基酯、羥基琥珀醯亞胺基、琥珀醯亞胺基羧甲基和碳酸琥珀醯亞胺基酯。非胜肽聚合物之兩末端反應性基可彼此相同或不同。舉例而言，非胜肽聚合物之一末端

可為馬來醯亞胺基，而其另一末端可為乙醛基、丙醛基或丁醛基。以兩末端具羥基之聚乙二醇(PEG)使用作為非胜肽聚合物之情況而言，其中該羥基可經由傳統化學反應活化成各種反應性基團。此外，商業上可購得之具有經修飾反應基團之 PEG，可用於製備本發明之 GLP-2 接合物。

【0041】特別的是，當使用一末端具有醛基且另一末端為馬來醯亞胺基之非胜肽基聚合物時，可使非專一性反應最小化，並可有效地誘導 GLP-2 或其衍生物和免疫球蛋白 Fc 片段結合至非胜肽基聚合物之各末端。經還原性烷基化由醛基鍵結所產生之最終產物，其穩定性更甚於醯胺鍵結之產物。該醛基於低 pH 值時可選擇性地結合至 N-端，但於高 pH 值如 pH 9.0 時，其結合至離胺酸殘基以形成共價鍵。

【0042】在一較佳實施例中，本發明之非胜肽聚合物可於一端具有馬來醯亞胺基以及另一端具有醛基，更佳之情況為，其為一端具有馬來醯亞胺基以及另一端具有醛基之聚乙二醇。

【0043】在本發明中，免疫球蛋白(Ig) Fc 片段適於作為藥物載體，因其於體內為生物可分解。同時，Fc 片段有利於製備、純化和生產其與胜肽藥物形成之複合物，因其分子量相對小於整體免疫球蛋白分子。另外，由於因抗體間之胺基酸序列差異而顯出高度非均一性之 Fab 區，已經移除，Fc 片段具有大幅增加的物質均一性以及誘發血清抗原性的低可能性。

【0044】使用於此，“載體”一詞意指連接於藥物之物質。典型而言，含連接至載體之藥物之複合物大幅降低藥物之生理上活性。然而，為了達到本發明之目的，係使用本發明之載體，以

使有興趣藥物之生理活性降低情況最小化、連接至載體，並降低載體之免疫性，因而可提升藥物之體內穩定性。爲了達成這些目標，本發明使用經非胜肽聚合物修飾之 Fc 片段作爲載體。

【0045】使用於此，“免疫球蛋白 G (IgG)”一詞整體指藉由選擇性作用於抗原而參與身體保護性免疫反應之蛋白質。免疫球蛋白由兩相同輕鏈與兩相同重鏈組成。輕鏈和重鏈包含可變區和恆定區。依據其等之恆定區之胺基酸序列差異，重鏈有五種不同類型： γ 、 μ 、 α 、 δ 與 ϵ 型，且重鏈包括以下子類(subclasses)： $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 與 $\alpha 2$ 。同時，依據其等之恆定區之胺基酸序列差異，輕鏈有兩種類型： κ 與 λ 型(Coleman 等人，Fundamental Immunology, 2nd Ed., 1989, 55-73)。依據重鏈恆定區之特徵，免疫球蛋白可分成五種同型(isotypes)：IgG、IgA、IgD、IgE 與 IgM。IgG 可分爲 IgG1、IgG2、IgG3 與 IgG4 子類。

【0046】免疫球蛋白已知產生數種結構不同之片段，包括 Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd 與 Fc。在這些免疫球蛋白片段中，Fab 含有輕鏈和重鏈之可變區、輕鏈之恆定區和重鏈之第一恆定區(C_{H1})，並具有單一抗原結合位點。由其鉸鏈區於其重鏈 C_{H1} 域之 C-端(羧基端)含有一或多個半胱胺酸殘基之觀點而言，F(ab')片段不同於 Fab 片段。F(ab')₂片段係於 F(ab')片段鉸鏈區之半胱胺酸殘基之間形成雙硫鍵而產生爲 F(ab')片段配對。Fv 爲最小抗體片段，其僅含有重鏈可變區與輕鏈可變區。scfv (單鏈 Fv)片段含有重鏈可變區與輕鏈可變區，係經由胜肽連接物連接彼此，因此以單一多胜肽鏈形式存在。同時，Fd 片段僅含有重鏈之可變區與 C_{H1} 域。

【0047】使用於此，“免疫球蛋白 Fc 片段”一詞意指免疫球蛋白(Ig)分子經木瓜酶(papain)分解之產物，係除了輕鏈可變區(V_L)與恆定區(C_L)，及重鏈可變區(V_H)與恆定區 1(C_H1)以外之免疫球蛋白分子區。Fc 片段可進一步包括位於重鏈恆定區之鉸鏈區。同時，Fc 片段可實質上等同於原始型，或經延伸之 Fc 片段，其中包含部分或全部重鏈恆定區 1(C_H1)與/或輕鏈恆定區 1 (C_L1)，只要其具備改進之功效。此外，Fc 片段可為具備刪除相對較長 C_H2 與/或 C_H3 胺基酸序列部分之片段。較佳之 Fc 片段為 IgG 或 IgM 衍生之 Fc 片段。IgG 衍生之 Fc 片段為更佳，且 IgG2 Fc 與 IgG4 Fc 片段為尤佳。

【0048】本發明之經修飾 Fc 片段可衍生自 IgG、IgA、IgD、IgE 與 IgM 之 Fc 片段之組合物或併合物。“組合物”一詞意指多胜肽之雙體或多體，其中相同來源之單鏈 Fc 片段係連結至不同來源之單鏈 Fc 片段，以形成雙體或多體。“雜合物”一詞意指一多胜肽，其中由不同來源之二或多個域存在於單鏈 Fc 片段。舉例而言，雜合物可由選自於 IgG1 Fc、IgG2 Fc、IgG3 Fc 與 IgG4 Fc 所含之 C_H1、C_H2、C_H3 與 C_H4 域之一至四個域組成。

【0049】依據本發明修飾之 Fc 片段，可衍生自人類或其他動物，包括牛、山羊、豬、小鼠、兔、倉鼠、大鼠與天竺鼠，且較佳為人類。人類衍生性 Fc 片段優於非人類衍生性 Fc 片段，後者可作為人體內之抗原並產生不良免疫反應，如產生新抗體以對抗該抗原。

【0050】依據本發明修飾之 Fc 片段，包括原始胺基酸序列及其序列突變體(變體)。“胺基酸序列突變體”一詞，意指原始胺

基酸序列之一或更多個胺基酸殘基，經刪除、插入、非保留性或保留性取代或其組合，而具有不同序列。蛋白質或胜肽經胺基酸交換而不改變蛋白質或胜肽活性，為已知技術(H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979)。最常發生之交換為 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu 與 Asp/Gly 之雙方互換。此外，Fc 片段可視需求經由磷酸化、硫化、丙醯基化、糖基化、甲基化、法尼基化(farnesylation)、乙醯化、醯胺化及其類似作用修飾。

【0051】胺基酸變體可為具有生物活性與原始蛋白相同之功能相等物，或者視需求可藉由改變原始形式之特性而製作。舉例而言，變體可具有對抗熱、pH 值等之增加的結構穩定性，或改變與修飾其原始胺基酸序列而增加溶解性。舉例而言，IgG Fc 片段中，已知結合作用之重要胺基酸殘基位於位置 214 至 238、297 至 299、318 至 322，或 327 至 331，可作為修飾作用之適用標的。此外，可能有其他各種衍生物，包括刪除可形成雙硫鍵之區域者，或者原始 Fc 形式 N-端之某些胺基酸殘基經去除者，或加入甲硫胺酸殘基者。此外，欲移除起效子之功能，補體結合位點，如 C1q 結合位點和 ADCC 位點，可能進行刪除作用。製備此免疫球蛋白 Fc 片段之序列衍生物之技術，係揭示於國際專利公開號 WO97/34631 與 WO96/32478 及其類似文獻。

【0052】依據本發明修飾之 Fc 片段，可得自人類和其他動物所單離之原始形式，或得自重組技術之經轉形動物細胞或微生物。

【0053】依據本發明修飾之 Fc 片段，其形式可為具有原始糖

鏈、相較於原始形式其糖鏈增加，或相較於原始形式其糖鏈減少，或者可為去糖基化形式。經糖基化作用之 Fc 片段具有誘發免疫反應之高度風險，因其補體依賴性細胞毒性(CDC)活性強於其非糖基化形式。因此，就本發明目的而言，較佳為非糖基化或去糖基化之 Fc 片段。

【0054】使用於此，“去糖基化 Fc 片段”一詞意指 Fc 片段之糖基部分經人為移除，而“非糖基化 Fc 片段”一詞意指 Fc 片段以未被糖基化形式，經由原核生物產生，原核生物較佳為大腸桿菌。Fc 片段糖鏈之增加、減少或移除之方法可由習知技藝達成，例如化學方法、酵素方法和利用微生物之基因工程方法。

【0055】重組 Fc 片段由於其三維結構異於原始形式具有增加的酵素敏感性。同時，相較於原始 IgG，非糖基化 IgG 對於蛋白水解酶(胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶)為高度敏感(Morrison 等人，J. Immunology 143: 2595-2601, 1989)。重組 Fc 片段具有與原始 Fc 經木瓜酶處理後相同之 FcRn 結合親和力，但原始 Fc 片段之血清半衰期較長於重組 Fc 片段 2 至 3 倍(Eur. J. Immunology 29: 2819-2825, 1999)。依據本發明修飾之 Fc 片段，其酵素切割位點係受非胜肽基聚合物保護。此保護作用防止由於 Fc 片段對水解酶之高度敏感，而降低其體內半衰期之情況。

【0056】本發明所使用之 GLP-2 可於不同位點連接至非胜肽聚合物上。當 GLP-2 經連接至對於胜肽之生理活性相當重要之 N 端，以外之位點時，反應性硫醇基可被導入至原始 GLP-2 胺基酸序列之欲修飾胺基酸殘基，並於 GLP-2 之硫醇基與非胜肽聚合物之馬來醯亞胺基或醛基之間形成共價鍵。

【0057】當使用非胜肽聚合物之醛基時，其可與 N-端或離胺酸殘基之胺基反應。此時，可使用經修飾形式之 GLP-2，以選擇性增加反應產量。舉例而言，經由保護 GLP-2 之 N-末端、以其他胺基酸取代離胺酸殘基以及於其 C-末端導入胺基，可維持僅有一個胺基可與非胜肽聚合物於希望之位點反應，因而增加聚乙二醇化(pegylation)和偶合反應之產量。保護 N 末端之方法可包括二甲基化、甲基化、脫胺反應、乙醯化其及類似反應，但不侷限於此。

【0058】在本發明之一較佳實施例中，爲了誘導 GLP-2 之 C-末端胺基酸殘基之選擇性聚乙二醇化，係將半胱胺酸殘基導入 GLP-2 衍生物之 C-末端，並隨即以具有馬來醯亞胺基之 PEG，連接至 GLP-2 之 C-末端之半胱胺酸殘基。尤其是已發現，其中免疫球蛋白 Fc 片段係位點專一性地連接至咪唑基-乙醯基-GLP-2 (CA-GLP-2)之 C-末端(其第一個組胺酸 α -碳與相連接之 N-末端胺基係經刪除)之 GLP-2 接合物，相較於長效型 GLP-2 衍生物(其中免疫球蛋白 Fc 片段連接至原始離胺酸殘基)，顯示增加的 GLP-2 受體之結合親和力(請見第 5 圖)。

【0059】在另一實施例中，本發明提供一種製備 GLP-2 接合物之方法，包含以下步驟：

【0060】1)將兩末端具有反應性基團之非胜肽基聚合物共價性地連接至原始 GLP-2 或其衍生物之胺基或硫醇基，其中反應性基團係選自於由醛、馬來醯亞胺和琥珀醯亞胺衍生物組成之群組，且其中 GLP-2 或其衍生物之 C-末端係經導入硫醇基；

【0061】2) 由步驟 1)之反應混合物單離包含非胜肽基聚合物和 GLP-2 或其衍生物之複合物，其中非胜肽基聚合物係共價性

地連接至 GLP-2 或其衍生物之除了 N-末端胺基團以外之胺基酸殘基；以及

【0062】 3) 共價性地連接免疫球蛋白 Fc 片段至步驟 2) 所分離出之複合物之非胜肽聚合物之另一端，因此產生包含免疫球蛋白 Fc 區、非胜肽聚合物和 GLP-2 或其衍生物之 GLP-2 接合物，其中非胜肽聚合物之一端，係共價性地連接至免疫球蛋白 Fc 片段，且另一端係共價性地連接至 GLP-2 或其衍生物。

【0063】 使用於此，“複合物”一詞意指非胜肽聚合物與 GLP-2 衍生物彼此共價性地相連接之中間物。之後，非胜肽聚合物未連接至 GLP-2 衍生物之另一端，係連接至免疫球蛋白 Fc 片段。

【0064】 步驟 1) 係共價性地連接 GLP-2 或其衍生物至非胜肽聚合物之一端。較佳之情況為，GLP-2 或其衍生物可為具有如 SEQ ID NO: 1 胺基酸序列之原始 GLP-2，或其具有硫醇基經導入於 GLP-2 或其衍生物之 C-末端之 N-末端衍生物。較佳之情況為，GLP-2 衍生物可為 CA-GLP-2、DA-GLP2、OH-GLP2、DM-GLP-2 或 CX-CLP-2。更佳之情況為，GLP-2 衍生物可為 CA-GLP-2，其中半胱胺酸殘基係經導入其 C-末端。

【0065】 在步驟 1) 中，非胜肽聚合物兩端之反應性基團可相同或不同。較佳之情況為，非胜肽聚合物之一端具有馬來醯亞胺基，而另一端具有醛基。

【0066】 此外，步驟 1) 之非胜肽聚合物係共價性地連接至 GLP-2 或其衍生物之 N-末端以外之胺基酸殘基，較佳為經導入至 GLP-2 或其衍生物之 C-末端之半胱胺酸殘基之硫醇基。在選擇性位點專一性地將非胜肽聚合物連接至 GLP-2 或其衍生物之硫醇基

時，步驟 1)之 GLP-2 或其衍生物與非胜肽聚合物間之反應可於 pH 2 至 4 進行，較佳為 pH 3。此時，此反應 GLP-2 或其衍生物與非胜肽聚合物之莫耳比範圍可為 1:2 至 1:10，但不侷限於此。

【0067】若有需要，步驟 1)之反應可於還原劑存在下進行，並依據非胜肽聚合物兩端之反應性基團類型而定。反應所適用之還原劑可包括氰基硼氫化鈉 (sodium cyanoborohydride ; NaCNBH_3)、硼氫化鈉、二甲基胺硼酸鹽或吡啶硼酸鹽。

【0068】步驟 2)係由步驟 1)之反應混合物中所單離之 GLP-2-非胜肽聚合物之複合物，其中 GLP-2 或其衍生物係共價性地連接至非胜肽聚合物之一端。考量標的蛋白質之物理特性，如純度、分子量和淨電荷，步驟 2)之單離反應可適當選取習知技藝中常見的方法進行蛋白質之純化與分離。舉例而言，可使用多種常見方法，包括尺寸排阻層析法和離子交換層析法，且若有需要，可搭配使用以增加經純化標的物之產量。

【0069】步驟 3)係進行步驟 2)單離出之複合物(GLP-2-非胜肽聚合物)與免疫球蛋白 Fc 片段之間的反應，以共價性地連接免疫球蛋白 Fc 片段至複合物所含非胜肽聚合物之另一端。

【0070】在步驟 3)中，GLP-2-非胜肽聚合物之複合物與免疫球蛋白 Fc 片段間之反應可於 pH 5.0 至 8.0，較佳為 pH 6.0 進行。此時，此反應中 GLP-2-非胜肽聚合物之複合物與免疫球蛋白 Fc 片段之莫耳比範圍可由 1:2 至 1:10，較佳為 1:4 至 1:8。

【0071】若有需要，步驟 3)之反應可於還原劑存在下進行，並依據非胜肽聚合物兩端之反應性基團類型而定。反應所適用之還原劑可包括氰基硼氫化鈉(NaCNBH_3)、硼氫化鈉、二甲基胺硼酸

鹽或吡啶硼酸鹽。

【0072】在一較佳實施例中，本發明製備 GLP-2 接合物之方法包含以下步驟：

【0073】1)共價性地連接一端具有馬來醯亞胺基團及於另一端具有醛基之非胜肽聚合物至原始 GLP-2 或其衍生物之硫醇基，且其中硫醇基係經導入至其 C-末端；

【0074】2)由步驟 1)之反應混合物單離出包含非胜肽聚合物和 GLP-2 或其衍生物之複合物，其中非胜肽聚合物係共價性地連接至 GLP-2 或其衍生物之硫醇基；以及

【0075】3)共價性地連接免疫球蛋白 Fc 片段至步驟 2)所單離之複合物之非胜肽聚合物之另一端，因此產生包含免疫球蛋白 Fc 區、非胜肽聚合物和 GLP-2 或其衍生物之 GLP-2 接合物，其中非胜肽聚合物之一端係共價性地連接至免疫球蛋白 Fc 片段，而另一端係共價性地連接至 GLP-2 或其衍生物。

【0076】在又一觀點中，本發明提供一種醫藥組成物，包含作為活性成分之 GLP-2 接合物。

【0077】本發明之醫藥組成物可用於預防或治療一或多種選自於由腸疾病、腸損傷與胃酸過多組成之疾病。尤其是，本發明之醫藥組成物可用於預防或治療之疾病包括，但不侷限於 GI 疾病，包括 SBS、發炎性腸疾病(IBD)、克隆氏症、結腸炎、胰腺炎、迴腸炎、發炎性腸阻塞、癌症化療與/或放射線治療造成之黏膜炎、全胃腸道外營養或局部缺血造成之胃萎縮、骨骼障礙、兒科胃腸道(GI)失調包括腸衰竭誘發之新生兒壞死性腸炎，及其類似疾病。

【0078】使用於此，“預防”一詞意指涵蓋經由投予本發明之醫藥組成物，可抑制或延緩上述疾病如腸疾病、腸損傷與胃酸過多之發生或進程之所有作用。

【0079】本文中“治療”一詞意指涵蓋經由投予本發明醫藥上組成物，可改善或有益於改變上述疾病如腸疾病、腸損傷與胃酸過多之症狀之所有作用。

【0080】本發明之醫藥上組成物包含作為活性成分之長效性 GLP-2 接合物，其具備延長之體內半衰期，以及經本發明所增進之體內功效與穩定性，因此可明顯減少給藥劑量，並展現增進之藥物依從性，而不使血糖濃度波動。因此，本發明之醫藥上組成物可有效用於預防與治療腸疾病、腸損傷或胃酸過多。

【0081】本發明之醫藥組成物可更包含醫藥上可接受之載體。針對口服給藥，醫藥上可接受之載體可包括粘合劑、潤滑劑、分解劑、賦形劑、增溶劑、分散劑、穩定劑、懸浮劑、著色劑和香料。針對注射給藥，醫藥上可接受之載體可包括緩衝劑、防腐劑、鎮痛劑、增溶劑、等張劑和穩定劑。針對局部給藥，醫藥上可接受之載體可包括基劑、賦形劑、潤滑劑和防腐劑。

【0082】本發明之醫藥組成物可結合前述醫藥上可接受之載體而配製成多種劑型。舉例而言，針對口服給藥，醫藥組成物可配製成片劑、錠劑、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿或粉片。針對注射給藥，醫藥上組成物可配製成單劑量劑型或單位劑型之安瓿，例如多劑量貯劑。醫藥組成物亦可配製成溶液、懸浮液、片劑、丸劑、膠囊和長效製劑。

【0083】另一方面，本發明之醫藥組成物之適用載體、賦形

劑和稀釋劑之範例，可包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、麥芽糖醇、澱粉、阿拉伯膠、海藻酸鹽、明膠、磷酸鈣、矽酸鈣、纖維素、甲基纖維素、微晶纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羥基苯甲酸甲基酯、羥基苯甲酸丙基酯、滑石、硬脂酸鎂和礦物油。此外，本發明之醫藥組成物可進一步包括充填劑、抗凝結劑、潤滑劑、保濕劑、香料和防腐劑。

【0084】本發明之醫藥組成物可經由任一常見途徑給藥，只要其能到達所希望之組織。各種給藥方式均列入考慮，包括腹腔、靜脈、肌內、皮下、皮內、口服、局部、鼻內、肺內和直腸內，但不侷限於此。

【0085】然而，由於經口服給藥會使胜肽被分解，故口服給藥之醫藥組成物之有效成分須經包覆或配製，以保護其免於胃中降解。較佳之情況為，本發明之醫藥組成物可經注射形式給藥。此外，本發明醫藥組成物之給藥，可使用特定設備以傳輸有效成分進入標的細胞。

【0086】本發明醫藥組成物之投藥頻率與劑量可由數個相關因子決定，包括待治療之疾病類型、給藥途徑、患者年齡、性別、體重與病情嚴重性，以及作為有效成分之藥物種類。然而，劑量之增加或減少係依據給藥途徑、病情嚴重性和患者性別、體重、年齡而定，因此並未侷限本發明之範疇。由於展現極佳之體內持久性與力價，本發明之醫藥組成物可明顯降低給藥頻率。本發明之醫藥組成物具有極佳之體內耐久性與穩定性，以及延長之體內半衰期，可明顯降低藥物之給藥頻率與劑量。

【0087】依據又一態樣，本發明提供一種預防或治療腸疾

病、腸損傷或胃酸過多之方法，包含投予治療有效量之長效性 GLP-2 接合物至有需求之個體。

【0088】使用於此，“給藥”一詞意指以合適之方式將有效成分導入至患者。只要有效成分可到達標的組織，任何給藥方式皆可採用。給藥途徑之範例包括腹腔、靜脈、肌內、皮下、皮內、口服、局部、鼻內、肺內和直腸內給藥，但不侷限於此。然而，由於經口服給藥會使胜肽被分解，故口服給藥之醫藥組成物之有效成分須經包覆或配製，以保護其免於胃中降解。較佳之情況為，有效成分可配製成注射形式。此外，長效性接合物可輔以任何可傳輸有效成分進入標的細胞之裝置以進行投藥。

【0089】待治療之個體範例包括人類、猿、牛、馬、羊、豬、雞、火雞、鵪鶉、貓、狗、小鼠、大鼠、兔和天竺鼠，但不侷限於此。較佳之個體為哺乳類動物，特別是人類。

【0090】有效成分文中所使用“治療有效量”一詞意指足以預防或治療疾病，亦即腸疾病、腸損傷或胃酸過多之一定量，並具有合理之效益/風險比，以用於醫療。

【0091】本發明之長效性 GLP-2 接合物，顯示具有延長之體內半衰期及增進之體內持久性與穩定性。因此，本發明之長效性 GLP-2 接合物可以明顯低劑量給藥，並展現增進之藥物依從性而不使血糖濃度波動。因此，本發明之長效性 GLP-2 接合物可有效用於預防或治療腸疾病、腸損傷或胃酸過多。

【0092】本發明以下列實例進一步說明。然而，應瞭解這些實例僅用於具體闡述本發明，而不可被理解為其以任何形式侷限本發明。

實例 1: 咪唑基-乙醯基-GLP-2 之聚乙二醇化作用

【0093】咪唑基-乙醯基-GLP-2 (CA-GLP-2, A2G, 34C, American Peptide, U.S.A.)係與 10K MAL-PEG-ALD PEG (異雙官能 PEG, 兩端各具有馬來醯亞胺與醛基, NOF Inc., Japan)反應, 以使 CA-GLP-2 之位置^{原本只有33nt}34^{額外新增}之半胱氨酸殘基(Cys34)聚乙二醇化。於此, CA-GLP-2 與 PEG 之莫耳比為 1:3, 且反應於室溫進行 3 小時, 其中勝肽濃度為 3.5 mg/mL。此外, 反應於 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液中並於 20 mM 氰基硼氫化鈉(SCB)還原劑存在下進行。反應完成後, 所得產物, 單-聚乙二醇化 CA-GLP-2-PEG 複合物, 係以 SOURCE S 管柱(LRC25, Pall Corporation)於下列條件進行層析純化。

管柱: SOURCE S (LRC25, Pall Corporation)

流速: 4.0 ml/分

梯度: 沖提液 B 0% → 40%進行 240 分鐘(A: 20 mM 檸檬酸, pH 2.0 + 45%乙醇, B: A + 1 M KCl)

實例 2: 咪唑基-乙醯基-GLP-2(A2G, 34C)-PEG-免疫球蛋白 Fc 接合物之製備

【0094】將前述經純化之單-聚乙二醇化 CA-GLP-2 (A2G, 34C)複合物與免疫球蛋白(IgG) Fc 片段(韓國專利申請案第 10-725315 號), 以莫耳比 1:6 混合, 接著於 4°C 反應 20 小時, 其中勝肽濃度為 20 mg/mL。此時, 反應於 100 mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH 6.0)中, 並於 20 mM SCB(作為還原劑)存在下進行。反應完成後, 將反應混合物進行三步驟層析純化, 係利用 SOURCE Phe 管柱(XK16, GE Healthcare)、SOURCE 15Q 管柱(LRC25, Pall Corporation)和 SOURCE ISO 管柱(HR16, GE Healthcare)於下列條件

中進行。

管柱：SOURCE Phe (XK16, GE Healthcare)

流速：2.0 ml/分

梯度：沖提液 B 100% → 0% (A：20 mM Tris，pH 8.0；B：A + 2.6 M NaCl)

管柱：SOURCE 15Q (LRC25, Pall Corporation)

流速：5.0 ml/分

梯度：沖提液 B 0% → 30%進行 120 分鐘(A：20 mM Tris-HCl，pH 8.0；B：A + 1 M NaCl)

管柱：SOURCE ISO (HR16, GE Healthcare)

流速：2.0 ml/分

梯度：沖提液 B 100% → 0%進行 100 分鐘(A：20 mM Tris-HCl，pH 8.0；B：A + 1.1 M 硫酸銨)

【0095】SOURCE Phe 管柱、SOURCE 15Q 管柱和 SOURCE ISO 管柱之各純化狀況，分別如第 1 圖、第 2 圖與第 3 圖所示。經由逆相 HPLC 分析之結果，CA-GLP-2 (A2G, 34C)-10K PEG-Fc 接合物純化後之純度為 94.2% (第 4 圖)，且其產率為 12.5%。

實例 3: CA-GLP-2 (A2G, 34C)-10K PEG-Fc 接合物對於 GLP-2 受體之體外結合親和力測定

【0096】欲測定實例 2 製備之 CA-GLP-2 (A2G, 34C)-10K PEG-Fc 接合物(在下文中，以“GLP-2 接合物”表示)之效用，係使用以下所示方法測定體外細胞活性。此方法中，中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株 CHO/hGLP-2R 經轉形以表達編碼人類 GLP-2 受體之基因。

【0097】 CHO/hGLP-2R 細胞經繼代培養，每週 2 至 3 次，並以濃度 1×10^5 細胞/培養孔接種於 96-孔培養盤中，接著培養 24 小時。隨後，經培養之 CHO/hGLP-2R 細胞係分別以濃度 1000 至 0.002 nM 之原始 GLP-2；濃度 10000 至 0.02 nM 之原始 GLP-2 長效性製劑 (GLP-2-PEG-Fc 接合物，LAPS-GLP-2)；濃度 10000 至 0.02 nM 之經離胺酸專一性接合之 GLP-2 衍生物長效性製劑 (LAPS-DA-GLP-2、LAPS-CA-GLP-2、LAPS-OH-GLP-2)；以及濃度 10000 至 0.02 nM 之經 C-末端半胱胺酸專一性接合之 GLP-2 衍生物長效性製劑 (LAPS-CA-GLP-2 (A2G, 34C)) 處理。作為訊息傳遞之第二信使之 cAMP 於經各化合物處理之 CHO/hGLP-2R 細胞中之細胞內含量，係以 cAMP 分析套件 (MD, USA) 測定，並以 VICTOR LIGHT 光度計 (PerkinElmer Life Sciences) 分析螢光素酶活性。亦測量各化合物之 EC_{50} 值。

【0098】如第 5 圖所示，經離^(Lys)胺酸專一性接合之 GLP-2 衍生物長效性製劑 (LAPS-[?]DA-GLP-2、LAPS-[?]CA-GLP-2、LAPS-[?]OH-GLP-2) 之體外活性，低於原始 GLP-2 長效性製劑 (LAPS-GLP-2) (2.6 至 7.5% 與 8.6%)。相反地，經 C-末端半胱胺酸專一性接合之 GLP-2 衍生物長效性製劑 (LAPS-CA-GLP-2 (A2G, 34C)) 之體外活性，高於原始 GLP-2 長效性製劑 (LAPS-GLP-2) (相較於原始 GLP-2 為 9.9%)。

【0099】這些結果已證實，GLP-2 接合物 (其中非胜肽聚合物之一端共價性地連接至 GLP-2 衍生物之 C-末端，而另一端共價性地連接至免疫球蛋白 Fc 片段)，與先前之 GLP-2 接合物相較，顯示出增進之 GLP-2 受體結合親和力，因此可延長體內半衰期並改善體內持久性與穩定性。

【0100】本說明書所使用之特定術語係僅用於描述特定實施例，且不可視為侷限本發明。本說明書所使用之單數形式包括複數形式，除非其明顯表達相反意義。本說明書所使用之“包括”或“具有”目的係體現特定屬性、區域、整數、步驟、操作、元件與/或成分，但不可視為排除存在或增加其他屬性、區域、整數、步驟、操作、元件、成分與/或群組。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 韓美科學股份有限公司(HANMI SCIENCE CO., LTD.)

<120> 使用免疫球蛋白片段之位點專一性 GLP-2 接合物
(A SITE-SPECIFIC GLP-2 CONJUGATE USING AN IMMUNOGLOBULIN
FRAGMENT)

<130> OPA12175

<150> KR10-2011-0147684

<151> 2011-12-30

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> 智人(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

公告本

發明摘要

I666219

※申請案號：101150930

※申請日：101-12-28

C07K14/605(2006.01)

※IPC 分類：A61K47/48(2006.01)

A61K38/26(2006.01)

A61P1/04(2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

使用免疫球蛋白片段之位點專一性 GLP-2 接合物

A SITE-SPECIFIC GLP-2 CONJUGATE USING AN

IMMUNOGLOBULIN FRAGMENT

【中文】

本發明係關於一種類升糖素胜肽-2(GLP-2)接合物，包含經由非胜肽聚合物共價性連接之原始 GLP-2 或其衍生物與免疫球蛋白 Fc 片段，其中該原始 GLP-2 或其衍生物之 C-端具有硫醇基，以及該非胜肽聚合物之一端連接至除了 GLP-2 之 N-末端胺基以外之 GLP-2 的胺基酸殘基；一種製備該 GLP-2 接合物之方法；一種包含該 GLP-2 接合物之醫藥組成物；以及一種使用該 GLP-2 接合物以治療或預防腸疾病、腸損傷或胃酸過多(gastrosia)之方法。由於本發明 GLP-2 接合物具有顯著增加之 GLP-2 受體結合親和力，顯示延長體內半衰期並增進體外耐久性與穩定性。因此，本發明 GLP-2 接合物可以相當低之劑量給藥，並展現增進之藥物依從性，而不使血糖濃度波動。因此，本發明之長效性 GLP-2 接合物可有效用於預防或治療腸疾病、腸損傷或胃酸過多。

【英文】

The present invention relates to a glucagon-like peptide-2 (GLP-2) conjugate comprising native GLP-2 or its derivative and an immunoglobulin Fc fragment being covalently linked via a non-peptidyl polymer, wherein the native GLP-2 or its derivative has a thiol group introduced at its C-terminal end, and one end of the non-peptidyl polymer is linked to an amino acid residue of the GLP-2 other than the N-terminal amino group thereof; a method for preparing the GLP-2 conjugate; a pharmaceutical composition comprising the same; and a method for treating or preventing intestinal disease, intestinal injury, or gastrosia by using the same. Since the GLP-2 conjugate of the present invention has a remarkably increased binding affinity to a GLP-2 receptor, it shows a prolonged *in vivo* half-life and an improved *in vivo* durability and stability. Thus, the GLP-2 conjugate of the present invention can be administered at a remarkably low dose and exhibit an improvement in drug compliance without fluctuation in blood glucose level. Accordingly, the long-acting GLP-2 conjugate of the present invention can be effectively used for preventing or treating intestinal disease, intestinal injury, or gastrosia.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

由於本案的圖為實驗數據，並非本案的代表圖。故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式

申請專利範圍

1. 一種類升糖素胜肽-2(GLP-2)接合物，包含經由非胜肽聚合物共價性連接之 GLP-2 衍生物與免疫球蛋白 Fc 片段，其中該衍生物具有 C-末端硫醇基，以及該非胜肽聚合物之一端共價性地連接至該衍生物之該 C-末端硫醇基，其中該 GLP-2 衍生物係以於原始 GLP-2 之 N-末端胺基進一步進行取代、刪除或修飾之方式製備，並具有與 GLP-2 受體結合之功能以及抵抗 DPP IV 切斷。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之 GLP-2 接合物，其中該衍生物之 C-末端硫醇基，係以將半胱胺酸結合至該 GLP-2 的 C-末端之方式導入。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之 GLP-2 接合物，其中該 GLP-2 之衍生物係選自於由下列所組成之群組：經由移除位於原始 GLP-2 之 N-末端第一個胺基酸位置組胺酸之 α -碳以及相連至其之 N-末端胺基所製備之 GLP-2 衍生物；經由刪除原始 GLP-2 之 N-末端胺基所製備之 GLP-2 衍生物；以羥基取代原始 GLP-2 之 N-末端胺基所製備之 GLP-2 衍生物；以二甲基修飾原始 GLP-2 之 N-末端胺基所製備之 GLP-2 衍生物；以及以羧基取代原始 GLP-2 之 N-末端胺基所製備之 GLP-2 衍生物。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之 GLP-2 接合物，其中該非胜肽聚合物之一端係共價性地連接至該免疫球蛋白 Fc 片段，以及另一端係共價性地連接至該衍生物之硫醇基。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之 GLP-2 接合物，其中該非胜肽聚合物係選自於由聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇與丙二醇之共聚

- 物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多醣、葡聚醣、聚乙烯基乙醚、生物可降解聚合物、脂質聚合物、幾丁質、透明質酸及其組合物所組成之群組。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之 GLP-2 接合物，其中該非胜肽聚合物之兩末端皆具有選自於由乙醛基、丙醛基、丁醛基、馬來醯亞胺基和琥珀醯亞胺衍生物所組成群組之反應性基團。
 7. 如申請專利範圍第 6 項所述之 GLP-2 接合物，其中該琥珀醯亞胺衍生物係選自於由丙酸琥珀醯亞胺酯、琥珀醯亞胺基羧甲基、羥基琥珀醯亞胺基，以及碳酸琥珀醯亞胺基酯所組成之群組。
 8. 如申請專利範圍第 6 項所述之 GLP-2 接合物，其中該非胜肽聚合物之一端具有馬來醯亞胺基，以及另一端具有乙醛基。
 9. 如申請專利範圍第 1 項所述之 GLP-2 接合物，其中該免疫球蛋白 Fc 片段為非糖基化。
 10. 如申請專利範圍第 1 項所述之 GLP-2 接合物，其中該免疫球蛋白 Fc 片段由選自於由 CH1、CH2、CH3 與 CH4 域所組成之群組之 1 至 4 個域構成。
 11. 如申請專利範圍第 10 項所述之 GLP-2 接合物，其中該免疫球蛋白 Fc 片段更包含鉸鏈區。
 12. 如申請專利範圍第 1 項所述之 GLP-2 接合物，其中該免疫球蛋白 Fc 片段衍生自 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM。
 13. 如申請專利範圍第 12 項所述之 GLP-2 接合物，其中該免疫球蛋白 Fc 片段之每一域皆為源自不同免疫球蛋白之域的雜合物，該不同免疫球蛋白選自於由 IgG、IgA、IgD、IgE 和 IgM

所組成之群組。

14. 如申請專利範圍第 12 項所述之 GLP-2 接合物，其中該免疫球蛋白 Fc 片段為由包含源自於相同免疫球蛋白之域之糖基化免疫球蛋白之雙體或多體構成。
15. 如申請專利範圍第 12 項所述之 GLP-2 接合物，其中該免疫球蛋白 Fc 片段為 IgG4 Fc 片段。
16. 如申請專利範圍第 15 項所述之 GLP-2 接合物，其中該免疫球蛋白 Fc 片段為人類非糖基化 IgG4 Fc 片段。
17. 一種製備申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項所述之 GLP-2 接合物之方法，包含有：
 - 1) 將其兩末端具有，選自於由乙醛、馬來醯亞胺和琥珀醯亞胺衍生物所組成之群組之反應性基團之非胜肽聚合物，共價性地連接至 GLP-2 衍生物之 C-末端硫醇基；
 - 2) 自步驟 1) 之反應混合物中單離複合物，其中該非胜肽聚合物係共價性地連接至該衍生物之該 C-末端硫醇基；
 - 3) 共價性地連接該複合物之非胜肽聚合物之另一端至免疫球蛋白 Fc 片段；以及
 - 4) 自步驟 3) 之反應混合物中單離 GLP-2 接合物，其中該非胜肽聚合物之兩端係分別連接至該免疫球蛋白 Fc 片段以及該衍生物之 C-末端硫醇基，其中該 GLP-2 衍生物係以於原始 GLP-2 之 N-末端胺基進一步進行取代、刪除或修飾之方式製備，並具有與 GLP-2 受體結合之功能以及抵抗 DPP IV 切斷。
18. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中步驟 1) 之該衍生物

與該非胜肽聚合物，係於 pH 2 至 4 之條件下，以莫耳比 1:2 至 1:10 進行反應。

19. 一種醫藥組成物，包含有申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項所述之 GLP-2 接合物作為活性成分，以預防或治療一或多種疾病，該疾病選自於腸疾病、腸損傷，以及胃酸過多。
20. 一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項所述之 GLP-2 接合物用於製備藥劑以預防或治療一或多種疾病之用途，該疾病選自於腸疾病、腸損傷和胃酸過多。