명세서

발명의 명칭: GLP-2의 지속형 결합체의 액상 제제

기술분야

[1] 본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)의 지속형 결합체의 액상 제제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)는 섭취된 영양분에 반응하여 소장의 L-세포에서 생성되는 33개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서, 장질환, 장손상 및 위질환의 치료제로서 유망한 가능성을 보여왔다.

[3] 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. 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 본 발명자들은 GLP-2의 지속형 결합체를 개발하였다(한국공개공보 제10-2010-0104382호).

[4] 다만, GLP-2의 지속형 결합체를 장시간 동안 보관할 수 있는 안정한 액상 제제의 개발이 여전히 요구된다. 구체적으로 GLP-2의 지속형 결합체가 포함된 약물을 제품으로 공급하기 위해서는 저장 운송 과정에서 빛, 열, 또는 첨가제 내 불순물에 의해 유도된 열화에 의한 변성, 응집, 흡착 또는 가수분해 등의 물리화학적인 변화를 억제하면서 생체 내 효력을 유지시키는 것이 필수적이다. 액상 제제의 온도, pH, 첨가제 등이 분해 산물의 생성 속도에 영향을 미치지만 현재까지 모든 단백질을 안정화시켜 임상에 적용할 수 있게 하는 조성은 아직 알려져 있지 않고 있으며, 특정 단백질에서 안정화 효과를 나타내는 액상 조성이 다른 단백질의 안정화에는 적용되지 않는 경우가 많다. 목적의 단백질의 액상에서의 안정성을 극대화시키기 위해서 단백질의 특이 분해 산물 생성 속도를 최소화시킬 수 있는 인자 및 첨가제의 선정 및 이들의 조합이 광범위하게 선행되어야 할 필요가 있음이 당업계에 알려져 있다.

[5] 특히, 생체 내 지속성 및 안정성을 높인 GLP-2의 지속형 결합체의 경우,

생리활성 펩타이드인 GLP-2와 면역글로불린 Fc 절편이 결합된 형태이므로 분자량 및 부피가 GLP-2보다 매우 증가하여, 단백질을 안정화하기 위한 특별한 조성이 요구된다. 또한, 생리활성 펩타이드인 GLP-2와 면역글로불린 Fc 절편은 각각 물리 화학적 특성이 다른 펩타이드 또는 단백질이므로, 생리활성 펩타이드인 GLP-2와 면역글로불린 Fc 절편을 동시에 안정화하여야 한다. 그러나, 상이한 펩타이드 또는 단백질들은 그들의 물리 화학적 차이점으로 인해, 저장 동안 상이한 비율 및 상이한 조건하에서 점진적으로 비활성화될 수 있고, 각각의 펩타이드 또는 단백질에 적합한 안정화제들을 병용하는 경우 상호 간의 경쟁 작용 및 부작용으로 인하여 목적한 바와 다른 역효과를 가져올 수 있다. 또한, 저장하는 동안 저장된 단백질의 본질이 변화하거나 농도가 변화하기 때문에 상이한 효과를 나타낼 수 있다. 따라서, GLP-2의 지속형 결합체의 경우 생리활성 펩타이드인 GLP-2와 면역글로불린 Fc 절편을 동시에 안정화하는 안정화제의 조성을 찾는 것에 많은 어려움이 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 다른 목적은 상기 액상 제제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

[9] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)의 지속형 결합체의 액상 제제이다.

[10] 하나의 구체예에서, 본 발명은 GLP-2 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, GLP-2의 지속형 결합체를 약리학적 유효량으로 포함하고,

[11] 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 완충물질을 포함하는 안정화제를 포함하는, GLP-2의 지속형 결합체의 액상 제제에 관한 것이다.

[12] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 GLP-2의 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다.

[13] [화학식 1]

[14] X - La - F

[15] 여기서,

[16] X는 천연형 GLP-2 또는 GLP-2 유도체이고;

[17] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이고;

[18] a는 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;

[19] F는 면역글로불린 Fc 절편이며;

[20] -는 공유결합을 나타냄.

[21] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 화학식 1로 표시되는

GLP-2의 지속형 결합체를 18 nmol/mL 내지 18630 nmol/mL로 포함하고,

[22] 1 내지 20% (w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 pH를 4.5 내지 6.5의 범위에서 유지하기 위한 분량의 완충물질을 포함하는 안정화제를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[23] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2 서열에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 것을 특징으로 한다.

[24] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 X는 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[25] [일반식 1]

[26] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 9)

[27] 여기서,

[28] X_1은 히스티딘, 이미다조아세틸데스히스티딘, 데스아미노히스티딘, β-히드록시이미다조프로피온일데스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β-카복시이미다조프로피온일데스히스티딘이고;

[29] X_2는 알라닌, 글리신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;

[30] X_{30}은 리신 또는 아르기닌이고;

[31] X_{34}는 부존재하거나, 리신, 아르기닌, 글루타민, 히스티딘, 6-아지도리신, 또는 시스테인임.

[32] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 X는

[33] (1) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 시스테인이거나,

[34] (2) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 리신이거나,

[35] (3) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 아르기닌이고, X_{34}가 리신이거나,

[36] (4) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 6-아지도리신이거나,

[37] (5) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 아르기닌이고, X_{34}가 시스테인이거나,

[38] (6) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 Aib이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 시스테인이거나, 또는

[39] (7) X_1이 히스티딘이고, X_2가 Aib이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 시스테인인 것을 특징으로 한다.

[40] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 X는 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[41] [일반식 2]

[42] X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34} (서열번호 10)

[43] 여기서,

[44] X_1은 히스티딘, 이미다조아세틸데스히스티딘, 데스아미노히스티딘, β-히드록시이미다조프로피온일데스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β-카복시이미다조프로피온일데스히스티딘이고;

[45] X_2는 알라닌, 글리신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;

[46] X_{30}은 리신 또는 아르기닌이고;

[47] X_{34}는 하나 이상의 임의의 아미노산 또는 변형이 일어난 하나 이상의 임의의 아미노산임.

[48] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 2 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열인 것을 특징으로 한다.

[49] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 IgG4 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.

[50] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이합체이며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.

[51] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 한다.

[52] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부위(moiety)의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.

[53] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편이 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[54] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 안정화제는 비이온성 계면활성제 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[55] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 안정화제는 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 완충물질; 비이온성 계면활성제; 및 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[56] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 등장화제를 포함하지 않거나 또는 포함하는 것일 수 있다.

[57] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충물질은 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[58] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제의 pH는 4.8 내지 6.0인 것을 특징으로 한다.

[59] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당알코올은 만니톨 및 소르비톨로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[60] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.

[61] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴록사머, 폴리소르베이트, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.

[62] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴록사머 188, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[63] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 제제 내에 0.001 내지 0.2%(w/v)의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

[64] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 아미노산은 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[65] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 아미노산은 액상 제제 내에 0.01 내지 1 mg/mL의 농도로 존재하는 것을 특징으로 한다.

[66] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는

[67] 18 nmol/mL 내지 18630 nmol/mL의 GLP-2의 지속형 결합체;

[68] 5 내지 100 mM의 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충물질;

[69] 1 내지 20% (w/v)의 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨 또는 이들의 조합;

[70] 0.001 내지 0.2% (w/v)의 폴록사머, 폴리소르베이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 비이온성 계면활성제; 및

[71] 0.01 내지 1 mg/mL의 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산을 포함하고,

[72] pH 4.5 내지 6.5인 것을 특징으로 한다.

[73] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는

[74] 18 nmol/mL 내지 18630 nmol/mL의 지속형 결합체;

[75] 5 내지 100 mM의 완충물질;

[76] 1 내지 20% (w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합;

[77] 0.001 내지 0.2% (w/v)의 비이온성 계면활성제; 및

[78] 0.01 내지 1 mg/mL의 아미노산을 포함하고,

[79] pH 4.5 내지 6.5인 것을 특징으로 한다.

[80] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는

[81] 186 내지 2981 nmol/mL의 GLP-2의 지속형 결합체;

[82] 10 내지 40 mM의 아세트산과 그 염, 또는 구연산과 그 염의 완충물질;

[83] 2 내지 15% (w/v)의 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 또는 이들의 조합;

[84] 0.002 내지 0.05% (w/v)의 폴리소르베이트; 및

[85] 0.02 내지 0.5 mg/mL의 메티오닌을 포함하고,

[86] pH 4.8 내지 6.0인 것을 특징으로 한다.

[87] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 다가알코올을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[88] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제의 제조방법이다.

[89] 하나의 구체예로서, 본 발명은 (i) GLP-2 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, GLP-2의 지속형 결합체와 (ii) 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 완충물질을 포함하는 안정화제를 서로 혼합하는 단계를 포함하는, 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[90]

발명의 효과

[91] 본 발명에 따른 액상 제제는 간단한 제형으로 분자량이 큰 본 발명의 결합체에 저장 안정성을 제공하여, 경제적인 제공이 가능한 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[92] 도 1은 완충물질의 종류와 pH에 따른 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 확인한 결과이다(IEX (%): 표 3의 IE-HPLC (%), GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 잔존율).

[93] 도 2는 안정화제 종류와 pH에 따른 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 확인한 결과이다(IEX (%): 표 5의 IE-HPLC (%), GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 잔존율).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[94] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다.

[95] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 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.

[96] 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.

[97]

[98] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(2-아미노이소부티르산; 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.

[99] 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

[100] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

[101] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

[102] 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

[103] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

[104] 류신 Leu, L 리신 Lys, K

[105] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

[106] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

[107] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

[108] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

[109]

[110] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 글루카곤 유사 펩타이드-2(Glucagon-like peptide-2; GLP-2)의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공한다.

[111] 구체적으로, 본 발명은 GLP-2 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, GLP-2의 지속형 결합체를 약리학적 유효량으로 포함하고,

[112] 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 완충물질을 포함하는 안정화제를 포함하는, GLP-2의 지속형 결합체의 액상 제제를 제공한다.

[113] 본 발명에서 용어 "액상 제제"는 의약품의 형태를 액상으로 제제화한 약물을 의미하며, 이는 액상의 내용 제제 및 외용 제제를 모두 포함한다.

[114] 본 발명의 액상 제제는 약리 효과를 나타내는 GLP-2의 지속형 결합체 및 상기 약리 효과를 나타내는 물질이 액상으로 제제화될 때 이를 일정 기간 동안 안정하게 유지 및/또는 저장시킬 수 있는 물질을 포함한다. 상기 액상 제제의 약리효과를 나타내는 GLP-2의 지속형 결합체 이외에 포함되는 성분은 안정화제와 혼용될 수 있다.

[115] 본 발명의 GLP-2의 지속형 결합체의 액상 제제에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서 중요하다.

[116]

[117] 본 발명의 액상 제제는 GLP-2의 지속형 결합체와 안정화제를 포함한다.

[118] 본 발명에서 용어, "안정화제"란 제제에서 유효성분 등의 구성 성분을 일정 기간 동안 안정하게 유지시키는 물질을 말한다.

[119] 본 발명의 안정화제는 알부민-비함유 안정화제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 단백질의 안정화제로 이용될 수 있는 인간 혈청 알부민은 인체의 혈액으로부터 제조되어서 인간 유래의 병원성 바이러스에 의한 오염 가능성이 존재하고, 젤라틴이나 소 혈청 알부민은 질환을 야기하거나 일부 환자에게 알러지 반응을 유발할 가능성이 있다. 상기 알부민-비함유 안정화제는 인간이나 동물 유래의 혈청 알부민 또는 정제된 젤라틴 등의 이종 단백질을 함유하지 않아서 바이러스 감염의 우려가 적다.

[120] 본 발명에서 상기 안정화제는 특히 GLP-2의 지속형 결합체가 안정하게 저장될 수 있도록 하는 물질을 의미한다. GLP-2의 지속형 결합체에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서뿐만 아니라, GLP-2의 지속형 결합체에 대한 항원성 물질의 잠재적인 생성을 억제하기 위해서 중요하다.

[121] 상기 안정화제는 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 완충물질을 포함할 수 있다. 이러한 액상 제제는 GLP-2의 지속형 결합체를 안정적으로 저장할 수 있는 용액 제형일 수 있다.

[122]

[123] 본 발명의 안정화제에 포함되는 완충물질은 GLP-2의 지속형 결합체가 안정해지도록 액상 제제의 pH가 급격히 변화하지 않게 용액의 pH를 유지시킬 수 있다.

[124] 상기 완충물질은 인산과 그의 짝염인 알칼리 염(예를 들어, 인산염: 인산나트륨, 인산칼륨 또는 이들의 수소 또는 이수소 염), 구연산과 그의 염(예를 들어, 구연산나트륨), 아세트산과 그의 염(예를 들어, 아세트산나트륨), 히스티딘과 그의 염을 비롯한 pH 완충물질일 수 있으며, 이들 완충물질의 혼합물도 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[125] 본 발명의 액상 제제는 상기 완충물질을 포함하는 완충용액을 액상 제제의 용매로 포함할 수 있으며, 구체적으로 상기 완충용액은 구연산 완충용액(예, 구연산나트륨 완충용액), 아세트산 완충용액(예, 아세트산나트륨 완충용액), 인산 완충용액(예, 인산나트륨 완충용액), 히스티딘 완충용액, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 보다 더 구체적으로, 상기 완충용액은 구연산 완충용액(예, 구연산나트륨 완충용액), 아세트산 완충용액(예, 아세트산나트륨 완충용액), 히스티딘 완충용액, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 더욱 더 구체적으로는, 상기 완충용액은 구연산 완충용액(예, 구연산나트륨 완충용액), 아세트산 완충용액(예, 아세트산나트륨 완충용액), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[126] 상기 완충용액 또는 액상 제제 내의 완충물질(구연산과 그의 염, 아세트산과 그의 염, 히스티딘과 그의 염, 인산과 그의 염, 또는 이들의 조합)은 목표로 하는 액상 제제의 pH를 유지하는 데 충분한 분량의 농도로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 완충물질의 농도는 약 2 mM 내지 약 200 mM일 수 있고, 보다 더 구체적으로, 약 5 mM 내지 약 100 mM, 약 5 mM 내지 약 80 mM, 약 5 mM 내지 약 40 mM, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 10 mM 내지 약 30 mM, 약 15 mM 내지 약 25 mM일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[127] 상기 완충용액 또는 액상 제제의 pH는 pH 약 4.0 내지 pH 약 7.0, 구체적으로는 pH 약 4.0 내지 pH 약 6.8, pH 약 4.2 내지 pH 약 6.6, pH 약 4.3 내지 pH 약 6.5, 더 구체적으로는 pH 약 4.5 내지 pH 약 6.5, pH 약 4.5 내지 pH 약 6.3, pH 약 4.5 내지 pH 약 6.0, pH 약 4.8 내지 pH 약 6.5, pH 약 4.8 내지 약 pH 6.0, pH 약 5.1 내지 pH

약 6.0, 또는 pH 약 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 또는 7.0일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[128]

[129] 본 명세서 전반을 통하여, "약"은 ±0.5, ±0.4, ±0.3, ±0.2, ±0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[130]

[131] 한편, 액상 제제의 제조에 있어서, 성분들을 물(예, WFI)에 녹이고, HCl 및/또는 NaOH 등을 사용하여 완충용액 또는 제제의 pH를 목적하는 pH로 조정할 수 있으며, 이는 당업계에 이미 통상적으로 사용되는 방법이다. 따라서, 청구항에 pH 조절자에 대한 별도의 언급이 없더라도, 이러한 방법을 통해서 제제가 조정된 pH를 가질 수 있다는 것은 당업자가 이해할 수 있는 것이다.

[132]

[133] 본 발명의 안정화제에 포함되는 당알코올은 다수의 수산기를 포함하는 물질로서, 당의 알데히드기 및/또는 케톤기 등이 알코올기로 치환된 물질의 총칭이며, GLP-2의 지속형 결합체의 안정성을 증대시킬 수 있다. 예컨대, 상기 당알코올은 만니톨 및 소르비톨로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[134] 본 발명의 안정화제에 포함되는 당(saccharide)는 단당류, 이당류, 다당류, 올리고당류 등을 말하며, GLP-2의 지속형 결합체의 안정성을 증대시킬 수 있다. 구체적인 예로는 만노스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 푸코스 및 크실로스 등의 단당류; 락토스, 말토스, 및 수크로스 등의 이당류; 라피노스 및 덱스트란 등의 다당류 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[135] 상기 당알코올, 당, 또는 이들의 조합은 전체 용액 대비 약 1 내지 약 20%(w/v), 약 1 내지 약 15%(w/v), 약 2 내지 약 15%(w/v), 약 2 내지 약 12%(w/v), 약 2 내지 약 10%(w/v), 약 3 내지 약 10%(w/v), 약 4 내지 약 10%(w/v), 약 4 내지 약 9%(w/v), 약 5 내지 약 9%(w/v), 약 5 내지 약 8%(w/v), 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 %(w/v), 약 5 %(w/v), 또는 약 8 %(w/v)의 농도로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[136]

[137] 또한, 본 발명의 안정화제는 비이온성 계면활성제, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 상기 안정화제는 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 완충물질로 필수적으로 구성될 수도 있지만, 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 완충물질; 및 비이온성 계면활성제, 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 완충물질; 및 아미노산, 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 완충물질; 비이온성 계면활성제; 및 아미노산으로 필수적으로 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[138] 여기서, 안정화제를 구성하는 각 성분의 종류 및 농도 혹은 pH에 대해서는 상기 혹은 하기에 기술된 내용들이 모두 적용됨은 분명하다.

[139] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비이온성 계면활성제는 단백질 용액의 표면장력을 낮추어 소수성 표면에 단백질이 흡착되거나 응집되는 것을 방지하여 줄 수 있다.

[140] 본 발명에 사용될 수 있는 비이온성 계면활성제의 구체적인 예로는 폴리소르베이트 또는 폴록사머를 들 수 있으며, 이들이 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로도 사용될 수 있다.

[141] 구체적으로, 상기 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 20, 또는 폴록사머 188일 수 있으며, 이들이 조합되어 사용될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[142] 본 발명에서 상기 비이온성 계면활성제는 고농도로 포함되지 않는 것이 바람직하며, 구체적으로는 본 발명의 제제에 약 0.2%(w/v) 이하의 농도, 예컨대 약 0.001 내지 약 0.2%(w/v), 약 0.001 내지 약 0.1%(w/v), 약 0.001 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.005 내지 약 0.08%(w/v), 약 0.002 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.005 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.04%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.03%(w/v), 또는 약 0.02%(w/v)로 포함될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[143] 상기 아미노산은 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인 및 이들의 조합일 수 있으며, 구체적으로 메티오닌일 수 있다. 또한, 상기 메티오닌은 L-메티오닌일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[144] 상기 아미노산은 단백질의 산화 반응 등에 의해 일어날 수 있는 불순물 생성을 억제시킬 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[145] 상기 아미노산은 제제 내에 약 0.01 내지 약 1 mg/mL의 농도, 구체적으로 약 0.01 내지 약 0.8 mg/mL, 약 0.01 내지 약 0.5 mg/mL, 약 0.02 내지 약 0.5 mg/mL, 또는 약 0.02 내지 약 0.4 mg/mL 로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[146]

[147] 한편, 본 발명의 액상 제제는 추가로 다가알코올을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[148] 예컨대, 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 완충물질을 포함하는 안정화제뿐만 아니라, 다가알코올을 포함할 수 있다. 구체적으로 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 완충물질; 및 비이온성 계면활성제, 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 완충물질; 및 아미노산, 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 완충물질; 비이온성 계면활성제; 및 아미노산으로 필수적으로 구성되는 안정화제에 다가알코올을 더 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[149] 본 발명의 제제에 추가로 포함될 수 있는 다가알코올의 바람직한 예로는 프로필렌글리콜 및 저분자량의 폴리에틸렌글리콜, 글리세롤, 저분자량의

폴리프로필렌글리콜 등을 들 수 있으며, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 다가알코올에서 당알코올이 제외될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[150]

[151] 한편, 본 발명의 액상 제제에는 상기 설명한 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 완충물질; 아미노산; 및 비이온성 계면활성제 이외에, 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업계에 공지되어 있는 기타의 성분 내지 물질들이 선택적으로 더 포함될 수 있다.

[152]

[153] 한편, 본 발명의 액상 제제의 하나의 구체예는 등장화제를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 상기 등장화제는 삼투압 조절을 나타낼 수 있는 물질을 말한다. 상기 등장화제는 본 발명에 따른 액상 제제를 체내에 투여하는 경우 삼투압을 적절하게 유지하는 역할을 할 수 있다.

[154] 이러한 등장화제의 대표적인 예로는 수용성 무기염으로서 염화나트륨, 황산나트륨, 또는 구연산나트륨 등을 들 수 있으며, 구체적으로는 염화나트륨을 들 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 무기염은 상술한 안정화제에 추가로 포함되는 선택적인 성분일 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않는다. 이와 더불어 상술한 안정화제도 등장화제로서 역할을 할 수 있다.

[155] 본 발명에 따른 제제에서 상기 등장화제의 농도는 0 내지 200mM, 0 내지 150mM, 0 내지 100mM, 10 내지 200mM, 10 내지 150mM, 10 내지 100mM, 10 내지 50mM, 20 내지 100mM, 20 내지 80mM, 20 내지 50mM, 20 내지 30mM, 또는 40 내지 50mM일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[156] 본 발명에서 용어 "GLP-2의 지속형 결합체"는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분으로서, 약리학적 유효량으로 제제에 포함될 수 있으며, 그 예로 GLP-2의 지속형 결합체의 농도가 약 18 내지 약 18630 nmol/mL, 약 18 내지 약 14904 nmol/mL, 약 18 내지 약 9315 nmol/mL, 약 18 내지 약 7452 nmol/mL, 약 18 내지 약 5589 nmol/mL, 약 18 내지 약 4658 nmol/mL, 약 18 내지 약 2981 nmol/mL, 약 18 내지 약 1863 nmol/mL, 약 18 내지 약 1491 nmol/mL, 약 18 내지 약 1211 nmol/mL, 약 18 내지 약 932 nmol/mL, 약 18 내지 약 746 nmol/mL, 약 18 내지 약 559 nmol/mL, 약 18 내지 약 373 nmol/mL, 약 37 내지 약 5589 nmol/mL, 약 93 내지 약 2236 nmol/mL, 약 149 내지 약 1491 nmol/mL, 약 186 내지 약 2981 nmol/mL, 약 186 내지 약 1118 nmol/mL, 약 93 내지 약 18630 nmol/mL, 약 186 내지 약 9315 nmol/mL,약 279 내지 약 5589 nmol/mL, 약 372 내지 약 4658 nmol/mL, 약 465 내지 약 3726 nmol/mL, 약 558 내지 약 2981 nmol/mL, 약 18 내지 약 14910 nmol/mL, 약 18 내지 약 9320 nmol/mL, 약 18 내지 약 7460 nmol/mL, 약 18 내지 약 5590 nmol/mL, 약 18 내지 약 4660 nmol/mL, 약 18 내지 약 1870 nmol/mL, 약 18 내지 약 1220 nmol/mL, 약 18 내지 약 940 nmol/mL, 약 18 내지 약 750 nmol/mL, 약 18 내지 약 560 nmol/mL, 또는 약 18 내지 약 380 nmol/mL, 약 37 내지 약 5590 nmol/mL, 약

93 내지 약 2240 nmol/mL, 약 149 내지 약 1500 nmol/mL, 약 186 내지 약 2990 nmol/mL, 약 186 내지 약 1120 nmol/mL, 약 186 내지 약 9320 nmol/mL, 약 279 내지 약 5590 nmol/mL, 약 372 내지 약 4660 nmol/mL, 약 465 내지 약 3730 nmol/mL, 약 558 내지 약 2990 nmol/mL, 약 186 nmol/mL, 약 186.3 nmol/mL, 약 187 nmol/mL, 약 1117 nmol/mL, 약 1117.8 nmol/mL, 약 1118 nmol/mL, 약 558 nmol/mL, 약 558.9 nmol/mL, 약 559 nmol/mL, 약 1490 nmol/mL, 약 1490.4 nmol/mL, 약 1491 nmol/mL, 약 2980 nmol/mL, 약 2980.8 nmol/mL, 또는 약 2981 nmol/mL일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[157] 구체적으로, 지속형 결합체는 GLP-2에 면역글로불린 Fc 절편이 연결된 형태일 수 있다. 상기 결합체는 면역글로불린 Fc 절편이 결합되지 않은 GLP-2에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 결합체를 "지속형 결합체"로 지칭한다. 본 발명에서 지속형 결합체는 결합체와 혼용된다.

[158] 한편, 이러한 결합체는 비자연적인(non-naturally occurring) 것일 수 있다.

[159] 또한, GLP-2의 지속형 결합체에 있어서 GLP-2와 면역글로불린 Fc 절편의 연결은 물리 또는 화학 결합이거나, 비공유 또는 공유 결합일 수 있으며, 구체적으로 공유 결합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[160] 또한, GLP-2의 지속형 결합체는 GLP-2와 면역글로불린 Fc 절편의 연결 방법은 특별히 제한되지 않으나, 링커를 통해 GLP-2와 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된 것일 수 있다.

[161] 또한, GLP-2의 지속형 결합체에 관한 한국 공개특허 제10-2019-0037181호는 참조로 본원에 포함된다.

[162] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 GLP-2의 지속형 결합체는 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

[163] [화학식 1]

[164] X - La - F

[165] 여기서,

[166] X는 GLP-2이고;

[167] L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이고;

[168] a는 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;

[169] F는 면역글로불린 Fc 절편이고;

[170] 상기 “-“는 비공유 결합 혹은 공유결합 등 어떠한 화학적 결합일 수 있다.

[171]

[172] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 액상 제제는 상기 화학식 1로 표시되는 GLP-2의 지속형 결합체를 18 nmol/mL 내지 18630 nmol/mL로 포함하고,

[173] 1 내지 20% (w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 pH를 4.5 내지 6.5의 범위에서 유지하기 위한 분량의 완충물질을 포함하는 안정화제를 포함할 수 있다.

[174]

[175] 본 명세서에서 Fc 절편이라고 하면 면역글로불린의 파파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열까지 망라하여 포함된다.

[176]

[177] 본 발명에서 용어 "글루카곤 유사 펩타이드- 2 (Glucagon-like peptide-2, GLP-2)"는 장손상, 장질환, 및 위질환 등의 예방, 치료 및 개선 기능을 가진 펩타이드(화학식 1에서 X에 해당함)로서, 천연형 GLP-2뿐만 아니라, 이의 아고니스트(agonist) 및 유도체(derivative) 등도 포함한다.

[178] 상기 천연형 GLP-2의 아미노산 서열은 아래와 같다.

[179] GLP-2(1-33)

[180] HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (서열번호 1)

[181] 본 발명에서 "GLP-2 수용체 아고니스트"는 생체 내 GLP-2 수용체와 결합하여 천연형 GLP-2와 동일한 혹은 유사한 생리활성을 일으키는 물질을 말한다. 예를 들어, GLP-2 아고니스트에는 천연형 GLP-2 또는 GLP-2 유도체가 포함될 수 있다.

[182] 본 발명에서 "GLP-2 유도체"는 천연형 GLP-2에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 것일 수 있으며, 천연형 GLP-2와 같이 장손상, 장질환 또는 위질환 등의 예방, 치료 및/또는 개선 기능을 가진 천연형 GLP-2의 모방체를 포함한다. 추가되는 아미노산은 비 천연형 아미노산(예; D형 아미노산)도 가능하며, 천연형 아미노산 이외에 비 천연형 아미노산의 치환도 가능하다. 상기 추가되는 아미노산 서열은 천연형 GLP-2에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에서 아미노산의 변형은, 적어도 하나의 아미노산의 치환, 추가, 제거, 또는 이들의 조합과 함께; 또는 이와 독립적으로, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation, azido 기로 치환), 제거(예; deamination) 및/또는 수식(예; N-methylation)된 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[183] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 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; alpha-methylation, alpha-hydroxylation, azido 기로 치환), 제거(예; deamination) 및/또는 수식(예; N-methylation) 된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

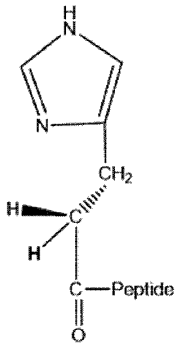
[184] 구체적으로, 천연형 GLP-2의 아고니스트 및 유도체는 이에 제한되지 않지만 장손상, 장질환 및 위 질환 등의 예방, 치료 및 개선 기능을 가질 수 있다.

[185]

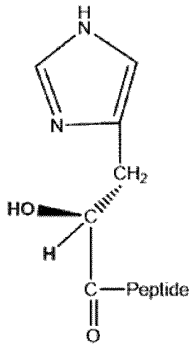
[186] 하나의 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 GLP-2는 N-말단 아미노기가 치환, 제거, 또는 수식될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 GLP-2는 지속형 결합체 제조 시 GLP-2의 생체 내 활성에 중요한 부위인 N-말단에 결합이 일어나는 것을 방지하기 위해, N-말단 히스티딘의 알파 아미노기를 제거하는 방법, N-말단 아미노기를 하이드록실(hydroxyl)기 또는 카복실(carboxyl)기로 치환하여 합성하는 방법, N-말단 히스티딘의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기를 제거하여 이미다조-아세틸(imidazo-acetyl) 작용기만을 남겨두는 방법, N-말단 아미노기를 2개의 메틸기로 수식하는 방법 등을 통해 제조될 수 있다.

[187] 구체적으로, GLP-2는 GLP-2의 N-말단 첫 번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸데스히스티딜 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-히드록시이미다조프로피온일데스히스티딜 GLP-2(β-hydroxyimidazopropionyldeshistidyl 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-카복시이미다조프로피온일데스히스티딜-GLP-2(β-carboxyimidazopropionyl -deshistidyl GLP-2, CX-GLP-2)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 하나의 비제한적 예시로서 GLP-2 유도체 제조에 사용된 물질 구조는 아래와 같다.

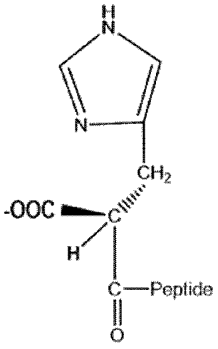
[188]



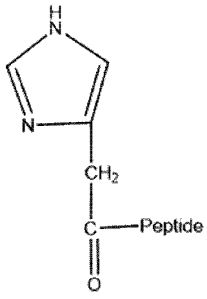
Des-amino-histidyl (DA)-GLP-2



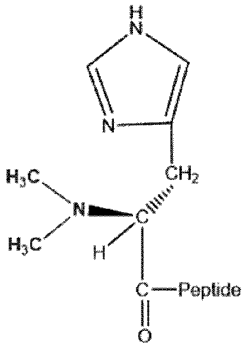
Beta-hydroxy-imidazopropionyl (HY)-GLP-2



Beta-carboxyl-imidazopropionyl (CX)-GLP-2



Imidazoacetyl (CA)-GLP-2



Dimethyl-histidyl (DM)-GLP-2

[189] 본원에서 이미다조아세틸데스히스티딜(딘), 데스아미노히스티딜(딘), 베타-히드록시이미다조프로피온일데스히스티딜(딘), *N*-디메틸히스티딜(딘), 및 베타-카복시이미다조프로피온일데스히스티딜(딘)은 각각 이미다조아세틸, 데스-아미노-히스티딜, 베타-히드록시-이미다조프로피온일, 디메틸-히스티딜, 베타-카복실-이미다조프로피온일과 동일한 의미로 사용될 수 있다.

[190]

[191] 하나의 구체적인 실시 형태에서, GLP-2 유도체는 서열번호 1에서 1번, 2번, 30번 및 33번의 아미노산 중 적어도 하나의 아미노산에서의 변형을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명에서 아미노산의 변형은 적어도 하나의 아미노산의 치환, 추가, 제거, 수식 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형일 수 있으며, 이 때 추가되는 아미노산은 비천연형 아미노산(예; D형 아미노산)도 가능하고, 천연형 아미노산 이외에 비천연형 아미노산의 치환도 가능하다. 상기 추가되는 아미노산 서열은 천연형 GLP-2에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에서 아미노산의 변형은, 적어도 하나의 아미노산의 치환, 추가, 제거, 또는 이들의 조합과 함께; 또는 이와 독립적으로, 아미노산 잔기의 일부 그룹이 화학적으로

치환(예; alpha-methylation, alpha-hydroxylation, azido 기로 치환), 제거(예; deamination) 및/또는 수식(예; N-methylation)된 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[192]

[193] 하나의 구체적인 실시 형태에서, GLP-2는 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[194] [일반식 1]

[195] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 9)

[196] 여기서,

[197] X_1은 히스티딘, 이미다조아세틸데스히스티딘, 데스아미노히스티딘, β-히드록시이미다조프로피온일데스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β-카복시이미다조프로피온일데스히스티딘이고;

[198] X_2는 알라닌, 글리신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;

[199] X_{30}은 리신 또는 아르기닌이고;

[200] X_{34}는 부존재하거나, 리신, 아르기닌, 글루타민, 히스티딘, 6-아지도리신, 또는 시스테인이다.

[201]

[202] 하나의 구체적인 실시 형태에서, GLP-2는 하기 일반식 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[203] [일반식 2]

[204] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 10)

[205] 여기서,

[206] X_1은 히스티딘, 이미다조아세틸데스히스티딘, 데스아미노히스티딘, β-히드록시이미다조프로피온일데스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β-카복시이미다조프로피온일데스히스티딘이고;

[207] X_2는 알라닌, 글리신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;

[208] X_{30}은 리신 또는 아르기닌이고;

[209] X_{34}는 하나 이상의 임의의 아미노산 또는 변형이 일어난 하나 이상의 임의의 아미노산이다.

[210] 구체적으로, 상기 아미노산은 천연형 아미노산 또는 비 천연형 아미노산일 수 있으며, 상기 아미노산의 변형은 전술한 바와 같다.

[211]

[212] 또한, 상기 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 제외될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다

[213]

[214] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글리신 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)으로의 치환, 30번째 아미노산인 리신의 아르기닌으로의 치환, 또는 이들의 조합을 가질 수 있으나,

이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 GLP-2 유도체는 C-말단(예들 들어, 33번째 아미노산)에 티올기(예들 들어, 시스테인), 아미노기(예를 들어, 리신, 아르기닌, 글루타민 또는 히스티딘), 또는 아지드기(예들 들어, 6-아지도리신)이 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[215] GLP-2 유도체의 지속형 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 링커의 한 쪽 말단이 결합되고, 링커의 다른 말단에 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 절편)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 리신(K), 아르기닌(R), 글루타민(Q) 또는 히스티딘(H)을 추가시켜 도입되고; 아지드기는 6-아지도리신(6-azidolysine, $_{AZ}$K)을 추가시켜 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[216] 구체적으로, GLP-2 유도체는 적어도 하나의 잔기가 시스테인, 리신, 아르기닌, 글루타민, 히스티딘 또는 6-아지도리신일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[217] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글리신으로의 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 이미다조아세틸데스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[219] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글리신으로의 치환, 천연형 GLP-2의 30번째 아미노산인 리신의 아르기닌으로의 치환 및 C-말단에 아미노기(예를 들어, 리신)의 도입을 포함하며, 더욱 구체적으로 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸데스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[220] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글리신으로의 치환 및 C-말단에 아지드기(예들 들어, 6-아지도리신)의

도입을 포함하며, 더욱 구체적으로 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸데스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 5의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[221] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 글리신으로의 치환, 천연형 GLP-2의 30번째 아미노산인 리신의 아르기닌으로의 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 이미다조아세틸데스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 6의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[222] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 2-아미노이소부티릭산으로의 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 이미다조아세틸데스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 7의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[223]

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

[225] [표1]

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

[226] 상기 표 1에서 $_{ca}$H는 히스티딘 대신 이미다조아세틸데스히스티딘으로 치환된 것을, Aib는 2-아미노이소부티릭산(2-aminoisobutyric acid)을, $_{AZ}$K는 6-아지도-L-리신(6-azido-L-lysyine)을 가리킨다.

[227]

[228] 본 발명에 따른 GLP-2는 상기 기술된 특정 서열을 포함하는 펩타이드, 상기 기술된 특정 서열로 구성된(또는 필수적으로 구성된) 펩타이드일 수 있으나,

이에 제한되는 것은 아니다.

[229] 한편, 본원에서 '특정 서열번호로 구성되는(이루어진)' 펩타이드 또는 GLP-2라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 또는 GLP-2와 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 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

[230]

[231] 구체적으로, GLP-2 유도체는 일반식 1 또는 일반식 2에서 (1) X_2가 글리신 또는 Aib이거나, (2) X_{30}이 리신 또는 아르기닌이거나, 또는 (3) X_2가 글리신 또는 Aib이고, X_{30}이 리신 또는 아르기닌일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[232] 구체적으로, GLP-2 유도체는 일반식 1 또는 일반식 2에서,

[233] (1) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 시스테인이거나,

[234] (2) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 리신이거나,

[235] (3) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 아르기닌이고, X_{34}가 리신이거나,

[236] (4) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 6-아지도리신이거나,

[237] (5) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 글리신이고, X_{30}이 아르기닌이고, X_{34}가 시스테인이거나,

[238] (6) X_1이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2가 Aib이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 시스테인이거나, 또는

[239] (7) X_1이 히스티딘이고, X_2가 Aib이고, X_{30}이 리신이고, X_{34}가 시스테인 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[240]

[241] 본 발명에서, 상기 GLP-2 유도체는 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 GLP-2의 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태일 수 있다.

[242] 특히, 화학적으로 합성한 펩타이드의 경우, N- 및 C-말단이 전하를 띠고 있기 때문에, 이러한 전하를 제거하기 위하여 N-말단을 아세틸화(acetylation) 및/또는 C-말단을 아미드화(amidation)할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 구체적으로, 본 발명에서, GLP-2 유도체는 이의 C-말단이 변형되지 않았거나 아미드화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[243]

[244] 본 발명의 GLP-2는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 재조합 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있다.

[245]

[246] 상기 화학식 1에서 공유 화학결합, 비공유 화학결합 또는 이들의 조합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합될 수 있다.

[247] 보다 구체적으로, X와 L, 및 L과 F는 공유결합으로 서로 연결될 수 있으며, 이때 상기 결합체는 화학식 1의 순서로, X, L, 및 F가 공유결합을 통하여 각각 연결된 결합체일 수 있다.

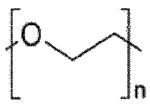
[248] 또한, 상기 F는 X와 직접적으로 연결되거나(즉, 상기 화학식 1에서 a가 0이거나), 또는 링커(L)를 통해 연결된 것일 수 있다.

[249] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 지속형 결합체의 일 구성요소인 La는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[250] 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함는 링커인 L은, 결합체로 구성되기 이전에는 결합체의 제조에 이용되는 작용기를 말단에 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 지속형 결합체는 상기 작용기를 통해 X와 F가 연결된 형태일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커는 2개, 또는 3개 이상의 작용기를 포함할 수 있고, 각 작용기는 동일하거나, 서로 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[251] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 4로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[252] [화학식 4]

[253] 

[254] 여기서, n = 10 내지 2400, n = 10 내지 480, 또는 n = 50 내지 250이나, 이에 제한되지 않는다.

[255] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, $-(CH_2CH_2O)_n-$구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[256] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 GLP-2와 면역글로불린 Fc 절편(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 공유 결합으로 연결된 구조 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[257] 상기 폴리에틸렌 글리콜은, 에틸렌 글리콜 동종 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[258] 하나의 구체예로 상기 에틸렌글리콜 반복단위는 그 예로, $[OCH_2CH_2]n$로

표시될 수 있으며, n 값은 자연수로 상기 펩타이드 결합체 내의 $[OCH_2CH_2]n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 O 초과 내지 약 100 kDa이 되도록 정해질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또 하나의 예로, 상기 n 값은 자연수로 상기 펩타이드 결합체 내의 $[OCH_2CH_2]n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 약 1 내지 약 100 kDa, 약 1 내지 약 80 kDa, 약 1 내지 약 50 kDa, 약 1 내지 약 30 kDa, 약 1 내지 약 25 kDa, 약 1 내지 약 20 kDa, 약 1 내지 약 15 kDa, 약 1 내지 약 13 kDa, 약 1 내지 약 11 kDa, 약 1 내지 약 10 kDa, 약 1 내지 약 8 kDa, 약 1 내지 약 5 kDa, 약 1 내지 약 3.4 kDa, 약 3 내지 약 30 kDa, 약 3 내지 약 27 kDa, 약 3 내지 약 25 kDa, 약 3 내지 약 22 kDa, 약 3 내지 약 20 kDa, 약 3 내지 약 18 kDa, 약 3 내지 약 16 kDa, 약 3 내지 약 15 kDa, 약 3 내지 약 13 kDa, 약 3 내지 약 11 kDa, 약 3 내지 약 10 kDa, 약 3 내지 약 8 kDa, 약 3 내지 약 5 kDa, 약 3 내지 약 3.4 kDa, 약 8 내지 약 30 kDa, 약 8 내지 약 27 kDa, 약 8 내지 약 25 kDa, 약 8 내지 약 22 kDa, 약 8 내지 약 20 kDa, 약 8 내지 약 18 kDa, 약 8 내지 약 16 kDa, 약 8 내지 약 15 kDa, 약 8 내지 약 13 kDa, 약 8 내지 약 11 kDa, 약 8 내지 약 10 kDa, 약 9 내지 약 15 kDa, 약 9 내지 약 14 kDa, 약 9 내지 약 13 kDa, 약 9 내지 약 12 kDa, 약 9 내지 약 11 kDa, 약 9.5 내지 약 10.5 kDa, 약 3.4 kDa 또는 약 10 kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[259] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 링커의 양 말단은 면역글로불린 Fc 절편의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 GLP-2의 티올기, 아미노기, 아지드기, 하이드록실기에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[260] 구체적으로, 상기 링커는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 및 GLP-2와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 면역글로불린 Fc 절편의 시스테인의 티올기; N-말단, 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘에 위치한 아미노기; 및/또는 C-말단에 위치한 하이드록실기와 결합되고, GLP-2의 시스테인의 티올기; 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘의 아미노기; 아지도리신의 아지드기; 및/또는 하이드록실기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[261] 보다 구체적으로, 상기 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[262] 상기에서, 알데히드 그룹으로 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[263] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 카르복시메틸, 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피온에이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[264] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 절편인 F 및 GLP-2인

X에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.

[265] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원성 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.

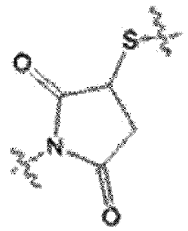
[266] 본 발명의 링커의 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 상기 링커는 말단에 알데히드 그룹 반응기를 갖는 것일 수 있고, 또한 상기 링커는 말단에 각각 알데히드 그룹 및 말레이미드 반응기를 가질 수 있거나, 말단에 각각 알데히드 그룹 및 석시니미드 반응기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[267] 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.

[268] 프로피온쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 링커로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 결합체를 제조할 수 있다.

[269] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 링커의 반응기가 GLP-2의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[270] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드 기는 GLP-2 유도체의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 면역글로불린 Fc의 $-NH_2$ 기와 환원적 알킬화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[271] 이와 같은 환원적 알킬화를 통하여 PEG의 한쪽 말단에 위치한 산소 원자에 면역글로불린 Fc 절편의 N-말단 아미노기가 $-CH_2CH_2CH_2-$의 구조를 가지는 링커 작용기를 통해 서로 연결되어, -PEG-O-$CH_2CH_2CH_2$NH-면역글로불린 Fc와 같은 구조를 형성할 수 있고, 티오에테르 결합을 통하여 PEG의 한쪽 말단이 GLP-2의 시스테인에 위치한 황 원자에 연결된 구조를 형성할 수 있다. 상술한 티오에테르 결합은  의 구조를 포함할 수 있다.

[272] 그러나, 상술한 예에 특별히 제한되는 것은 아니며, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[273] 또한, 상기 결합체에서, 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 절편의 N-말단에

위치한 -NH_2와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[274] 또한, 상기 결합체에서, GLP-2는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

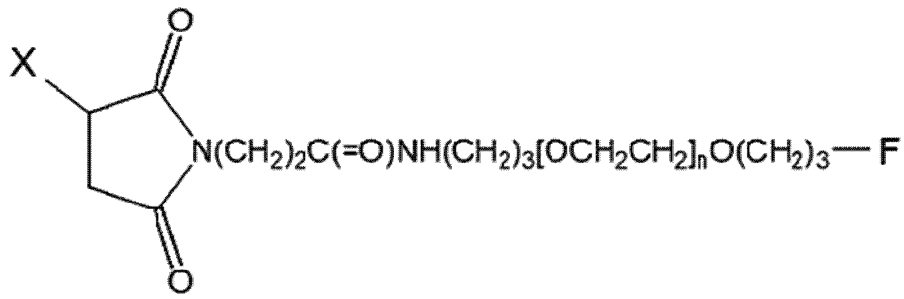
[275] 본 발명에서 "C-말단"은, 펩타이드의 카르복시 말단을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 링커와 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[276]

[277] 하나의 구체예로, 상기 화학식 1의 결합체는 하기 화학식 2 또는 3의 구조를 가질 수 있다.

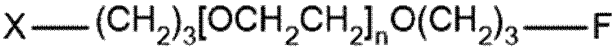
[278] [화학식 2]

[279]



[280] [화학식 3]

[281]



[282]

[283] 상기 화학식 2 또는 3에서 X는 상기에서 설명한 화학식 1의 펩타이드이고;

[284] F는 면역글로불린 Fc 절편이며;

[285] n은 자연수일 수 있다. 이때, n에 대한 설명은 상기에서 설명한 바와 같다.

[286]

[287] 하나의 구체예로, 상기 화학식 2의 지속형 결합체는, GLP-2의 X와 면역글로불린 Fc 절편 F가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 X는 화학식 2의 숙신이미드 고리에, F는 화학식 2의 옥시프로필렌기에 연결된 형태일 수 있다. 또한, 상기 화학식 3의 지속형 결합체는, GLP-2의 X와 면역글로불린 Fc 절편 F가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 X는 화학식 3의 옥시프로필렌기에, F는 화학식 3의 다른 옥시프로필렌기에 연결된 형태일 수 있다.

[288] 상기 화학식 2 또는 3에서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 [OCH2CH2]n 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa, 또는

1 내지 20 kDa 또는 10 kDa이 되도록 정해지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[289] 한 실시 형태에서 화학식 2의 숙신이미드 고리 또는 화학식 2의 숙신이미드 고리에 X가 연결되는 부위는 X의 C-말단 시스테인의 황 원자일 수 있다. 또한, 화학식 3의 옥시프로필렌기 또는 화학식 3의 옥시프로필렌기에 X가 연결되는 부위는 X의 C-말단 시스테인의 황 원자일 수 있다.

[290] F 내에서 화학식 2 또는 화학식 3의 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 한 실시 형태에서 상기 옥시프로필렌기에 연결되는 F의 부위는 N-말단 질소 또는 F 내부 잔기의 질소 원자(예컨대 리신의 입실론 질소)일 수 있다. 본 발명의 한 구체적인 실시 형태에서, F가 화학식 2 또는 화학식 3의 옥시프로필렌기에 연결되는 부위는 F의 N-말단 프롤린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[291]

[292] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 절편"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역을 의미한다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 것일 수 있고, 보다 더 구체적으로, 힌지 영역 (힌지 영역 전체 또는 일부를 의미한다.)을 더 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서 면역글로불린 Fc 절편은 면역글로불린 Fc 영역과 혼용되어 사용될 수 있다.

[293]

[294] 본 명세서에서 Fc 절편이라고 하면 면역글로불린의 파파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 치환체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열 등 변형체까지 망라하여 포함된다. 상기 유도체, 치환체, 변형체는 FcRn에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로 한다..

[295] 상기 면역글로불린 Fc 절편은 본 발명의 화학식 1의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성으로, 구체적으로, 상기 화학식 1 내지 3에서 F에 해당할 수 있다.

[296] 상기 F는, 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결되어 있는 구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소 원자를 통한 연결은 리신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.

[297] 환원적 아민화 반응이란 반응물의 아민기 또는 아미노기가 다른 반응물의 알데히드(즉, 환원적 아민화가 가능한 작용기)와 반응하여 아민을 생성한 다음, 환원 반응에 의해 아민 결합을 형성시키는 반응을 의미하여, 당해 기술 분야에 널리 알려져 있는 유기합성 반응이다.

[298] 하나의 구체예로, 상기 F는 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된

것일 수 있다.

[299] 이러한 면역글로불린 Fc 절편은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[300] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 절편은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.

[301] 본 발명에서, "힌지 서열"은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 절편의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.

[302] 본 발명에서, 상기 힌지 서열은 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[303] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 11).

[304] 상기 힌지 서열은 서열번호 11의 힌지 서열 중 8번째 또는 11번째 시스테인 잔기가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 힌지 서열은 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는, 3 내지 12개의 아미노산으로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 본 발명의 힌지 서열은 다음과 같은 서열을 가질 수 있다:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 12),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 13),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 14),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 15),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 16),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 17),
Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 18), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 19), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 20), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 21),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 22),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 23),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 24),
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 25),
Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 26), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 27), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 28), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 29),
Ser-Cys-Pro(서열번호 30).

[305] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 30(Ser-Cys-Pro) 또는 서열번호 21(Pro-Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[306] 본 발명의 GLP-2 유도체 지속형 결합체의 한 더욱 구체적인 형태에서, 상기 결합체내 상기 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단은 프롤린이고, 이 결합체는 상기 프롤린의 질소 원자를 통하여 Fc 영역이 링커에 연결된 것이다.

[307]

[308] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 절편은 힌지 서열의 존재로 면역글로불린 Fc 사슬 두 분자가 동종이량체(homodimer)나 이종이량체(heterodimer)의 이량체를 형성한 형태일 수 있고, 또한, 본 발명의 결합체는 링커의 일 말단이 이량체의 면역글로불린 Fc 절편의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[309]

[310] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 절편은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[311] 본 발명에서, "N-말단"은 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노 말단을 의미하는 것으로, 아미노 말단의 최말단, 또는 최말단으로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 아미노산까지 포함하는 것일 수 있다.

[312]

[313] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 절편은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 절편일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

[314] 예컨대, 본 발명의 면역글로불린 Fc 절편은 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) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 또는 6) 중쇄 불변 영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[315] 또한, 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 절편은 이량체 형태 (dimeric form)일 수 있으며, 이량체 형태의 하나의 Fc 절편에 X 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 이량체 형태의 하나의 Fc 절편에 X 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.

[316] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 절편은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다.

[317] 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.

[318] 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서

N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 절편의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

[319] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/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) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

[320] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 절편과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 절편의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.

[321] 또한, 이러한 Fc 절편은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 픽 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 획득하는 방법일 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. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 절편을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 절편이다.

[322] 또한, 면역글로불린 Fc 절편은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 절편은 보체(c1q)와의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포 독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역 반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 절편이라 할 것이다.

[323] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 절편을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는

대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 절편을 의미한다.

[324] 한편, 면역글로불린 Fc 절편은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.

[325] 또한, 면역글로불린 Fc 절편은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 절편일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM유래이며 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 절편은 IgG4 Fc 절편이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 절편은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 절편이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[326] 또한, 하나의 구체예로서, 면역글로불린 Fc 절편은 인간 IgG4 Fc의 단편으로서, 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이량체(homodimer)일 수 있으며, 이 때 동종이량체는 각 단량체에서 35번 및 95번의 시스테인 사이 및 141번 및 199번의 시스테인 사이에 내부의 이황화 결합, 즉 2개의 이황화 결합(intra-chain 형태)을 가지거나/가지고, 각 단량체의 아미노산 수는 221개일 수 있으며, 동종이량체를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 절편은 서열번호 32의 아미노산 서열(442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체(여기서, 서열번호 31의 아미노산 서열(221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합을 통해 동종이량체를 형성하고, 상기 동종이량체 내의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합을 형성함)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[327] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 절편을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 절편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 절편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

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

[329] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본

발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 구체적으로는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, Complement dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 절편이다.

[330]

[331] 한편, GLP-2 또는 GLP-2의 지속형 결합체는 펩타이드 그 자체, 이의 염(예컨대, 상기 펩타이드의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함한다.

[332] 또한, GLP-2 또는 GLP-2의 지속형 결합체는 약학적으로 허용되는 임의의 형태일 수 있다.

[333] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[334] 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.

[335] 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.

[336] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드, 화합물 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

[337]

[338] 구체적인 예로서, 본 발명의 액상 제제는

[339] GLP-2의 지속형 결합체;

[340] 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충물질;

[341] 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨 또는 이들의 조합;

[342] 폴록사머, 폴리소르베이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 비이온성 계면활성제; 및

[343] 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 글리신, 시스테인 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산을 포함하고,

[344] pH 4.5 내지 6.5일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[345]

[346] 구체적인 예로서, 본 발명의 액상 제제는

[347] 약리학적 유효량(예를 들어, 18 nmol/mL 내지 18630 nmol/mL)의 GLP-2의 지속형 결합체;

[348] 5 내지 100 mM의 완충물질;

[349] 1 내지 20% (w/v)의 당알코올, 당, 또는 이들의 조합;

[350] 0.001 내지 0.2% (w/v)의 비이온성 계면활성제; 및

[351] 0.01 내지 1 mg/mL의 아미노산을 포함하고,

[352] pH 4.5 내지 6.5일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[353]

[354] 구체적인 예로서, 본 발명의 액상 제제는

[355] 18 내지 18630 nmol/mL의 GLP-2의 지속형 결합체;

[356] 5 내지 100 mM의 아세트산과 그 염, 또는 구연산과 그 염의 완충물질;

[357] 1 내지 20% (w/v)의 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 또는 이들의 조합;

[358] 0.001 내지 0.2% (w/v)의 폴리소르베이트; 및

[359] 0.01 내지 1 mg/mL의 메티오닌을 포함하고,

[360] pH 4.5 내지 6.5일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[361]

[362] 구체적인 예로서, 본 발명의 액상 제제는

[363] 186 내지 2981 nmol/mL의 GLP-2의 지속형 결합체;

[364] 10 내지 40 mM의 아세트산과 그 염, 또는 구연산과 그 염의 완충물질;

[365] 2 내지 15% (w/v)의 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 또는 이들의 조합;

[366] 0.002 내지 0.05% (w/v)의 폴리소르베이트; 및

[367] 0.02 내지 0.5 mg/mL의 메티오닌을 포함하고,

[368] pH 4.8 내지 6.0일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[369]

[370] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제의 제조방법을 제공한다.

[371] 구체적으로, 상기 제조방법은 (i) GLP-2 및 면역글로불린 Fc 절편이 서로 연결된, GLP-2의 지속형 결합체와 (ii) 당알코올, 당, 또는 이들의 조합; 및 완충물질을 포함하는 안정화제를 서로 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[372] 상기 GLP-2의 지속형 결합체, 완충물질, 당알코올, 당, 안정화제 및 액상 제제에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[373]

[374] 본 발명의 치료 방법은 액상 제제를 약학적(치료적) 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단 범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 약학적(치료적) 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이,

투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[375]

[376] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[377]

[378] 실시예 1. CA-GLP-2 KC-PEG(10K)-면역글로불린 Fc 결합체 또는 CA-GLP-2 RC-PEG(10K)-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

[379]

[380] 10 kDa MAL-ALD PEG(양 말단의 수소가 각각 3-[(3-N-말레이미딜)프로판오일]아미노프로필기와 3-옥소프로필기(프로필알데히드기)로 개질된 분자량 10 kDa의 폴리에틸렌글리콜인 말레이미드-PEG-알데히드, 일본 NOF사)을 CA-GLP-2 KC 또는 CA-GLP-2 RC(CPC, Chinese Peptide Co, 중국)의 34번 시스테인 잔기에 페길화시키기 위하여 CA-GLP-2 KC 또는 CA-GLP-2 RC와 PEG의 몰비를 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 구연산나트륨 pH 2.0, 에탄올이 포함된 버퍼와 염화칼륨 농도 구배를 이용한 SP Sepharose High Performance(GE, 미국) 컬럼을 사용하여 모노 페길화된(mono-PEGylated) CA-GLP-2 KC 또는 모노 페길화된 CA-GLP-2 RC를 정제하였다.

[381] 다음으로, 상기 정제된 모노 페길화된 CA-GLP-2 KC 또는 모노 페길화된 CA-GLP-2 RC와 서열번호 32의 면역글로불린 Fc 절편의 몰비가 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 소디움 시아노보로하이드라이드[sodium cyanoborohydride(NaCNBH3)]를 첨가하였다.

[382] 반응이 종결된 후 반응액은 비스-트리스(bis-Tris) pH 6.5 버퍼와 염화나트륨 농도 구배를 이용하여 Source15Q(GE, 미국) 컬럼에 적용하고, 황산 암모늄과 구연산나트륨 pH 5.0~5.2의 농도 구배를 이용하여 Source 15ISO(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%이었다.

[383]

[384] 실시예 2. CA-GLP-2 RK-PEG(3.4K 또는 10K)-면역글로불린 Fc 결합체의 제조

[385]

[386] 3.4 kDa 또는 10 kDa ALD(2) PEG(양 말단의 수소가 3-옥소프로필기(프로필알데히드기)로 개질된, 분자량 3.4 kDa 또는 10 kDa의 폴리에틸렌글리콜인 알데히드-PEG-알데히드, 일본 NOF사)를 CA-GLP-2 RK(CPC, Chinese Peptide Co., 중국)의 34번 리신 잔기에 페길화시키기 위하여 CA-GLP-2 RK와 PEG의 몰비를 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 소디움 시아노보로하이드라이드를 첨가하여 반응시켰다. 반응액은 구연산나트륨 pH 2.0, 에탄올이 포함된 완충 용액과 염화칼륨 농도 구배를 이용한 Source 15S (GE, 미국) 컬럼을 사용하여 모노 페길화된 CA-GLP-2 RK를 정제하였다.

[387] 다음으로, 상기 정제된 모노 페길화된 CA-GLP-2 RK와 서열번호 32의 면역글로불린 Fc 절편의 결합체를 상기 실시예 1과 같은 반응 및 정제 조건에 따라, 제조 및 정제하였다. HPLC 역상 분석 결과 면역글로불린 Fc 절편에 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%이었다.

[388]

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

[390]

[391] 실시예 2의 방법에 따라 CA-GLP-2 KK 및 CA-GLP-2 K_{AZ}K를 이용하여, 서열번호 32의 면역글로불린 Fc 절편에 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.

[392]

[393] 실시예 4: 완충물질의 종류와 pH에 따른 GLP-2 유도체 펩타이드의 지속형 결합체의 안정성 평가

[394]

[395] 완충물질, 계면활성제로서 폴리소르베이트 20, 당알코올, 그리고 메티오닌으로 이루어진 액상 제제를 기초로 하여 완충물질의 종류와 pH 하에서 GLP-2 유도체 펩타이드(이하, 'GLP-2 유도체'로 명명)의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다.

[396] 하기 표 2와 같은 조성을 각각 GLP-2 유도체(CA-GLP-2 RK(3.4K PEG))의

지속형 결합체(액상 제제 내 농도: 약 186.3 nmol/mL)의 액상 제제로 사용하여 25℃에서 5주간 보관 후, 이온교환 크로마토그래피법(Ion Exchange High Performance Liquid Chromatography, IE-HPLC), 역상 크로마토그래피법(Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) 및 크기배제 크로마토그래피법(Size Exclusion Chromatography, SE-HPLC)을 이용해 분석하였다.

[397] 표 3의 IE-HPLC(%), RP-HPLC(%) 및 SE-HPLC(%)는 Area% / Start Area%(%)로서, 초기 결과값에 대비한 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 잔존율을 나타낸다.

[398]

[399] [표2]

번호	완충물질	pH	당알코올 또는 당(w/v)	계면활성제(w/v)	그 외
1	20 mM 구연산나트륨	4.8	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
2	20 mM 구연산나트륨	5.1	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
3	20 mM 구연산나트륨	5.4	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
4	20 mM 구연산나트륨	5.7	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
5	20 mM 구연산나트륨	6.0	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
6	20 mM 아세트산나트륨	4.8	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
7	20 mM 아세트산나트륨	5.1	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
8	20 mM 아세트산나트륨	5.4	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
9	20 mM 아세트산나트륨	5.7	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌
10	20 mM 아세트산나트륨	6.0	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	0.1 mg/mL 메티오닌

[400]

[401] [표3]

번호	IE-HPLC (%)			RP-HPLC (%)			SE-HPLC (%)		
	초기	2주	5주	초기	2주	5주	초기	2주	5주
1	100	89.7	71.1	100	98.0	92.6	100	99.8	99.4
2	100	92.4	76.0	100	99.2	94.9	100	99.7	99.4
3	100	93.8	74.8	100	98.1	94.6	100	99.7	99.2
4	100	90.2	66.5	100	98.0	95.0	100	99.5	98.6
5	100	84.2	54.1	100	97.8	94.3	100	99.2	98.2
6	100	82.9	64.8	100	96.9	96.8	100	99.7	99.1
7	100	85.9	70.1	100	97.0	96.7	100	99.8	99.4
8	100	88.5	74.4	100	96.8	96.4	100	99.8	99.5
9	100	91.5	78.1	100	97.3	97.1	100	99.8	99.5
10	100	92.8	79.5	100	97.5	97.5	100	99.8	99.5

[402]

[403] 상기 결과에서 보듯이, 구연산나트륨과 아세트산나트륨 완충액의 존재 하에서 pH에 따라 안정성의 변화를 가짐을 확인하였다.

[404]

[405] 실시예 5: 안정화제 종류와 pH에 따른 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 안정성 평가

[406]

[407] 상기 액상 제제의 조성(아세트산나트륨, 폴리소르베이트 20 및 메티오닌)에 기초하여 안정화제의 종류 및 pH에 따른 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다.

[408] 안정화제의 경우, 상기 실시예 1에서 확인된 만니톨을 포함하여 소르비톨과 수크로스를 추가하였고, pH는 5.1과 6.0을 비교하여 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 안정성을 비교하였다.

[409] 이때 만니톨, 소르비톨 및 수크로스의 농도는 시판 제형 및 허가기관에서 권고하는 최대 허용범위를 고려하였다.

[410] 하기 표 4와 같은 조성을 각각 GLP-2 유도체(CA-GLP-2 RK(3.4K PEG))의 지속형 결합체(액상 제제 내 농도: 약 1117.8 nmol/mL)의 액상 제제로 사용하여 25℃에서 4주간 보관 후, IE-HPLC, RP-HPLC 및 SE-HPLC을 이용해 분석하였다.

[411] 표 5의 IE-HPLC(%), RP-HPLC(%) 및 SE-HPLC(%)는 Area% / Start Area%(%)로서, 초기 결과값에 대비한 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 잔존율을 나타낸다.

[412]

[413] [표4]

번호	완충물질	pH	당알코올 또는 당(w/v)	계면활성제(w/v)	그 외
1	20 mM 아세트산나트륨	6.0	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트20	0.1 mg/mL 메티오닌
2	20 mM 아세트산나트륨	6.0	5% 소르비톨	0.02% 폴리소르베이트20	0.1 mg/mL 메티오닌
3	20 mM 아세트산나트륨	6.0	8% 수크로스	0.02% 폴리소르베이트20	0.1 mg/mL 메티오닌
4	20 mM 아세트산나트륨	5.1	5% 만니톨	0.02% 폴리소르베이트20	0.1 mg/mL 메티오닌
5	20 mM 아세트산나트륨	5.1	5% 소르비톨	0.02% 폴리소르베이트20	0.1 mg/mL 메티오닌
6	20 mM 아세트산나트륨	5.1	8% 수크로스	0.02% 폴리소르베이트20	0.1 mg/mL 메티오닌

[414]

[415] [표5]

	IE-HPLC (%)			RP-HPLC (%)			SE-HPLC (%)		
번호	초기	2주	4주	초기	2주	4주	초기	2주	4주
1	100	89.1	83.9	100	96.3	95.6	100	99.8	99.8
2	100	89.5	85.3	100	96.4	95.6	100	99.7	99.7
3	100	89.6	85.4	100	96.7	95.8	100	99.7	99.9
4	100	84.1	77.9	100	96.5	95.3	100	100.0	99.9
5	100	84.0	76.8	100	96.7	94.6	100	99.8	99.7
6	100	82.8	74.3	100	96.6	94.9	100	100.0	100.0

[416]

[417] 상기 결과에서 보듯이, 본원발명의 액상 제제에서 GLP-2 유도체의 지속형 결합체는 안정하였다.

[418]

[419] 실시예 6: 최종 제형 조성을 이용한 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 고농도 액상 제형의 장기 보존 안정성 시험

[420]

[421] 앞선 실시예를 통해 최종 선택한 pH 6.0의 아세트산나트륨, 수크로즈, 폴리소르베이트 20 및 메티오닌을 포함하는 액상 제제를 이용하여, GLP-2 유도체(CA-GLP-2 RK(3.4K PEG))의 지속형 결합체의 세 가지 농도별 고농도 액상 제형의 장기 보존 안정성을 분석하였다. 표 6은 5±3°C에서 12개월 보관된 고농도 액상 제형의 장기보존 안정성 결과를 나타내고, RP-HPLC(%) 및 SE-HPLC(%)는 Area% / Start Area%(%)로서, 초기 결과값에 대비한 GLP-2 유도체의 지속형 결합체의 잔존율을 나타낸다.

[422]

[423] [표6]

제형조성	20 mM 아세트산나트륨(pH 6.0), 8% 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20, 0.1 mg/mL 메티오닌					
보관온도	5±3°C					
제형농도	558.9 nmol/mL		1490.4 nmol/mL		2980.8 nmol/mL	
	RP-HPLC (%)	SE-HPLC (%)	RP-HPLC (%)	SE-HPLC (%)	RP-HPLC (%)	SE-HPLC (%)
0개월	100	100	100	100	100	100
1개월	99.3	100.2	100.2	100.2	101.1	100.1
3개월	99.8	100.4	100.5	100.1	101.4	100.1
6개월	98.2	100.5	98.5	99.7	98.7	99.6
9개월	97.5	100.1	97.8	99.9	99.1	99.7

[424]

[425] 장기 보존 안정성 시험 결과, 세 가지 고농도의 GLP-2 유도체의 지속형 결합체는 본 발명의 액상제제에서 9개월 이상 안정하다는 것을 확인하였다.

[426]

[427] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허 청구범위의 의미 및 범위,

그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.