

명세서

발명의 명칭: 단장증후군의 예방 또는 치료를 위한 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2의 병용 요법

기술분야

- [1] 본 발명은 단장증후군의 예방 또는 치료를 위한 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2의 병용 요법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 단장증후군(short bowel syndrome, SBS)는 선천적으로 소장의 길이가 짧거나 또는 수술 등으로 인해 후천적으로 소장의 일정 비율 이상이 소실(소장의 흡수면적 감소)되어 발생하는 소화흡수불량증으로서, 영양 흡수 부족, 영양 흡수 장애, 복통, 설사, 지방변, 유당불내증, 탈수, 체중 감소, 무기력, 피로 등의 증상이 나타날 수 있다.
- [3]
- [4] 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 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, 장평활근을 이완시킨다. 또한, GLP-2는 단장증후군을 갖는 설치류 실험모델에서 영양 흡수 및 소화관 흡수를 증진시키는 것이 보고되었다(Ljungmann K et al., Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol., 2001, 281(3):G779-85).
- [5]
- [6] 한편, 인슐린 분비 펩타이드의 일종인 글루카곤 유사 펩타이드-1(Glucagon like peptide 1, GLP-1)은 회장과 대장의 L-세포에서 분비되는 인크레틴(incrutin) 호르몬이다. GLP-1의 주요한 작용은 인슐린 분비를 증가시키며, 포도당의 농도에 따른 인슐린 분비(Glucose dependent secretion)가 이루어져 저혈당이 발생하지 않는다. 이런 특징으로 제 2형 당뇨병의 치료방법으로 적용되나, 혈중 반감기가 2분 내외로 매우 짧기 때문에 약제로 개발하는데 큰 제약을 갖고 있다. 이에 따라 개발되어 시판되는 GLP-1 작용제로서는 글리아 몬스터 도마뱀(glia monster)의 침샘으로부터 정제된 GLP-1 유사체인 엑센딘-4(Exendin-4)가 있다. 이는 DPP-IV(Dipeptidyl peptidase-4)에 대한 저항성과 함께 GLP-1 보다 높은 생리 활성을 가지며, 따라서 체내 반감기가 2-4시간으로 GLP-1에 비해 길어진 체내 반감기를 가진다(US 5,424,286). 그러나 DPP-IV의 저항성을 증가시키는 방법만으로는 충분한 생리활성의 지속기간을 기대할 수 없는데, 예를 들어 현재 시판되고 있는 엑센딘-4(엑세나티드, exenatide)의 경우 환자에게 하루 2회

주사를 통해 투여되어야 하며, 투여에 따른 구토유발 및 메스꺼움 현상이 환자에게 큰 부담으로 작용되는 단점이 여전히 남아있다.

[7]

[8] 현재까지 GLP-2를 이용한 단장증후군 치료제 개발은 미비한 상태인바, 지속적인 치료제 개발의 필요성이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 하나의 목적은 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2(Glucagon-like peptide-2, GLP-2)를 병용하는 단장증후군(short bowel syndrome)의 예방, 개선 또는 치료를 위한 요법을 제공하는 것이다.

[10]

[11] 본 발명의 또 하나의 목적은 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 단장증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 GLP-2와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[12]

[13] 본 발명의 또 하나의 목적은 GLP-2를 함유하는 단장증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 인슐린 분비 펩타이드와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[14]

[15] 본 발명의 또 하나의 목적은 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하는, 조합물을 제공하는 것이다.

[16]

[17] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조합물을 포함하는, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[18]

[19] 본 발명의 또 하나의 목적은 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하는, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 키트를 제공하는 것이다.

[20]

[21] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트를 이를 필요로 하는 개체에 투여 및/또는 사용하는 단계를 포함하는, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[22]

[23] 본 발명의 또 하나의 목적은 약학적 유효량의 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 조성물, 및 약학적 유효량의 GLP-2를 함유하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 병용 투여 및/또는 병용 사용하는 단계를 포함하는, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[24]

- [25] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트의 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 용도, 및/또는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [26] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 병용하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 요법이다.
- [27]
- [28] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 조성물로서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 GLP-2와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물이다.
- [29] 하나의 구체예로서, 본 발명은 약학적 유효량의 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 GLP-2와 병용 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [30] 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 단장증후군의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물로서, 상기 식품 조성물은 GLP-2와 병용 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [31]
- [32] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 GLP-2를 함유하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 조성물로서, 상기 GLP-2는 인슐린 분비 펩타이드와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물이다.
- [33] 하나의 구체예로서, 본 발명은 약학적 유효량의 GLP-2를 함유하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 인슐린 분비 펩타이드와 병용 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [34] 다른 하나의 구체예로서, 본 발명은 GLP-2를 함유하는 단장증후군의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물로서, 상기 식품 조성물은 인슐린 분비 펩타이드와 병용 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [35]
- [36] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(Glucagon-like peptide-1, GLP-1), 엑센딘-3, 엑센딘-4, 이들의 작용제(agonist), 유도체, 단편, 변이체, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [37] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 인슐린 분비 펩타이드의 N-말단 히스티딘 잔기가 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, N-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘으로 치환된 인슐린 분비 펩타이드 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [38] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는

천연형 엑센딘-4, 엑센딘-4의 N-말단 첫 번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 하이드록실기로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 2개의 메틸기로 수식된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 카복실기로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(라이신)이 세린으로 치환된 엑센딘-4 유도체, 또는 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(라이신)이 아르기로 치환된 엑센딘-4 유도체인 것을 특징으로 한다.

- [39] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-2는 천연형 GLP-2 또는 GLP-2 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [40] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2 서열에서 적어도 하나의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 GLP-2 유도체인 것을 특징으로 한다.
- [41] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학적 조성물로서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 1에서 1번, 2번, 30번 및 33번의 아미노산 중 적어도 하나의 아미노산에 변형이 일어난 것인 것을 특징으로 한다.
- [42] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-2 유도체는 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [43] [일반식 1]
- [44] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 9)
- [45] 여기서,
- [46] X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, N-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;
- [47] X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;
- [48] X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;
- [49] X_{34} 는 부존재하거나, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘, 6-아지도라이신 또는 시스테인이고;
- [50] 다만, 일반식 1의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 제외한다.
- [51] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-2 유도체는
- [52] (1) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [53] (2) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 라이신이거나,
- [54] (3) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 라이신이거나,

- [55] (4) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 6-아지도라이신이거나,
- [56] (5) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [57] (6) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나, 또는
- [58] (7) X_1 이 히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인인 것을 특징으로 한다.
- [59] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-2 유도체는 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [60] [일반식 2]
- [61] $X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$ (서열번호 10)
- [62] 여기서,
- [63] X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;
- [64] X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;
- [65] X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;
- [66] X_{34} 는 하나 이상의 임의의 아미노산 또는 변형이 일어난 하나 이상의 임의의 아미노산이고;
- [67] 다만, 일반식 2의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 제외한다.
- [68] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 2 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 펩타이드인 것을 특징으로 한다.
- [69] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 개체에 투여 시 체중 증가, 소장 길이 증가, 위장관 운동성 감소, 및 영양분 흡수 증가 중 하나 이상을 야기하는 것을 특징으로 한다.
- [70] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2는 이의 C-말단이 변형되지 않았거나 아미드화된 것을 특징으로 한다.
- [71] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, (i) 상기 인슐린 분비 펩타이드는 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이거나,
- [72] (ii) 상기 GLP-2는 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이거나,
- [73] (iii) 상기 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2 각각은 이들의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 것을 특징으로 한다.
- [74] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 결합체는 하기 화학식 1로

표시되는 것을 특징으로 한다:

- [75] [화학식 1]
- [76] X - La - F
- [77] 여기서,
- [78] X는 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2이고;
- [79] L은, 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며;
- [80] a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [81] F는, 면역글로불린 Fc 영역이며;
- [82] 상기 "-"는 공유결합이다.
- [83] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 IgG4 Fc 영역인 것을 특징으로 한다.
- [84] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이합체이며, L의 한 말단이 상기 두 개의 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [85] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L은 폴리에틸렌글리콜인 것을 특징으로 한다.
- [86] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부위의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.
- [87] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [88] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 조성물은 GLP-2를 함유하는 조성물과 동시에, 순차적으로 또는 역순으로 병용 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [89]
- [90] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는, 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하는 조합물이다.
- [91]
- [92] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는, 상기 조합물을 포함하는, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물이다.
- [93]
- [94] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는, 상기 조합물을 포함하는, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 키트이다.
- [95]
- [96] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는, 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트를 이를 필요로 하는 개체에 투여 및/또는 사용하는 단계를 포함하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 방법이다.
- [97]
- [98] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는, 약학적 유효량의 인슐린 분비

펩타이드를 함유하는 조성물, 및 약학적 유효량의 GLP-2를 함유하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 병용 투여 및/또는 병용 사용하는 단계를 포함하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 방법이다.

[99]

[100] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는, 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트의 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 용도, 및/또는 단장증후군의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 용도이다.

발명의 효과

[101] 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2의 병용 투여 요법은 단일 투여 요법에 비해 향상된 효과를 가져서 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[102] 도 1은 인슐린 분비 펩타이드(GLP-1 유도체 지속형 결합체) 및 GLP-2(GLP-2 유도체 지속형 결합체)의 병용 투여에 따른 마우스의 체중 변화를 나타낸 도이다.

[103] 도 2는 인슐린 분비 펩타이드(GLP-1 유도체 지속형 결합체) 및 GLP-2(GLP-2 유도체 지속형 결합체)의 병용 투여에 따른 마우스의 소장 길이 변화를 나타낸 도이다.

[104] 도 3은 인슐린 분비 펩타이드(GLP-1 유도체 지속형 결합체) 및 GLP-2(GLP-2 유도체 지속형 결합체)의 병용 투여에 따른 위장관 운동성 변화를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[105] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[106] 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.

[107] 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.

[108] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(2-aminoisobutyric acid), AZK(6-azidolysine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

[109]

[110] 알라닌 Ala, A 아르지닌 Arg, R

- [111] 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D
- [112] 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E
- [113] 글루타민 Gln, Q 글라이신 Gly, G
- [114] 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I
- [115] 류신 Leu, L 라이신 Lys, K
- [116] 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F
- [117] 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S
- [118] 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W
- [119] 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V
- [120]
- [121] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 단장증후군(short bowel syndrome, SBS)의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-2(Glucagon-like peptide-2, GLP-2)와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [122] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 약학적 조성물은 약학적 유효량의 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 단장증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 GLP-2(예컨대, 약학적 유효량의 GLP-2)와 병용 투여되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [123]
- [124] 본 발명을 구현하는 또 하나의 양태는 GLP-2를 함유하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 GLP-2는 인슐린 분비 펩타이드와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [125] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 약학적 조성물은 약학적 유효량의 GLP-2를 함유하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 인슐린 분비 펩타이드(예컨대, 약학적 유효량의 인슐린 분비 펩타이드)와 병용 투여되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [126]
- [127] 본 발명의 하나의 구체예는 상기 병용 투여는 (i) 인슐린 분비 펩타이드와 함께 GLP-2를 혼합물의 형태 또는 별개의 분리된 형태로 더 포함하는 약학적 조성물을 이용하여 병용 투여하거나, 또는 (ii) 상기 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 약학적 조성물을 GLP-2를 함유하는 별개의 약학적 조성물과 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [128]
- [129] 본 발명의 또 하나의 양태는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 병용하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 용도를 제공한다.
- [130] 또 하나의 구체예는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 병용하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [131] 구체적으로, 본 발명의 일 양태는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하는 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트를 제공한다. 일 구체예로, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트를 제공한다.
- [132]
- [133] 본 발명에서 용어 "조합물(combination)"은 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2의 병용 투여 용도를 갖는 것으로, "병용 용도(combined used)"와 같은 의미로 이해될 수 있다. 이는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2가 병용되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물 및 약학적 키트 형태도 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [134] 상기 조합물은
- [135] a) 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2가 혼합된 하나의 혼합물(mixture)로 투여되는 것이거나; 또는
- [136] b) 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2가 분리된 형태로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [137] 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2가 분리된 형태일 경우, 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2 각각이 별개의 제제로 제제화되어, 별개의 제제가 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여될 수 있다.
- [138] 본 발명에서, "병용 투여", "병용되는", 또는 "병용하는"은 단지 동시의 투여를 의미하는 것뿐만이 아니라, 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2가 개체에 함께 작용하여 각 물질이 본연의 기능과 동등하거나 그 이상의 수준을 수행할 수 있는 투여 형태로 이해되어야 한다. 따라서, 본원에서, "병용"이란 용어가 사용될 경우 이는 동시, 개별, 순차, 또는 역순 투여를 나타내는 것으로 그 순서가 무제한인 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차, 역순 또는 개별적인 경우, 투여의 순서는 특별히 제한되지 않고 다만 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로온 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.
- [139]
- [140] 본 발명에서 용어 "조합물을 포함하는 조성물(composition)"은 상기 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하는 조합물 그 자체이거나, 이를 포함하고, 치료학적 용도를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그 예로, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 용도를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본원에서 "조합물을 포함하는 조성물"은 "조성물"과 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [141] 본 발명에 따른 조합물을 포함하는 조성물은 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 병용 투여하기 위한 것으로, 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2가 하나의 제제로 제제화된 것이거나, 또는 개별적으로 제제화된 것일 수 있다. 구체적으로, 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [142]

- [143] 본 발명에서 용어 "키트"는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 병용 투여하기 위해, 본 발명에 따른 조합물 또는 조성물을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 키트에는 하나의 제제로 제제화된 인슐린 분비 펩타이드와 GLP-2; 또는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2 각각의 개별 제제를 포함하는 것일 수 있고, 두 물질의 병용 투여에 필요한 물질을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [144]
- [145] 본 발명은 인슐린 분비 펩타이드에 GLP-2를 추가로 포함하여 병용하여 사용할 경우, 인슐린 분비 펩타이드 단독에 비해 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 효과가 획기적으로 증가되는 것을 확인하여 상기 병용 사용 요법을 제공하게 되었다.
- [146]
- [147] 상기 "인슐린 분비 펩타이드"는 인슐린 분비 기능을 보유한 펩타이드를 의미하며, 췌장 베타세포의 인슐린의 합성 또는 발현을 자극할 수 있다. 상기 인슐린 분비 펩타이드는 그 예로, GLP-1(Glucagon like peptide-1), 엑센딘-3(exendin-3) 또는 엑센딘-4(exendin-4)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 인슐린 분비 펩타이드는 천연형 인슐린 분비 펩타이드뿐만 아니라, 그의 전구물질(precursors), 작용제(agonist), 유도체(derivatives), 단편(fragments) 및 변이체(variants) 등을 포함하며, 또한 이들의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체의 형태도 포함한다. 상기 인슐린 분비 펩타이드는 약학적 유효량으로 약학적 조성물에 포함될 수 있다.
- [148] GLP-1은 소장에서 분비되는 호르몬으로서 일반적으로 인슐린 생합성 및 분비를 촉진하고 글루카곤 분비를 억제하며 세포 내 글루코스 흡수를 촉진한다. 소장에서 글루카곤 전구체는 3개의 펩타이드로 분해되는데, 글루카곤, GLP-1, GLP-2이다. 여기서 GLP-1은 GLP-1(1-37)을 의미하며 인슐린 분비기능이 없는 형태이고, GLP-1(7-37) 형태로 프로세싱되어 활성형 GLP-1(7-37)이 된다. GLP-1(7-37) 아미노산 서열은 아래와 같다.
- [149] GLP-1(7-37):
- [150] HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFWL LKNGG PSSGA PPPS (서열번호 32)
- [151]
- [152] 엑센딘-3과 엑센딘-4는, GLP-1과 53%의 아미노산 서열 유사성을 보이는 39 개 아미노산으로 이루어진 GLP-1 유사체 또는 유도체로서, 인슐린분비 펩타이드에 해당한다. 엑센딘-3과 엑센딘-4의 아미노산서열은 아래와 같다.
- [153] 엑센딘-3:
- [154] HSDGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS (서열번호 33)
- [155] 엑센딘-4:
- [156] HEGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS (서열번호 34)
- [157]

- [158] 인슐린 분비 펩타이드 유도체는, 인슐린 분비 기능을 가지며, 천연형 인슐린 분비 펩타이드와 아미노산 서열에서 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 보이는 것일 수 있고/있거나, 인슐린 분비 펩타이드의 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.
- [159] 하나의 구체적인 실시 형태에서 본 발명의 인슐린 분비 펩타이드 유도체는 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. 상기 방법을 통해 제조된 인슐린 분비 펩타이드 유도체는 인슐린 분비 펩타이드의 N-말단 히스티딘 잔기가 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, N-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘으로 치환된 인슐린 분비 펩타이드 유도체일 수 있다.
- [160] 하나의 구체적인 예로서, 인슐린분비 펩타이드 유도체는 GLP-1 유도체일 수 있고, GLP-1 유도체는 엑센딘-3, 엑센딘-4, 또는 이들의 유도체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [161] 또한, 인슐린분비 펩타이드 유도체의 예로 엑센딘-4의 N-말단 아미노기 또는 아미노산 잔기를 화학적으로 변이시킨 유도체일 수 있으며, 엑센딘-4의 N-말단 첫번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 이미다조아세틸테스히스티딘 엑센딘-4 (imidazoacetyl-deshistidyl-exendin-4, CA-exendin-4), 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 제거된 테스아미노히스티딘 엑센딘-4(desaminohistidyl exendin-4, DA-exendin-4), 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 하이드록실기로 치환된 베타-히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘 엑센딘-4(β -hydroxyimidazopropionyl-deshistidyl exendin-4, HY-exendin-4), 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 2개의 메틸기로 수식된 N-디메틸히스티딘 엑센딘-4(N-dimethylhistidyl exendin-4, DM-exendin-4), 또는 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 카복실기로 치환된 베타-카복시이미다조프로피온일테스히스티딘-엑센딘-4(β -carboxyimidazopropionyl-deshistidyl exendin-4, CX-exendin-4), 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(라이신)이 세린으로 치환된 엑센딘-4 유도체, 또는 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(라이신)이 아르지닌으로 치환된 엑센딘-4 유도체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [162]

- [163] 인슐린 분비 펩타이드 단편은, 천연형 인슐린 분비 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 하나 이상의 아미노산이 제거 및/또는 추가된 형태를 의미하며, 추가된 아미노산은 천연에 존재하지 않는 아미노산(예; D형 아미노산)도 가능하다.
- [164] 인슐린 분비 펩타이드 변이체는, 천연형 인슐린 분비 펩타이드와 아미노산이 하나 이상 다른 펩타이드로서, 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 보이며, 인슐린 분비기능을 보유한 펩타이드를 의미한다.
- [165] 인슐린 분비 펩타이드 작용제는 인슐린 분비 펩타이드의 구조와 상관없이 인슐린 분비 펩타이드의 생체 내 수용체에 결합하여 인슐린 분비 펩타이드와 동일한 생물학적 활성을 나타내는 물질을 의미한다.
- [166]
- [167] 본 발명의 유도체, 단편, 변이체 및 작용제에서 각각 사용된 제조방법은 독립적으로 사용될 수 있고 조합도 가능하다. 예를 들어 아미노산 서열이 하나 이상 다르고 N-말단 아미노산 잔기에 탈아미노화(deamination)된 인슐린 분비 펩타이드도 본 발명에 포함한다.
- [168]
- [169] 본 발명에서 용어 “글루카곤 유사 펩타이드-2” 또는 “GLP-2(Glucagon-like peptide-2)”는 글루카곤 유사 펩타이드-2 수용체의 작용제(agonist)로서, 폴리펩타이드 형태 또는 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체의 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 글루카곤 유사 펩타이드-2 또는 GLP-2라고 가리킬 때에는 천연형 사람 GLP-2와 일치하는 서열뿐만 아니라, GLP-2 유도체도 포함되며, 천연형 GLP-2 또는 GLP-2 유도체에 생체적합성 물질이 결합된 형태의 지속형 결합체도 망라한다. 상기 GLP-2는 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 약학적 조성물과 병용 투여 또는 사용될 수 있도록, 상기 조성물에 또는 이와 별개의 조성물에 약학적 유효량으로 포함될 수 있다.
- [170]
- [171] 천연형 GLP-2의 아미노산 서열은 아래와 같다.
- [172] GLP-2(1-33)
- [173] HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (서열번호 1)
- [174]
- [175] 본 발명에서 “GLP-2 수용체 작용제”는 생체 내 또는 분리된 사람 글루카곤 유사 펩타이드-2 수용체와 결합하여 천연형 GLP-2와 동등한 혹은 유사한 생리활성을 일으키는 물질을 말한다. 예를 들어, GLP-2 작용제에는 천연형 GLP-2 또는 GLP-2 유도체가 포함될 수 있다.
- [176]
- [177] 본 발명에서 “GLP-2 유도체”는 천연형 GLP-2와 비교하여 아미노산 서열에 하나 이상의 차이가 있는 펩타이드; 천연형 GLP-2 서열을 개질(modification)을

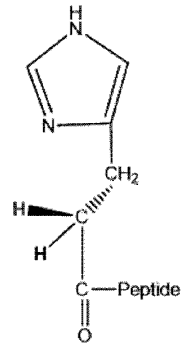
통하여 변형시킨 펩타이드; 및/또는 천연형 GLP-2와 같이 단장증후군의 예방, 치료 및/또는 개선 기능을 가진 천연형 GLP-2의 모방체를 포함한다. 구체적으로, 상기 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2 서열에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [178] 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; α -methylation, α -hydroxylation, azido 기로 치환), 제거(예; deamination) 및/또는 수식(예; N-methylation)된 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [179] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 GLP-2의 유도체는 천연형 GLP-2와 아미노산 서열에서 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 보이는 것일 수 있고/있거나, GLP-2의 아미노산 한 잔기의 일부 그룹이 화학적으로 치환(예; α -methylation, α -hydroxylation, azido 기로 치환), 제거(예; deamination) 및/또는 수식(예; N-methylation)된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [180]
- [181] 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.
- [182] 구체적으로, GLP-2 유도체는 GLP-2의 N-말단 첫번째 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-하이드록시이미다조프로피온일데스히스티딜 GLP-2(β -hydroxyimidazopropionyl-deshistidyl GLP-2, HY-GLP-2), GLP-2의 N-말단 아미노기가 2개의 메틸기로 수식된 N-디메틸히스티딜 GLP-2(N-dimethylhistidyl

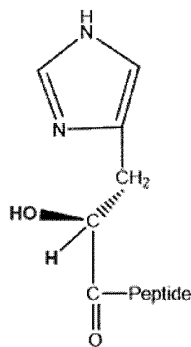
GLP-2, DM-GLP-2), 또는 GLP-2의 N-말단 아미노기가 카복실기로 치환된 베타-카복시이미다조프로피온일테스히스티딜-GLP-2(β -carboxyimidazopropionyl-deshistidyl GLP-2, CX-GLP-2)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 하나의 비제한적 예시로서 GLP-2 유도체 제조에 사용된 물질 구조는 아래와 같다.

[183]

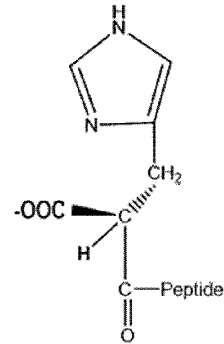
[184]



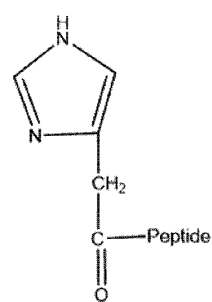
**Des-amino-histidyl
(DA)-GLP-2**



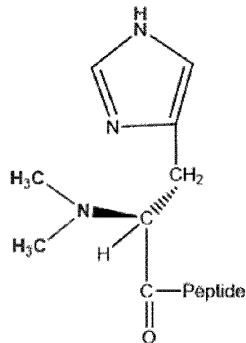
**Beta-hydroxy-imidazopropionyl
(HY)-GLP-2**



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



**Imidazoacetyl
(CA)-GLP-2**



**Dimethyl-histidyl
(DM)-GLP-2**

[185] 본원에서 이미다조아세틸테스히스티딜(딘), 테스아미노히스티딜(딘), 베타-히드록시이미다조프로피온일테스히스티딜(딘), N-디메틸히스티딜(딘), 및 베타-카복시이미다조프로피온일테스히스티딜(딘)은 각각 이미다조아세틸, 테스-아미노-히스티딜, 베타-히드록시-이미다조프로피온일, 디메틸-히스티딜, 베타-카복실-이미다조프로피온일과 동일한 의미로 사용될 수 있다.

[186]

[187] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 1에서 1번, 2번, 30번 및 33번의 아미노산 중 적어도 하나의 아미노산에 변형이 일어난 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 변형은 적어도 하나의 아미노산의 치환, 추가, 제거, 수식, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형일 수 있으며, 이 때 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; α -methylation, α -hydroxylation, azido 기로 치환), 제거(예; deamination) 및/또는 수식(예; N-methylation)된 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[188]

[189]

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

[191] [일반식 1]

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

[193] 여기서,

[194] X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, N-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;

[195] X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;[196] X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;

[197] X_{34} 는 부존재하거나, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘, 6-아지도라이신, 또는 시스테인임.

[198]

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

[200] [일반식 2]

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

[202] 여기서,

[203] X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, N-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;

[204] X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;[205] X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;

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

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

[208]

- [209] 또한, 상기 일반식 1 또는 2의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 GLP-2 유도체에서 제외될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다
- [210]
- [211] 구체적으로, 본 발명의 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. 또한, 상기 GLP-2 유도체는 C-말단(예들 들어, 33번째 아미노산)에 티올기(예들 들어, 시스테인), 아미노기(예들 들어, 라이신, 아르지닌, 글루타민 또는 히스티딘), 또는 아지드기(예들 들어, 6-아지도라이신)가 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [212] 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(예들 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.
- [213] 구체적으로, 본 발명에 따른 GLP-2 유도체는 적어도 하나의 잔기가 시스테인, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘 또는 6-아지도라이신일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [214] 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 이미다조아세틸데스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [215] 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 이미다조아세틸데스히스티딘을 포함할 수 있으며, 그 예로 서열번호 3의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [216] 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(예를 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.

[217] 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.

[218] 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.

[219] 구체적으로, 본 발명의 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌의 2-아미노이소부티르산으로의 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.

[220]

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

[222] [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

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

[224]

[225] 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.

[226] 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.

[227]

[228] 구체적으로, GLP-2 유도체는 일반식 1 또는 2에서 (1) X₂가 글라이신 또는 Aib이거나, (2) X₃₀이 라이신 또는 아르지닌이거나, 또는 (3) X₂가 글라이신 또는 Aib이고, X₃₀이 라이신 또는 아르지닌일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[229]

[230] 구체적으로, GLP-2 유도체는 일반식 1 또는 2에서

[231] (1) X₁이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X₂가 글라이신이고, X₃₀이 라이신이고, X₃₄가 시스테인이거나,

[232] (2) X₁이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X₂가 글라이신이고, X₃₀이 라이신이고, X₃₄가 라이신이거나,

[233] (3) X₁이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X₂가 글라이신이고, X₃₀이 아르지닌이고, X₃₄가 라이신이거나,

- [234] (4) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 6-아지도라이신이거나,
- [235] (5) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
- [236] (6) X_1 이 이미다조아세틸데스히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나, 또는
- [237] (7) X_1 이 히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [238]
- [239] 본 발명에서 천연형 GLP-2의 작용제, 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.
- [240]
- [241] 본 발명에서, 상기 GLP-2 또는 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-2 또는 GLP-2 유도체는 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.
- [243] 구체적으로, 본 발명에서, GLP-2 또는 GLP-2 유도체는 이의 C-말단이 변형되지 않았거나 아미드화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [244]
- [245] 본 발명에서, 인슐린 분비 펩타이드 및/또는 GLP-2는 각각의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체의 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 지속형 결합체는 생체적합성물질(예로서, 면역글로불린 Fc 영역)이 결합되지 않은 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2의 유도체에 비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2에 생체적합성 물질이 결합하여 반감기가 증가된, 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2를 포함하는 결합체를 각각 "인슐린 분비 펩타이드 지속형 결합체 또는 인슐린 분비 펩타이드의 지속형 결합체" 또는 "GLP-2 지속형 결합체 또는 GLP-2의 지속형 결합체"로 지칭한다. 본 발명에서 지속형 결합체는 결합체와 혼용된다.
- [246] 하나의 구체예에서,
- [247] (i) 상기 인슐린 분비 펩타이드는 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이거나,
- [248] (ii) 상기 GLP-2는 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이

결합된, 지속형 결합체의 형태이거나,

[249] (iii) 상기 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2 각각은 이들의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태일 수 있다.

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

[251] 또한, 지속형 결합체에 있어서 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2와 생체적합성물질(예로서, 면역글로불린 Fc 영역)의 연결은 물리 또는 화학 결합이거나, 비공유 또는 공유 결합일 수 있으며, 구체적으로 공유 결합일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[252] 또한, 지속형 결합체에서 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2와 생체적합성물질(예로서, 면역글로불린 Fc 영역)의 연결 방법은 특별히 제한되지 않으나, 링커를 통해 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2와 생체적합성물질(예로서, 면역글로불린 Fc 영역)이 서로 연결된 것일 수 있다.

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

[254]

[255] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2의 지속형 결합체는 하기 화학식 1의 구조를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[256] [화학식 1]

[257] X - La - F

[258] 여기서,

[259] X는 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2이고;

[260] L은 링커(예를 들어, 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이고;

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

[262] F는 X의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)이며;

[263] 상기 “-“는 화학적 결합(예를 들어, 공유결합)이다.

[264]

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

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

[267]

[268] 본 발명에 따른 결합체에서 F는 X, 즉 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.

[269] 상기 F는 X와 공유 화학결합 또는 비공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수

있으며, 공유 화학결합, 비공유 화학결합 또는 이들의 조합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.

- [270] 상기 F는 X의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 물질은 생체적합성 물질로서, 예를 들어, 고분자 중합체, 지방산, 콜레스테롤, 알부민 및 이의 단편, 알부민 결합물질, 특정 아미노산 서열의 반복단위의 중합체, 항체, 항체 단편, FcRn 결합물질, 생체 내 결합조직, 뉴클레오타이드, 파이브로넥틴, 트랜스페린(Transferrin), 사카라이드(saccharide), 헤파린, 및 엘라스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [271] 상기 엘라스틴의 경우 수용성 전구체인 인간 트로포엘라스틴(tropoelastin) 일 수 있으며, 이들 중 일부 서열 혹은 일부 반복단위의 중합체일 수 있으며, 예컨대, 엘라스틴 유사 폴리펩타이드인 경우를 모두 포함하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [272] 상기 고분자 중합체의 예로, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜-프로필렌글리콜 공중합체, 폴리옥시에틸화폴리올, 폴리비닐알콜, 다당류, 폴리비닐에틸에테르, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고분자 중합체를 들 수 있고, 상기 다당류로는 텍스트란이 포함될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [273] 본 명세서에서 폴리에틸렌글리콜은 에틸렌글리콜 동중 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [274] 또한, 상기 생체적합성 물질은 폴리-라이신, 폴리-아스파르트산 및 폴리-글루탐산과 같은 폴리-아미노산을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [275] 또한, 지방산은 생체 내 알부민과 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [276] 상기 F의 한 예로서, 상기 F는 FcRn 결합 물질일 수 있고, 구체적으로, 상기 FcRn 결합물질은 면역글로불린 Fc 영역일 수 있으며, 보다 구체적으로 IgG Fc 영역, 더 구체적으로는 비당쇄화된 IgG4 Fc 영역일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [277] 본 발명의 구체적인 한 예로, 상기 F(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이합체이며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 구조를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [278]
- [279] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 지속형 결합체는 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2와 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [280] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄

가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역을 의미한다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 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. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다. 구체적으로, 상기 화학식 1에서 F에 해당한다.

- [281] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 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.
- [282] 상기 F(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)는, 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 라이신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.
- [283] 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.
- [284] 하나의 구체예로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역이 그 N-말단 질소 원자를 통하여 연결된 것일 수 있다.
- [285] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [286] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.
- [287] 본 발명의 용어, "힌지 서열"은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.
- [288] 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:
- [289] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 11).
- [290] 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).

- [291] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 21(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 30(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [292]
- [293] 본 발명의 지속형 결합체의 더욱 구체적인 형태에서, 상기 결합체 내 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단은 프롤린이고, 이 결합체는 상기 프롤린의 질소 원자를 통하여 Fc 영역이 링커에 연결된 것이다.
- [294]
- [295] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열이 존재함으로써 면역글로불린 Fc 영역의 사슬 두 개가 동종이합체(homodimer)나 이종이합체(heterodimer)를 형성한 이합체 형태일 수 있다. 본 발명의 화학식 1의 결합체는 링커의 일 말단이 이합체의 면역글로불린 Fc 영역의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [296] 본 발명의 용어, "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. 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [297]
- [298] 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 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 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부

아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

- [299] 예컨대, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 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 이합체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [300] 또한, 본 발명의 지속형 결합체의 하나의 실시 형태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 이합체 형태(dimeric form)일 수 있으며, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 공유결합적으로 연결될 수 있으며, 이때 상기 면역글로불린 Fc와 X는 하나의 동일한 링커에 의해 서로 연결될 수 있다. 한편, 이합체 형태의 하나의 Fc 영역에 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.
- [301] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 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.
- [302] 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.
- [303] 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 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [304] 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.
- [305] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을

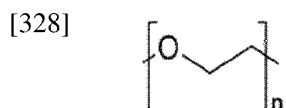
- 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [306] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질을 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 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 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [307] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 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 영역은 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 영역이라 할 것이다.
- [308] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.
- [309] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 기원이다.
- [310] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [311] 또한, 하나의 구체예로서, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc의 단편으로서, 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이합량체일 수 있으며, 이 때 동종이합체는 각 단량체에서 35번 및 95번의 시스테인 사이 및 141번 및 199번의 시스테인 사이에

- 이황화 결합, 즉 2개의 이황화 결합(intra-chain 형태)을 가지거나/가질 수 있다.
- [312] 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종이합체를 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 35의 아미노산 서열(442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이합체(여기서, 서열번호 31의 아미노산 서열(221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이합체를 형성하고, 상기 동종이합체의 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 제한되지 않는다.
- [313] 한편, 본 발명에서 면역글로불린 Fc 영역과 관련된 "조합(combination)"이란 이합체 또는 다합체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 Fc 영역으로부터 이합체 또는 다합체의 제조가 가능하다.
- [314] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 불변영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 영역에 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.
- [315] 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 영역이다.
- [316] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 인슐린 분비 펩타이드 또는 천연형 GLP-2에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [317]
- [318] 상기 화학식 1에서 링커 L은 펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 링커(예를 들어 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커)일 수 있다.
- [319] 상기 L이 펩타이드성 링커일 때, 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 예컨대 1개부터 1000개의 아미노산을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 F와 X를 연결하기 위하여 공지의 다양한 펩타이드

링커가 본 발명에 사용될 수 있으며, 그 예로 [GS] x 링커, [GGGS] x 링커 및 [GGGGS] x 링커 등을 포함하며, 여기서 x 는 1 이상의 자연수일 수 있다. 그러나, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.

- [320] 본 발명에서 "비펩타이드성 링커"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 비펩타이드성 링커는 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있으며, 상기 화학식 1에서 L에 해당된다.
- [321] 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질 분해 효소에 저항성 있는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명에서 상기 비펩타이드성 링커는 비펩타이드성 중합체와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [322] 또한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 다당류(예, 덱스트란 등), 폴리비닐 에틸에테르, PLA(poly(lactic acid)) 및 PLGA(poly(lactic-glycolic acid))와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴, 히알루론산, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [323] 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 비펩타이드성 링커는 생체 내 단백질분해효소에 저항성 있는 중합체이면 제한 없이 사용될 수 있으나, 구체적으로 비펩타이드성 중합체의 분자량은 0 초과 약 100 kDa 범위, 약 1 내지 약 100 kDa 범위, 구체적으로 약 1 내지 50 kDa 범위, 약 1 내지 약 20 kDa 범위, 약 1 내지 약 10 kDa 범위, 또는 약 3.4kDa 내지 10 kDa이나, 이에 제한되지 않는다.
- [324] 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜일 수 있고, 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [325] 상기 비펩타이드성 링커의 반복 단위는 에틸렌글리콜 반복 단위일 수 있고, 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함하면서, 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 비펩타이드성 링커는 2개, 또는 3개 이상의 작용기를 포함할 수 있고, 각 작용기는 동일하거나, 서로 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [326] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 4로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[327] [화학식 4]



- [329] 여기서, $n=10$ 내지 2400, $n=10$ 내지 480, 또는 $n=50$ 내지 250이나, 이에 제한되지 않는다.
- [330] 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.
- [331] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2와 면역글로불린 Fc 영역(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통해 공유 결합으로 연결된 구조 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [332] 상기 폴리에틸렌글리콜은, 에틸렌 글리콜 동중 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [333] 하나의 구체예로 상기 에틸렌글리콜 반복 단위는 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 0 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.
- [334]
- [335]
- [336] 본 발명에서 용어, "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.
- [337] 또한, 면역글로불린 Fc 영역과 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [338]

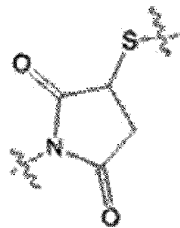
- [339] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 비펩타이드성 링커의 양 말단은 면역글로불린 Fc 영역의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 GLP-2의 티올기, 아미노기, 아지드기, 하이드록실기에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [340] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc와 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2에 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 면역글로불린 Fc 영역의 시스테인의 티올기; N-말단, 라이신, 아르지닌, 글루타민 및/또는 히스티딘에 위치한 아미노기; 및/또는 C-말단에 위치한 하이드록실기와 결합되고, GLP-2의 시스테인의 티올기; 라이신, 아르지닌, 글루타민 및/또는 히스티딘의 아미노기; 아지도라이신의 아지드기; 및/또는 하이드록실기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [341] 보다 구체적으로, 상기 비펩타이드성 중합체의 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [342] 상기에서, 알데히드 그룹으로 프로피온 알데히드 그룹 또는 부틸 알데히드 그룹을 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [343] 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.
- [344] 상기 비펩타이드성 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 생체적합성 물질(예를 들어, 면역글로불린 Fc)와 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2에 연결되어, 비펩타이드성 중합체 연결부로 전환될 수 있다.
- [345] 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 라이신 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.
- [346] 본 발명의 비펩타이드성 링커의 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 상기 비펩타이드성 링커는 말단에 알데히드 그룹 반응기를 갖는 것일 수 있고, 또한 상기 비펩타이드성 링커는 말단에 각각 알데히드 그룹 및 말레이미드 반응기를 가질 수 있거나, 말단에 각각 알데히드 그룹 및 석시니미드 반응기를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [347] 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.
- [348] 프로피온쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을

비펩타이드성 링커로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수가 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 본 발명의 결합체를 제조할 수 있다.

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

[350] 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드기는 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2의 -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.

[351] 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 또는 GLP-2의 시스테인에 위치한 황 원자에 연결된 구조를 형성할 수 있다. 상술한 티오에테르 결합은



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

[353] 또한, 상기 결합체에서, 비펩타이드성 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[354] 또한, 상기 결합체에서, 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2는 반응기를 갖는 비펩타이드성 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

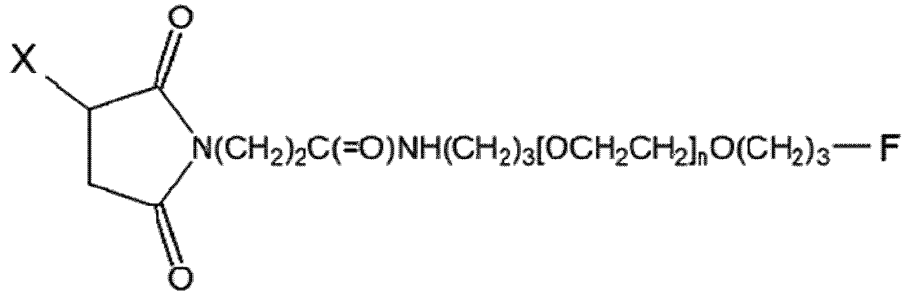
[355] 본 발명에서 "C-말단"은, 펩타이드의 카르복시 말단을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 비펩타이드성 중합체와 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[356]

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

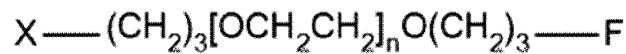
[358] [화학식 2]

[359]



[360] [화학식 3]

[361]



[362]

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

[364] F는 면역글로불린 Fc 절편이며;

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

[366]

[367] 하나의 구체예로, 상기 화학식 2의 지속형 결합체는, 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2의 X와 면역글로불린 Fc 영역의 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, 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2의 X와 면역글로불린 Fc 영역의 F가 에틸렌글리콜 반복부를 개재하여 공유결합으로 연결된 구조로서, 각각 X는 화학식 3의 옥시프로필렌기에, F는 화학식 3의 다른 옥시프로필렌기에 연결된 형태일 수 있다.

[368] 상기 화학식 2 또는 3에서, 상기 n의 값은 상기 펩타이드 결합체 내 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 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.

[369] 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.

[370] 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.

- [371]
- [372] 한편, 본 발명에 따른 인슐린 분비 펩타이드, GLP-2, 또는 이들의 지속형 결합체는 그 자체, 이들의 염 (예컨대, 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이들의 용매화물의 형태를 모두 포함한다.
- [373] 또한, 인슐린 분비 펩타이드, GLP-2, 또는 이들의 지속형 결합체는 약학적으로 허용되는 염의 형태일 수 있다.
- [374] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [375] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 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.
- [376] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 펩타이드, 화합물 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [377]
- [378] 본 발명의 천연형 인슐린 분비 펩타이드와 변형된 인슐린 분비 펩타이드, GLP-2는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 재조합 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있다.
- [379]
- [380] 또 하나의 구체예로서, 본 발명의 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트는
- [381] (i) 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하거나,
- [382] (ii) 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 인슐린 분비 펩타이드 지속형 결합체; 및 GLP-2를 포함하거나,
- [383] (iii) 인슐린 분비 펩타이드; 및 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, GLP-2 지속형 결합체를 포함하거나,
- [384] (iv) 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 인슐린 분비 펩타이드 지속형 결합체; 및 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, GLP-2 지속형 결합체를 포함할 수 있다.
- [385]
- [386] 본 발명의 조합물, 약학적 조성물 또는 약학적 키트는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [387] 본 발명에서 용어 "예방"은 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하는 조합물 또는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 단장증후군의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하는 조합물 또는 조성물의 투여로 목적하는 질환, 예컨대 단장증후군의

증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다. 또한, "개선"은 본 발명의 조합물 또는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

- [388] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [389] 상기 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2는 병용으로 이용되어 단장증후군의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [390]
- [391] 본 발명에서, "단장증후군(short bowel syndrome, SBS)"는 선천적으로 소장 길이가 짧거나 또는 수술 등으로 인해 후천적으로 소장의 일정 비율 이상(예: 50% 이상)이 소실(소장의 흡수면적 감소)되어 발생하는 소화흡수불량증으로서, 영양 흡수 부족, 영양 흡수 장애, 복통, 설사, 지방변, 유당불내증, 탈수, 체중 감소, 무기력, 또는 피로 등의 증상이 나타날 수 있다.
- [392] 본 발명에 따른 조합물 또는 조성물은 개체에 투여 시 체중 증가, 소장 길이 증가, 위장관 운동성 감소, 및 영양분 흡수 증가 중 하나 이상을 야기하여 단장증후군을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [393]
- [394] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.
- [395] 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.
- [396] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 부형제는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [397] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 부형제와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키,

캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

- [398] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [399] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [400] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [401] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.
- [402] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 상기 펩타이드 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [403] 상기 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2를 약학적 유효량으로 포함하는 것은, 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2로 인한 목적하는 약리 활성을 얻을 수 있는 정도를 의미하고, 또한 투여되는 개체에서 독성 또는 부작용이 일어나지 않거나 미미한 수준으로서 약학적으로 허용되는 수준을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이와 같은 약학적 유효량은 투여 횟수, 환자, 제형 등을 종합적으로 고려하여 결정될 수 있다.
- [404]

- [405] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 성분 (유효성분)을 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.
- [406]
- [407] 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 펩타이드 또는 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그러나 상기 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 당분야의 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.
- [408] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하여, 본 발명의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [409]
- [410] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 GLP-2와 병용하는 것을 특징으로 하는 상기 인슐린 분비 펩타이드를 포함하는, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [411] 상기 인슐린 분비 펩타이드, GLP-2, 예방, 치료, 개선, 병용, 단장증후군 및 약학적 조성물에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [412]
- [413] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 단장증후군의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물로서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 GLP-2와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 식품 조성물을 제공한다.
- [414] 상기 인슐린 분비 펩타이드, GLP-2, 예방, 개선, 병용, 및 단장증후군에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [415] 상기 식품 조성물은 건강기능식품으로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물을 식품 보조첨가제로 사용할 경우, 인슐린 분비 펩타이드, GLP-2, 이를 포함하는 지속형 결합체, 또는 이들의 조합을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

- [416] 본 발명에서의 용어 "건강기능식품"이란, 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.
- [417]
- [418] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다.
- [419] 또 하나의 구체예로, 본 발명의 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트를 이를 필요로 하는 개체에 투여 및/또는 사용하는 단계를 포함하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 방법일 수 있다.
- [420] 또 하나의 구체예로, 약학적 유효량의 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 조성물, 및 약학적 유효량의 GLP-2를 함유하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 병용 투여 및/또는 병용 사용하는 단계를 포함하는 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 방법이다.
- [421] 상기 인슐린 분비 펩타이드, GLP-2, 예방, 치료, 개선, 단장증후군, 병용, 조합물, 약학적 조성물 및 약학적 키트에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [422]
- [423] 본 발명에서 상기 개체는 단장증후군이 의심되는 개체로서, 상기 단장증후군 의심 개체는 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다. 또한, 본 발명의 조성물을 단장증후군 질환 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 단장증후군에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [424] 본 발명의 방법은 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 포함하는 조합물 또는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 방법은 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2를 하나의 제제로서 투여하거나, 또는 개별 제제를 동시, 개별, 순차 또는 역순으로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [425] 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게

적용하는 것이 바람직하다.

[426]

[427] 본 발명을 구현하는 또 하나의 양태는, 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트의 단장증후군의 예방, 개선 또는 치료 용도, 및/또는 단장증후군의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 용도이다.

[428]

[429] 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.

[430]

[431] 실시예 1: GLP-1 유도체 지속형 결합체의 제조

[432]

[433] 1-1. CA-Exendin-4-PEG 결합체 제조

[434] CA-Exendin4(N-[2-(1H-Imidazol-5-yl)acetyl]-Exendin4, 한미정밀화학, 한국) 펩타이드 내의 27번째 라이신 잔기의 아민기와, 양쪽 말단에 알데하이드(Aldehyde, ALD) 기를 가지는 폴리에틸렌글라이콜(3.4 kDa, ALD(2) PEG, 한미정밀화학, 한국)간의 공유결합을 통하여, 폐길화(PEGylation)된 펩타이드 결합체(모노 폐길화된(mono-PEGylated) CA-Exendin-4)를 제조하였다. 구체적으로, CA-Exendin-4 : ALD(2) PEG의 몰비를 1:5 ~ 1:15로, CA-Exendin-4 농도를 6 ~ 12 mg/mL로, 4 ~ 10 °C 내지 상온에서, 약 4 ~ 12 시간 반응시켰다. 이때 반응은 0.1 M HEPES pH 7.0 내지 8.5, 약 45 % 이소프로판올에서 이루어졌으며, 2 ~ 50 mM 농도의 소듐 시아노보로하이드라이드[sodium cyanoborohydride(NaCNBH₃)]를 첨가하여 반응시켰다. 반응액을 소듐 시트레이트(pH 2.0 ~ 3.5), 약 45 % 에탄올이 포함된 버퍼와 포타슘클로라이드 농도 구배를 이용한 Source 15S(Cytiva, 미국) 컬럼을 사용하여 정제하였다.

[435]

[436] 1-2. CA-Exendin-4-PEG-Fc 결합체 제조

[437] CA-Exendin-4-PEG-Fc 결합체를 제조하기 위하여, 상기 실시예 1-1을 통해 얻은 모노 폐길화된 CA-Exendin-4에 면역글로불린 Fc 단편을 첨가하여 전체 단백질 농도를 10 ~ 50 mg/mL로 만든 후 4 ~ 10 °C 내지 상온에서 약 12 ~ 17 시간 반응시켰다. 이때 반응액은 0.1 M 포타슘 포스페이트 pH 5.5 내지 8.5이며, 환원제인 2 ~ 50 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다. 반응이 종결된 후 반응액 내의 CA-Exendin-4-PEG-Fc 결합체를 소수성 결합 및 음이온 교환 컬럼의 2종류를 사용하여 정제하였다. 소수성 결합 컬럼인 Source 15Phenyl(Cytiva, 미국) 경우, Tris-HCl(pH 7.5) 완충액 및 NaCl 농도 구배를 이용하여 반응하지 않은 면역글로불린 Fc 단편을 분리 및 정제하였고, 음이온 교환 컬럼인 Source 15Q(Cytiva, 미국) 경우, Tris-HCl(pH 7.5) 완충액 및 NaCl 농도 구배를 이용하여 과반응된 불순물을 제거하여 CA-Exendin-4-PEG-Fc 결합체를

분리 및 정제하였다.

[438]

[439] 실시예 2: GLP-2 유도체 지속형 결합체의 제조

[440]

[441] 2-1. CA GLP-2 RK-PEG 결합체 제조

[442] 표 1의 서열번호 4의 GLP-2 유도체 CA GLP-2 RK를 개질 폴리에틸렌글리콜인 ALD(2) PEG(양 말단의 수소가 각각 프로피온알데히드기(3-옥소프로필기)로 치환되고, 에틸렌글리콜 반복단위 부위(moiety)의 화학식량이 3.4 kDa인 개질 폴리에틸렌글리콜, 일본 NOF사)로 폐길화시키기 위하여, GLP-2 유도체와 ALD(2) PEG의 몰 비를 1:5 ~ 1:20, GLP-2 유도체 농도를 5 ~ 10 mg/ml로 하여 2 ~ 8 °C에서 4 ~ 16 시간 반응시켰다. 이 때 반응은 20 mM 헤페스(HEPES) pH 7.5와 에탄올에서 이루어졌으며 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 모노폐길화된 GLP-2 유도체를 정제하였다.

[443]

[444] 2-2. CA GLP-2 RK-PEG-Fc 결합체 제조

[445] 다음으로, 상기 정제된 모노폐길화된 GLP-2 유도체와 면역글로불린 Fc 단편의 몰 비가 1:2 ~ 1:6가 되도록 하고, 전체 단백질 농도를 30 ~ 35 mg/mL로 하여 2 ~ 8 °C에서 12 ~ 20 시간 반응시켰다. 이때 반응액은 100 mM 인산칼륨 완충액(pH 6.0)과 아이소프로판올에 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[446] 반응이 종결된 후 반응액은 비스-트리스(bis-Tris) pH 6.5 버퍼와 염화나트륨 농도 구배를 이용하여 Source 15Q(GE, 미국) 컬럼에 적용하고, 황산 암모늄과 구연산 나트륨 pH 5.0 ~ 5.2의 농도 구배를 이용하여 Source 15 ISO(GE, 미국)에 적용하여, 면역글로불린 Fc 단편에 GLP-2 유도체가 폴리에틸렌글리콜 링커에 의해 공유결합으로 연결된 결합체인 GLP-2 유도체의 지속형 결합체를 정제하였다.

[447]

[448] 실시예 3: GLP-1 유도체 지속형 결합체와 GLP-2 유도체 지속형 결합체의 병용투여에 의한 마우스 체중 및 소장 길이 증가 확인

[449]

[450] GLP-1 유도체 지속형 결합체와 GLP-2 유도체 지속형 결합체의 병용투여에 따른 생체 내(*in vivo*) 체중 및 소장(Small intestine) 길이의 개선 효력을 측정하기 위하여 마우스를 이용하였다. 구체적으로, 7주령의 수컷 마우스(C57BL/6)를 군당 5마리씩, 하기와 같이 나누었다:

[451] - G1: 정상 대조군(약물을 투여하지 않은 군, Vehicle),

[452] - G2: GLP-1 유도체 지속형 결합체(0.039 mg/kg/Q2D)를 투여한 군(GLP-1

- 유도체 지속형 결합체 0.039 mg/kg/Q2D, 2주),
- [453] - G3: GLP-2 유도체 지속형 결합체(0.889 mg/kg/Q2D)를 투여한 군(GLP-2 유도체 지속형 결합체 0.889 mg/kg/Q2D, 2주),
- [454] - G4: GLP-1 유도체 지속형 결합체(0.039 mg/kg/Q2D)와 GLP-2 유도체 지속형 결합체(0.889 mg/kg/Q2D)를 투여한 군([GLP-1 유도체 지속형 결합체 0.039 mg/kg/Q2D + GLP-2 유도체 지속형 결합체 0.889 mg/kg/Q2D], 2주)
- [455] 본 명세서에서 GLP-1 유도체 지속형 결합체 또는 GLP-2 유도체 지속형 결합체의 투여량으로 나타낸 수치는 사용된 GLP-1 유도체 지속형 결합체 또는 GLP-2 유도체 지속형 결합체의 전체 질량에서 폴리에틸렌글리콜 링커 부위의 질량을 제외한 수치, 즉 폴리펩타이드 부위들만의 질량을 합산한 값을 기준으로 표시한 수치이다.
- [456] 2주간 반복 투여(D0~D14: 약물이 투여된 첫 번째 날을 0일차로 명명함)를 진행하며 마우스의 체중을 관찰하였다. 이후 D14에서 부검을 통해 소장의 길이를 측정하였다.
- [457]
- [458] 그 결과 GLP-1 유도체 지속형 결합체 단독 투여군에 비해 GLP-1 유도체 지속형 결합체와 GLP-2 유도체 지속형 결합체 병용 투여군에서, GLP-1에 의한 체중 감소가 관찰되지 않았으며(도 1), GLP-1 유도체 지속형 결합체 단독 투여군 혹은 GLP-2 유도체 지속형 결합체 단독 투여군에 비해 GLP-1 유도체 지속형 결합체와 GLP-2 유도체 지속형 결합체 병용 투여군에서 유의적으로 소장의 길이가 증가되는 것을 확인하였다(도 2).
- [459]
- [460] 실시예 4: GLP-1 유도체 지속형 결합체와 GLP-2 유도체 지속형 결합체의 병용투여에 의한 위장관 운동성 감소
- [461]
- [462] GLP-1 유도체 지속형 결합체와 GLP-2 유도체 지속형 결합체 병용투여에 따른 생체 내(*in vivo*) 위장관 운동성 감소 효과를 측정하기 위하여 마우스를 이용하였다. 구체적으로, 7주령의 수컷 마우스(C57BL/6)를 군당 6마리씩, 하기와 같이 나누었다:
- [463] - G1: 정상 대조군(약물을 투여하지 않은 군, Vehicle),
- [464] - G2: GLP-1 유도체 지속형 결합체(0.136 mg/kg)를 투여한 군(GLP-1 유도체 지속형 결합체 0.136 mg/kg),
- [465] - G3: GLP-2 유도체 지속형 결합체(3.111 mg/kg)를 투여한 군(GLP-2 유도체 지속형 결합체 3.111 mg/kg),
- [466] - G4: GLP-1 유도체 지속형 결합체(0.136 mg/kg)와 GLP-2 유도체 지속형 결합체(3.111 mg/kg)를 투여한 군(GLP-1 유도체 지속형 결합체 0.136 mg/kg + GLP-2 유도체 지속형 결합체 3.111 mg/kg).
- [467] 그리고 절식과 함께 약물을 단 회 투여하였다. 24시간 후 5% 차콜 밀(Charcoal

meal) (w/v in 10% Gum Arabic, 마우스 당 0.3 mL)을 경구 투여하였다. 20분 후 부검을 통해 소장을 취한 후 Charcoal meal의 이동 거리와 전체 소장 길이를 측정하여 소장에서의 charcoal meal의 이동 정도를 아래의 식을 이용하여 측정하였다.

[468]

[469] 소장에서 Charcoal meal의 이동 정도(Small intestine transit) (%)

[470] = (Charcoal meal 이동거리/소장전체길이) x 100

[471]

[472] 이와 같은 결과는 본 발명의 GLP-1 유도체 지속형 결합체와 GLP-2 유도체 지속형 결합체의 병용 투여가, 단독 투여군에 비해 GLP-2에 의한 소장의 길이 증가뿐만 아니라 GLP-1에 의해 체중 감소를 일으키지 않으면서 소장의 길이를 빠르게 증가시키고, 위장관 운동성 감소(도 3)를 통해 환자의 영양분 흡수를 증가시켜 단장 증후군의 치료에 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

[473]

[474] 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 실시예들은 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.

청구범위

- [청구항 1] 약학적 유효량의 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 단장증후군(short bowel syndrome)의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 글루카곤 유사 펩타이드-2(Glucagon-like peptide-2, GLP-2)와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 2] 약학적 유효량의 GLP-2를 함유하는 단장증후군의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 인슐린 분비 펩타이드와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 글루카곤 유사 펩타이드-1(Glucagon-like peptide-1, GLP-1), 엑센딘-3, 엑센딘-4, 이들의 작용제, 유도체, 단편, 변이체, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 인슐린 분비 펩타이드의 N-말단 히스티딘 잔기가 이미다조아세틸데스히스티딘, 데스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일데스히스티딘, N-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일데스히스티딘으로 치환된 인슐린 분비 펩타이드 유도체인, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩타이드는 천연형 엑센딘-4, 엑센딘-4의 N-말단 첫 번째 아미노산인 히스티딘 잔기의 알파 탄소 및 알파 탄소에 결합된 N-말단 아미노기가 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 제거된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 하이드록실기로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 2개의 메틸기로 수식된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 N-말단 아미노기가 카복실기로 치환된 엑센딘-4 유도체, 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(라이신)이 세린으로 치환된 엑센딘-4 유도체, 또는 엑센딘-4의 열두 번째 아미노산(라이신)이 아르지닌으로 치환된 엑센딘-4 유도체인 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 GLP-2는 천연형 GLP-2 또는 GLP-2 유도체인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 GLP-2 유도체는 천연형 GLP-2 서열에서 적어도 하나의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 GLP-2 유도체인 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 1에서 1번, 2번, 30번 및 33번의 아미노산 중 적어도 하나의 아미노산에 변형이 일어난 것인 약학적 조성물.

- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 GLP-2 유도체는 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 약학적 조성물:
- [일반식 1]
- $$X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$$
- (서열번호 9)
- 여기서,
- X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;
- X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;
- X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;
- X_{34} 는 부존재하거나, 라이신, 아르지닌, 글루타민, 히스티딘, 6-아지도라이신 또는 시스테인이고;
- 다만, 일반식 1의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 제외한다.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 GLP-2 유도체는
- (1) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
 - (2) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 라이신이거나,
 - (3) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 라이신이거나,
 - (4) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 6-아지도라이신이거나,
 - (5) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 글라이신이고, X_{30} 이 아르지닌이고, X_{34} 가 시스테인이거나,
 - (6) X_1 이 이미다조아세틸테스히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인이거나, 또는
 - (7) X_1 이 히스티딘이고, X_2 가 Aib이고, X_{30} 이 라이신이고, X_{34} 가 시스테인인 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제6항에 있어서, 상기 GLP-2 유도체는 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 약학적 조성물:
- [일반식 2]
- $$X_1X_2DGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTX_{30}ITDX_{34}$$
- (서열번호 10)
- 여기서,
- X_1 은 히스티딘, 이미다조아세틸테스히스티딘, 테스아미노히스티딘, β -히드록시이미다조프로피온일테스히스티딘, *N*-디메틸히스티딘, 또는 β -카복시이미다조프로피온일테스히스티딘이고;
- X_2 는 알라닌, 글라이신, 또는 Aib(2-aminoisobutyric acid)이며;

X_{30} 은 라이신 또는 아르지닌이고;

X_{34} 는 하나 이상의 임의의 아미노산 또는 변형이 일어난 하나 이상의 임의의 아미노산이고;

다만, 일반식 2의 아미노산 서열 중에서 서열번호 1과 동일한 서열은 제외한다.

- [청구항 12] 제6항에 있어서, 상기 GLP-2 유도체는 서열번호 2 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 펩타이드인 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 개체에 투여 시 체중 증가, 소장 길이 증가, 위장관 운동성 감소, 및 영양분 흡수 증가 중 하나 이상을 야기하는 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2는 이의 C-말단이 변형되지 않았거나 아미드화된 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제1항 또는 제2항에 있어서,
 (i) 상기 인슐린 분비 펩타이드는 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이거나,
 (ii) 상기 GLP-2는 이의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태이거나,
 (iii) 상기 인슐린 분비 펩타이드 및 GLP-2 각각은 이들의 생체 내 반감기를 증가시킬 수 있는 생체적합성 물질이 결합된, 지속형 결합체의 형태인 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 약학적 조성물:
 [화학식 1]
 $X - La - F$
 여기서,
 X 는 인슐린 분비 펩타이드 또는 GLP-2이고;
 L 은, 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며;
 a 는, 0 또는 자연수이며, 다만 a 가 2 이상일 때, 각각의 L 은 서로 독립적이고;
 F 는, 면역글로불린 Fc 영역이며;
 상기 "-"는 공유결합임.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 IgG4 Fc 영역인 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 F 는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이합체이며, L 의 한 말단이 상기 두 개의 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제16항에 있어서, 상기 L 은 폴리에틸렌글리콜인 약학적 조성물.
- [청구항 20] 제16항에 있어서, 상기 L 내의 에틸렌글리콜 반복 단위 부위의

- 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 약학적 조성물.
- [청구항 21] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 약학적 조성물.
- [청구항 22] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인슐린 분비 펩타이드를 함유하는 조성물은 GLP-2를 함유하는 조성물과 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.