

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090571 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.07.30

(51) Int. Cl. C07K 14/605 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.09.28

(54) КОНЬЮГАТЫ ПРОИЗВОДНЫХ GLP-2 ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

(31) 10-2017-0126577

(72) Изобретатель:

(32) 2017.09.28

Чой Чжехёк, Ким Мин Юн, Чой Ин  
Юнг, Чун Сун Юб (KR)

(33) KR

(86) PCT/KR2018/011586

(74) Представитель:

(87) WO 2019/066586 2019.04.04

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(71) Заявитель:

ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД. (KR)

(57) Данное изобретение относится к производному глюкагон-подобного пептида-2 (GLP-2), его конъюгату и его применению. Кроме того, данное изобретение относится к способу получения производного глюкагон-подобного пептида-2 (GLP-2) и его конъюгата.



A1

202090571

202090571

A1

## **КОНЬЮГАТЫ ПРОИЗВОДНЫХ GLP-2 ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ**

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Данное изобретение относится к производному глюкагон-подобного пептида-2 (GLP-2), его конъюгату и их применению. Кроме того, данное изобретение относится к способу получения производного глюкагон-подобного пептида-2 (GLP-2) и его конъюгата.

### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Глюкагон-подобный пептид-2 (GLP-2) представляет собой пептидный гормон из 33 аминокислот, который образуется в эндокринных L-клетках кишечника при поступлении питательных веществ. GLP-2 стимулирует рост слизистой в тонкой и толстой кишке, а также подавляет ростовые свойства и подавляет апоптоз клеток кишечника и клеток крипт. Помимо этого, GLP-2 усиливает абсорбцию питательных веществ в тонкой кишке и снижает проницаемость кишечника. Кроме того, GLP-2 подавляет опорожнение желудка и секрецию желудочного сока, при этом увеличивая скорость кровотока в кишечнике и расслабляя гладкие мышцы кишечника. Поскольку GLP-2 способен регулировать поглощение и защиту энергии и активировать функцию кишечного барьера, он продемонстрировал высокий терапевтический потенциал в различных моделях заболеваний и повреждений кишечника *in vivo*.

Однако, разработка промышленных лекарственных средств на основе GLP-2 все еще сталкивается с трудностями. Пептиды, такие как GLP-2, могут легко денатурировать вследствие низкой стабильности, терять активность в результате деградации протеазами в организме и легко выводятся через почки благодаря своему относительно небольшому размеру. Таким образом, для поддержания оптимальных концентраций и титров пептидных лекарств в крови необходимо частое введение пептидных лекарств. Однако, большинство пептидных лекарств вводят посредством различных инъекций, а для поддержания концентрации пептидного лекарства в крови требуются частые инъекции, что сопряжено с тяжелыми болевыми ощущениями у пациентов. В этой связи предпринимались многочисленные попытки для решения указанных проблем, одной из которых была разработка способа увеличения мембранной проницаемости для пептидного лекарства, обеспечивающая доставку пептидного лекарства в организм через полость рта или носа посредством ингаляции. Однако, у этого способа имеются ограничения,

связанные с низкой эффективностью доставки пептидного лекарства по сравнению с его инъекцией, и сохранение достаточной биологической активности пептидного лекарства для терапевтического применения по-прежнему остается затруднительным.

В частности, GLP-2 имеет очень короткий период полувыведения *in vivo* (7 минут или меньше) вследствие его инактивации дипептидил-пептидазой-IV (DPP IV), которая расщепляет GLP-2 между аминокислотами в положении 2 (Ala) и в положении 3 (Asp) (Bolette H. *et al.*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 85(8): 2884-2888, 2000). Предпринимались попытки увеличить период полувыведения GLP-2 *in vivo* посредством аминокислотных замен.

## КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Техническая задача

Задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить производное GLP-2.

Другая задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую производное GLP-2, рекомбинантный экспрессионный вектор, включающий ее, и трансформант, включающий рекомбинантный экспрессионный вектор.

Еще одна задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить способ получения производного GLP-2.

Еще одна задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить конъюгат, где производное GLP-2 связано с веществом, способным увеличить период его полувыведения *in vivo*.

Еще одна задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить способ получения конъюгата GLP-2.

Еще одна задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить композицию GLP-2 пролонгированного действия, обладающую увеличенной продолжительностью действия и стабильностью *in vivo*, где композиция пролонгированного действия включает конъюгат GLP-2.

Еще одна задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, содержащую производное GLP-2 и/или конъюгат GLP-2.

Еще одна задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить способ предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, производного GLP-2, конъюгата GLP-2 или фармацевтической композиции, содержащей их в качестве активного ингредиента.

Еще одна задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить применение производного GLP-2 или конъюгата GLP-2 для изготовления лекарственного средства.

Еще одна задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить применение производного GLP-2 или конъюгата GLP-2 для предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии.

### Техническое решение

В одном аспекте данного изобретения предложен конъюгат глюкагон-подобного пептида-2 (GLP-2), где производное GLP-2 и Fc область иммуноглобулина ковалентно соединены через непептидный полимер по обоим концам непептидного полимера, и

где непептидный полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

В одном конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где производное GLP-2 содержит аминокислотную последовательность следующей общей формулы 1:

Общая Формула 1

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

где в вышеуказанной формуле

$X_1$  представляет собой гистидин, имидазоацетилдезгистидин, дезаминогистидин,  $\beta$ -гидроксиимидазопропионилдезгистидин, *N*-диметилгистидин или  $\beta$ -карбоксиимидазопропионилдезгистидин;

$X_2$  представляет собой аланин, глицин или 2-аминоизомасляную кислоту (Aib);

$X_{30}$  представляет собой лизин или аргинин, и

$X_{34}$  отсутствует или представляет собой лизин, аргинин, глутамин, гистидин, 6-азидо-лизин или цистеин; при условии, что любая последовательность, идентичная аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 в общей формуле 1, исключена.

В другом конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где в общей формуле 1 производного GLP-2 (1)  $X_2$  представляет собой глицин, (2)  $X_{30}$  представляет собой аргинин, или (3)  $X_2$  представляет собой глицин, а  $X_{30}$  представляет собой аргинин.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где

(1)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин, и  $X_{34}$  представляет собой цистеин;

(2)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой лизин;

(3)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой аргинин и  $X_{34}$  представляет собой лизин;

(4)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой 6-азидо-лизин;

(5)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой аргинин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин;

(6)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой Aib,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин; или

(7)  $X_1$  представляет собой гистидин,  $X_2$  представляет собой Aib,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где по меньшей мере один остаток производного GLP-2 представляет собой цистеин, лизин, аргинин, глутамин, гистидин или 6-азидо-лизин.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где производное GLP-2 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-8.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где один конец непептидного полимера конъюгирован с Fc областью иммуноглобулина, а другой конец конъюгирован с гидроксильной группой, тиоловой группой, аминогруппой или азидной группой производного GLP-2.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где Fc область иммуноглобулина не гликозилирована.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где Fc область иммуноглобулина дополнительно содержит шарнирный участок.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, где Fc область иммуноглобулина представляет собой Fc область IgG4.

В другом аспекте данного изобретения предложено производное GLP-2, содержащее аминокислотную последовательность следующей общей формулы 1:

Общая Формула 1

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

где в вышеуказанной формуле

$X_1$  представляет собой гистидин, имидазоацетилдезгистидин, дезаминогистидин,  $\beta$ -гидроксиимидазопропионилдезгистидин, *N*-диметилгистидин или  $\beta$ -карбоксиимидазопропионилдезгистидин;

$X_2$  представляет собой аланин, глицин или 2-аминоизомасляную кислоту (Aib);

$X_{30}$  представляет собой лизин или аргинин, и

$X_{34}$  отсутствует или представляет собой лизин, аргинин, глутамин, гистидин, 6-азидо-лизин или цистеин; при условии, что любая последовательность, идентичная аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 в общей формуле 1, исключена.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложено производное GLP-2, где в общей формуле (1)  $X_2$  представляет собой глицин, (2)  $X_{30}$  представляет собой аргинин, или (3)  $X_2$  представляет собой глицин, а  $X_{30}$  представляет собой аргинин.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложено производное GLP-2, где

(1)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин, и  $X_{34}$  представляет собой цистеин;

(2)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой лизин;

(3)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой аргинин и  $X_{34}$  представляет собой лизин;

(4)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой 6-азидо-лизин;

(5)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой аргинин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин;

(6)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой Aib,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин; или

(7)  $X_1$  представляет собой гистидин,  $X_2$  представляет собой Aib,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин.

В еще одном аспекте данного изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая производное GLP-2.

В еще одном аспекте данного изобретения предложен рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту.

В еще одном аспекте данного изобретения предложен трансформант, содержащий рекомбинантный экспрессионный вектор.

В еще одном аспекте данного изобретения предложен способ получения производного GLP-2, включающий:

- а) культивирование трансформанта, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую производное GLP-2, для экспрессии производного GLP-2, и
- б) выделение и очистку экспрессированного производного GLP-2.

В еще одном аспекте данного изобретения предложен способ получения конъюгата GLP-2, включающий:

(а) получение комплекса путем взаимодействия непептидного полимера, имеющего две или более концевых реакционноспособных группы, с одним из производного GLP-2 и Fc области иммуноглобулина, так чтобы в данном комплексе производное GLP-2 или Fc область иммуноглобулина были присоединены к одному концу непептидного полимера, а реакционноспособная группа была на другом конце; и

(б) получение конъюгата путем взаимодействия комплекса, полученного на стадии (а), с одним из Fc области иммуноглобулина и производного GLP-2, не присоединенных к комплексу, так чтобы производное GLP-2 и Fc область иммуноглобулина были соединены через непептидный полимер.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен способ получения, где непептидный полимер содержит одну или более чем одну реакционноспособную группу, выбранную из группы, состоящей из альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного.

В еще одном конкретном воплощении данного изобретения предложен способ получения, где сукцинимидное производное представляет собой сукцинимидилкарбоксиметил, сукцинимидилвалерат, сукцинимидилметилбутаноат, сукцинимидилметилпропионат, сукцинимидилбутаноат, сукцинимидилпропионат, N-гидроксисукцинимид или сукцинимидилкарбонат.

В еще одном аспекте изобретения предложена композиция GLP-2 пролонгированного действия, обладающая увеличенной продолжительностью действия и стабильностью *in vivo*, где композиция пролонгированного действия содержит конъюгат GLP-2.

В еще одном аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, содержащая конъюгат GLP-2 и/или производное GLP-2.

В следующем воплощении данного изобретения предложена фармацевтическая композиция, где заболевание кишечника представляет собой синдром короткого кишечника, синдром раздраженного кишечника, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, колонит, колит, панкреатит, илеит, мукозит или атрофию кишечника.

В следующем воплощении данного изобретения предложена фармацевтическая композиция, где гастропатия представляет собой желудочные колики, гастрит, язву желудка, дуоденит или язву двенадцатиперстной кишки.

В следующем аспекте данного изобретения предложен способ предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, конъюгата GLP-2, производного GLP-2 или фармацевтической композиции, содержащей их в качестве активных ингредиентов.

В следующем аспекте данного изобретения предложено применение производного GLP-2 или конъюгата GLP-2 для изготовления лекарственного средства.

В конкретном воплощении данного изобретения предложено применение производного GLP-2 или конъюгата GLP-2, где лекарственное средство применяют для предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии.

В еще одном аспекте данного изобретения предложено применение производного GLP-2 или конъюгата GLP-2 для предупреждения или лечения одного или более чем

одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии.

### **Полезные эффекты**

Поскольку производное GLP-2 и его конъюгат пролонгированного действия по данному изобретению обладают существенно более высокой активностью и более продолжительным действием *in vivo*, их можно с высокой эффективностью применять для предупреждения, облегчения и лечения заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На Фиг. 1 показаны результаты анализа чистоты конъюгатов производных GLP-2 пролонгированного действия посредством обращенно-фазовой хроматографии.

На Фиг. 2 приведен график, демонстрирующий изменение концентрации конъюгатов производных GLP-2 пролонгированного действия в крови.

На Фиг. 3 приведен график, демонстрирующий изменение концентрации тедуглутида и конъюгата производного GLP-2 пролонгированного действия в крови.

На Фиг. 4 приведен график, демонстрирующий эффекты тедуглутида и конъюгата производного GLP-2 пролонгированного действия *in vivo* (А: масса тонкой кишки, В: длина ворсинок тонкого кишечника).

### **Наилучший способ осуществления изобретения**

Далее приведено подробное описание данного изобретения. При этом, каждое из объяснений и воплощений, приведенных в данном документе, может быть применимо и для других объяснений и воплощений, соответственно. Таким образом, все комбинации различных элементов, описанных в данном документе, входят в объем данного изобретения. Более того, объем данного изобретения не ограничивается конкретным описанием, приведенным ниже.

Кроме того, специалист в данной области техники может на основании рутинных методик найти или подтвердить множество эквивалентов конкретных воплощений данного изобретения, описанных в данной заявке, и такие эквиваленты входят в объем данного изобретения.

По ходу описания данного изобретения используют не только стандартные однобуквенные и трехбуквенные коды для аминокислот естественного происхождения, но также и трехбуквенные коды, общепринятые для других аминокислот, такие как Aib ( $\alpha$ -аминоизомасляная кислота), AZK (6-азидолизин) и т.д. Кроме того, аминокислоты,

упомянутые в данном документе, обозначают следующими аббревиатурами согласно правилам номенклатуры IUPAC-IUB.

Аланин	Ala, A;	Аргинин	Arg, R;
Аспарагин	Asn, N;	Аспарагиновая кислота	Asp, D;
Цистеин	Cys, C;	Глутаминовая кислота	Glu, E;
Глутамин	Gln, Q;	Глицин	Gly, G;
Гистидин	His, H;	Изолейцин	Ile, I;
Лейцин	Leu, L;	Лизин	Lys, K;
Метионин	Met, M;	Фенилаланин	Phe, F;
Пролин	Pro, P;	Серин	Ser, S;
Треонин	Thr, T;	Триптофан	Trp, W;
Тирозин	Tyr, Y;	Валин	Val, V.

В одном аспекте данного изобретения предложено производное GLP-2.

В данном изобретении «производное GLP-2» включает пептид, имеющий одно или более чем одно отличие в аминокислотной последовательности по сравнению с нативным GLP-2; пептид, модифицированный путем модификации последовательности нативного GLP-2; и миметик нативного GLP-2, обладающий функцией предупреждения, лечения и/или облегчения заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, как у нативного GLP-2. Кроме того, производное GLP-2 также включает производное, имеющее превосходную активность *in vitro* и/или *in vivo* в отношении рецептора GLP-2.

Как используют здесь, термин «глюкагон-подобный пептид-2 (GLP-2)» относится к пептиду, обладающему функцией предупреждения, лечения и/или облегчения заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, и включает не только нативную форму GLP-2, но и его агонист, фрагменты, варианты, производные и т.п.

Как используют здесь, термин «агонист GLP-2» относится к веществу, которое может связываться с рецептором GLP-2 и индуцировать такую же или подобную физиологическую активность, как нативный GLP-2, независимо от его структурного сходства с GLP-2.

Как используют здесь, термин «фрагмент GLP-2» относится к пептиду, имеющему одну или более аминокислот, добавленных или удаленных на N-конце или C-конце GLP-2, где добавленная аминокислота может быть аминокислотой искусственного происхождения (например, D-аминокислотой).

Как используют здесь, термин «вариант GLP-2» относится к пептиду, имеющему одну или более чем одну аминокислоту, отличающуюся от нативного GLP-2. С этой целью можно вводить замену на аминокислоту искусственного происхождения, а также на аминокислоту естественного происхождения.

В данном изобретении модификация для получения агонистов, фрагментов, вариантов и производных нативного GLP-2 может включать все модификации с использованием аминокислот L-типа или D-типа и/или аминокислот искусственного происхождения; и/или модификацию нативной последовательности или пост-трансляционную модификацию (например, метилирование, ацилирование, убиквитинирование, внутримолекулярное ковалентное связывание и т.д.).

Такие агонисты, фрагменты, варианты и производные нативного GLP-2 могут обладать функцией предупреждения, лечения и облегчения заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии.

Агонисты, фрагменты, варианты и производные нативного GLP-2, которые могут найти применение в данном изобретении, могут быть получены путем комбинирования нескольких способов получения агонистов, фрагментов, вариантов и производных.

GLP-2, использованный в данном изобретении, может быть синтезирован способом твердофазного синтеза, а также может быть получен рекомбинантным способом.

В конкретном воплощении производное GLP-2 может представлять собой производное, полученное любым способом замены, добавления, делеции и модификации некоторых аминокислот нативного GLP-2 или их комбинации.

Аминокислотная последовательность нативного GLP-2 приведена ниже:

GLP-2 (1-33)

HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (SEQ ID NO: 1)

В частности, производное GLP-2 содержит замену 2-ой аминокислоты нативного GLP-2 аланина на глицин или Aib (2-аминоизомаляновую кислоту), замену 30-ой аминокислоты нативного GLP-2 лизина на аргинин, или их комбинацию, но не ограничивается перечисленным.

В частности, производное GLP-2 может демонстрировать гомологию последовательности по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% с аминокислотной последовательностью нативного GLP-2 и/или быть представленным в форме, в которой некоторые группы аминокислотных остатков GLP-2 изменены путем химической замены (например, *альфа*-метилирования, *альфа*-гидроксилирования),

делеции (например, дезаминирования) или модификации (например, N-метилования), однако гомология последовательностей и форма производных не ограничивается перечисленными.

В частности, производное GLP-2 может быть представлено в форме, в которую введены тиоловая группа, аминогруппа или азидная группа, но не ограничивается перечисленными. Поскольку производное GLP-2 обладает превосходной активностью *in vitro* и/или *in vivo* в отношении рецептора GLP-2, и поскольку конъюгирование происходит по введенной группе при получении конъюгата производного GLP-2 пролонгированного действия, их можно использовать для получения конъюгата GLP-2, сайт связывания которого избирательно контролируется.

В частности, гидроксильная группа, тиоловая группа, аминогруппа или азидная группа производного GLP-2 может быть конъюгирована с одним концом непептидного полимера, а вещество (например, Fc область иммуноглобулина), способное увеличивать период полувыведения *in vivo*, может быть конъюгировано с другим концом непептидного полимера. Тиоловая группа, аминогруппа или азидная группа могут быть введены путем добавления аминокислоты к GLP-2, без ограничения перечисленным. Тиоловая группа может быть введена путем добавления цистеина (C) к GLP-2, аминогруппа может быть введена путем добавления лизина (K), аргинина (R), глутамина (Q) или гистидина (H) к GLP-2, а азидная группа может быть введена путем добавления 6-азидо-лизина (AZK) к GLP-2, без ограничения перечисленным.

В частности, в производном GLP-2 по меньшей мере один из остатков может представлять собой цистеин, лизин, аргинин, глутамин, гистидин или 6-азидо-лизин, но не ограничиваться перечисленными.

В другом конкретном воплощении N-концевая аминогруппа в производном GLP-2 может быть замещена, удалена или модифицирована, без ограничения перечисленным. Для предупреждения связывания с N-концом, представляющим собой важный сайт для активности производного GLP-2 *in vivo*, при получении конъюгата пролонгированного действия производное GLP-2 по данному изобретению может быть получено методом удаления *альфа*-аминогруппы N-концевого гистидина, методом замены N-концевой аминогруппы на гидроксильную группу или карбоксильную группу, методом удаления  $\alpha$ -углеродного атома N-концевого гистидина и N-концевой аминогруппы, конъюгированной с  $\alpha$ -углеродным атомом, так чтобы оставалась только имидазо-ацетильная группа, и методом модификации N-концевой аминогруппы двумя метильными группами.

В частности, производное GLP-2 может представлять собой имидазоацетил-дезгистидил-GLP-2 (CA-GLP-2), полученный путем удаления  $\alpha$ -углеродного атома остатка гистидина, который является первой аминокислотой на N-конце GLP-2, и связанной с ним N-концевой аминогруппы; дез-амино-гистидил-GLP-2 (DA-GLP-2), полученный путем удаления N-концевой аминогруппы GLP-2;  $\beta$ -гидроксиимидазопропионилдезгистидил-GLP-2 (HY-GLP-2), полученный путем замещения N-концевой аминогруппы GLP-2 гидроксильной группой; N-диметил-гистидил-GLP-2 (DM-GLP-2), полученный путем модификации N-концевой аминогруппы GLP-2 двумя диметильными группами; или  $\beta$ -карбоксиимидазопропионил-дезгистидил-GLP-2 (CX-GLP-2), полученный путем замещения N-концевой аминогруппы GLP-2 карбоксильной группой, не ограничиваясь перечисленными.

В частности, производное GLP-2 по данному изобретению может содержать замену аланина, являющегося 2-ой аминокислотой нативного GLP-2, на глицин и введение тиоловой группы (например, цистеина) в C-конец GLP-2, и более конкретно, производное GLP-2 может содержать имидазоацетилдезгистидин, в котором удалены  $\alpha$ -углеродный атом остатка гистидина, являющегося первой аминокислотой на N-конце GLP-2, и связанная с  $\alpha$ -углеродным атомом N-концевая аминогруппа (например, оно может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2), не ограничиваясь перечисленными.

В частности, производное GLP-2 по данному изобретению может содержать замену аланина, являющегося 2-ой аминокислотой нативного GLP-2, на глицин и введение аминогруппы (например, лизина) в C-конец и, более конкретно, производное GLP-2 может содержать имидазоацетилдезгистидин, в котором удалены  $\alpha$ -углеродный атом остатка гистидина, являющегося первой аминокислотой на N-конце GLP-2, и связанная с  $\alpha$ -углеродным атомом N-концевая аминогруппа (например, оно может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3), не ограничиваясь перечисленными.

В частности, производное GLP-2 по данному изобретению может содержать замену аланина, являющегося 2-ой аминокислотой нативного GLP-2, на глицин, замену лизина, являющегося 30-ой аминокислотой нативного GLP-2, на аргинин и введение аминогруппы (например, лизина) в C-конец и, более конкретно, производное GLP-2 может содержать имидазоацетилдезгистидин, в котором удалены  $\alpha$ -углеродный атом остатка гистидина, являющегося первой аминокислотой на N-конце GLP-2, и связанная с  $\alpha$ -углеродным атомом N-концевая аминогруппа (например, оно может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4), не ограничиваясь перечисленными.

В частности, производное GLP-2 по данному изобретению может содержать замену аланина, являющегося 2-ой аминокислотой нативного GLP-2, на глицин и введение азидной группы (например, 6-азидо-лизина) в С-конец и, более конкретно, производное GLP-2 может содержать имидазоацетилдезгистидин, в котором удалены  $\alpha$ -углеродный атом остатка гистидина, являющегося первой аминокислотой на N-конце GLP-2, и связанная с  $\alpha$ -углеродным атомом N-концевая аминогруппа (например, оно может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5), не ограничиваясь перечисленными.

В частности, производное GLP-2 по данному изобретению может содержать замену аланина, являющегося 2-ой аминокислотой нативного GLP-2, на глицин, замену лизина, являющегося 30-ой аминокислотой нативного GLP-2, на аргинин и введение тиоловой группы (например, цистеина) в С-конец, и более конкретно, производное GLP-2 может содержать имидазоацетилдезгистидин, в котором удалены  $\alpha$ -углеродный атом остатка гистидина, являющегося первой аминокислотой на N-конце GLP-2, и связанная с  $\alpha$ -углеродным атомом N-концевая аминогруппа (например, оно может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6), не ограничиваясь перечисленными.

В частности, производное GLP-2 по данному изобретению может содержать замену аланина, являющегося 2-ой аминокислотой нативного GLP-2, на глицин и введение тиоловой группы (например, цистеина) в С-конец (например, оно может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8) и, более конкретно, производное GLP-2 может содержать имидазоацетилдезгистидин, в котором удалены  $\alpha$ -углеродный атом остатка гистидина, являющегося первой аминокислотой на N-конце GLP-2, и связанная с  $\alpha$ -углеродным атомом N-концевая аминогруппа (например, оно может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7), не ограничиваясь перечисленными.

Производные GLP-2 с SEQ ID NO: 2-8 приведены в Таблице 1 ниже.

Таблица 1

<b>Название</b>	<b>Последовательность</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
CA GLP-2 KC	<i>ca</i> HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	2
CA GLP-2 KK	<i>ca</i> HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDK	3
CA GLP-2 RK	<i>ca</i> HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTRITDK	4
CA GLP-2 K <sub>AZ</sub> K	<i>ca</i> HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD <sub>AZ</sub> K	5
CA GLP-2 RC	<i>ca</i> HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTRITDC	6

CA GLP-2 Aib	<i>ca</i> HAibDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	7
GLP-2 Aib	HAibDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDC	8

В Таблице 1 выше *ca*H означает замещение имидазоацетилдезгистидином вместо гистидина; Aib означает 2-аминоизомасляную кислоту, а *AZ*K означает 6-азидо-L-лизин.

Производные GLP-2 по данному изобретению могут представлять собой пептиды, содержащие конкретные последовательности, приведенные выше, или могут представлять собой пептиды, состоящие (по существу) из последовательностей, приведенных выше, однако производные GLP-2 не ограничиваются перечисленными.

При этом, хотя в данном изобретении описан пептид или производное GLP-2 «состоящий(ее) из конкретной SEQ ID NO», такое выражение не исключает мутацию в пептиде или производном GLP-2, которая может возникнуть в результате добавления некодирующей последовательности в 5'-направлении или в 3'-направлении относительно аминокислотной последовательности с соответствующим SEQ ID NO, или ее природной мутации или ее молчащей мутации, при условии, что пептид или производное GLP-2, имеющие такую мутацию, обладают такой же или соответствующей активностью, как пептид или производное GLP-2, состоящие из аминокислотной последовательности с соответствующим SEQ ID NO. Даже при наличии добавленной последовательности или мутации они входят в объем данного изобретения.

В еще одном конкретном воплощении производное GLP-2 может включать аминокислотную последовательность следующей общей формулы 1, но не ограничиваться таковой:

Общая Формула 1

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

где в вышеуказанной формуле

$X_1$  представляет собой гистидин, имидазоацетилдезгистидин, дезаминогистидин,  $\beta$ -гидроксиимидазопропионилдезгистидин, *N*-диметилгистидин или  $\beta$ -карбоксиимидазопропионилдезгистидин;

$X_2$  представляет собой аланин, глицин или 2-аминоизомасляную кислоту (Aib);

$X_{30}$  представляет собой лизин или аргинин, и

$X_{34}$  отсутствует или представляет собой лизин, аргинин, глутамин, гистидин, 6-азидо-лизин или цистеин; при условии, что любая последовательность, идентичная аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 в общей формуле 1, исключена.

В частности, в общей формуле 1 (1)  $X_2$  может представлять собой глицин, (2)  $X_{30}$  может представлять собой аргинин, или (3)  $X_2$  может представлять собой глицин и  $X_{30}$  может представлять собой аргинин, но не ограничиваться указанным.

В частности, в общей формуле 1

(1)  $X_1$  может представлять собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  может представлять собой глицин,  $X_{30}$  может представлять собой лизин и  $X_{34}$  может представлять собой цистеин;

(2)  $X_1$  может представлять собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  может представлять собой глицин,  $X_{30}$  может представлять собой лизин и  $X_{34}$  может представлять собой лизин;

(3)  $X_1$  может представлять собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  может представлять собой глицин,  $X_{30}$  может представлять собой аргинин и  $X_{34}$  может представлять собой лизин;

(4)  $X_1$  может представлять собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  может представлять собой глицин,  $X_{30}$  может представлять собой лизин и  $X_{34}$  может представлять собой б-азидо-лизин;

(5)  $X_1$  может представлять собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  может представлять собой глицин,  $X_{30}$  может представлять собой аргинин и  $X_{34}$  может представлять собой цистеин;

(6)  $X_1$  может представлять собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  может представлять собой Aib,  $X_{30}$  может представлять собой лизин и  $X_{34}$  может представлять собой цистеин; или

(7)  $X_1$  может представлять собой гистидин,  $X_2$  может представлять собой Aib,  $X_{30}$  может представлять собой лизин и  $X_{34}$  может представлять собой цистеин; но не ограничиваться перечисленными.

При этом производное GLP-2 может включать в себя все находящиеся собственно в форме пептида, его соли (например, фармацевтически приемлемой соли пептида) или его сольвата.

Кроме того, пептид или производное GLP-2 может быть представлен в любой фармацевтически приемлемой форме.

Тип соли не ограничивается каким-либо конкретным. Однако, соль предпочтительно представляет собой безопасную и эффективную для субъекта, например, млекопитающего, но не ограничивается конкретными солями.

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществу, которое можно эффективно применять по целевому назначению в рамках медико-фармацевтического решения, не вызывая избыточной токсичности, раздражения, аллергических реакций и т.д.

Как используют здесь, термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, полученной из фармацевтически приемлемых неорганических кислот, органических кислот или оснований. Примеры подходящих солей могут включать соляную кислоту, бромоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, перхлорную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, фосфорную кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, янтарную кислоту, толуол-*пара*-сульфоновую кислоту, винную кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, метансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту и т.д. Примеры солей, полученных из подходящих оснований, могут включать соли щелочных металлов, таких как натрий, калий и т.д., щелочно-земельных металлов, таких как магний, соли аммония и т.д.

Кроме того, как используют здесь, термин «сольват» относится к комплексу, образованному между пептидом по данному изобретению или его солью и молекулой растворителя.

Производное GLP-2 по данному изобретению может быть синтезировано способом твердофазного синтеза, может также быть получено рекомбинантным способом, и может быть получено в промышленном масштабе.

В другом аспекте данного изобретения предложены выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая производное GLP-2, рекомбинантный экспрессионный вектор, включающий нуклеиновую кислоту, и трансформант, включающий рекомбинантный экспрессионный вектор.

Производное GLP-2 является таким, как описано выше.

Как используют здесь, термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеотиду (ДНК) или рибонуклеотиду (РНК), существующему в одно- или двухцепочечной форме, включая геномную ДНК, кДНК и РНК, транскрибированную с них, а нуклеотид как основная структурная единица включает не только природные нуклеотиды, но также включает аналоги, имеющие модификации сахара или основания (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Uhlman and Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990). Нуклеиновая кислота по данному изобретению может быть выделена или получена стандартными технологиями молекулярной биологии. Например,

нуклеиновая кислота может быть амплифицирована посредством ПЦР (полимеразной цепной реакции) из последовательностей гена нативного GLP-2 с использованием соответствующих последовательностей праймеров и может быть получена стандартными методами синтеза с использованием автоматического синтезатора ДНК.

Как используют здесь, термин «вектор» относится к рекомбинантному вектору, способному экспрессировать целевой белок в подходящей клетке-хозяине, представляющему собой нуклеиновокислотную конструкцию, включающую незаменимые факторы регуляции, функционально связанные с встроенной нуклеиновой кислотой для обеспечения ее экспрессии. В данном изобретении может быть получен рекомбинантный вектор, который включает в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую производное GLP-2. Кроме того, производное GLP-2 по данному изобретению может быть получено посредством трансформации или трансфекции клетки-хозяина рекомбинантным вектором.

Рекомбинантный вектор по данному изобретению может быть типично сконструирован как вектор для клонирования или как вектор для экспрессии и также может быть сконструирован для использования в эукариотических или прокариотических клетках-хозяевах.

В данном изобретении нуклеиновая кислота, кодирующая производное GLP-2, может быть функционально связана с промотором.

Как используют здесь, термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между последовательностью, регулирующей экспрессию нуклеиновой кислоты (например, промотора, сигнальной последовательности, сайта связывания рибосомы, последовательности терминации транскрипции и т.д.), и другой нуклеиновокислотной последовательностью, и регуляторная последовательность может регулировать транскрипцию и/или трансляцию этой другой нуклеиновокислотной последовательности.

Как используют здесь, термин «промотор» относится к нетранслируемой нуклеиновокислотной последовательности, расположенной в 5'-направлении от кодирующей области, включающей сайт связывания полимеразы, и обладающей активностью инициации транскрипции гена, расположенного в 3'-направлении от промотора, в мРНК, т.е. к домену ДНК, с которым связывается полимеразы и инициирует транскрипцию гена, и он может быть расположен в 5'-направлении от сайта инициации транскрипции мРНК.

Например, когда вектор по данному изобретению представляет собой рекомбинантный вектор, а в качестве клетки-хозяина используют прокариотическую клетку, необходимо использовать сильный промотор (например, промотор *tac*, промотор *lac*, промотор *lacUV5*, промотор *lpp*, промотор  $pL\lambda$ , промотор  $pR\lambda$ , промотор *gac5*, промотор *amp*, промотор *gcsA*, промотор *SP6*, промотор *trg*, промотор *T7* и т.д.), способный осуществлять транскрипцию, сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и последовательности терминации транскрипции/трансляции.

Кроме того, вектор для использования в данном изобретении может быть получен путем манипуляций над плазмидами (например, *pSC101*, *pGV1106*, *pACYC177*, *ColE1*, *pKT230*, *pME290*, *pBR322*, *pUC8/9*, *pUC6*, *pBD9*, *pHC79*, *pIJ61*, *pLAFR1*, *pHV14*, серии *pGEX*, серии *pET*, серии *pPICZ $\alpha$* , *pUC19* и т.д.), фагами (например,  $\lambda$ gt4- $\lambda$ B,  $\lambda$ -Charon,  $\lambda$  $\Delta$ z1, M13 и т.д.) или вирусами (например, SV40 и т.д.), которые широко применяют в данной области техники.

При этом, когда вектор по данному изобретению представляет собой рекомбинантный вектор, а в качестве клетки-хозяина используют эукариотическую клетку, можно использовать промоторы, происходящие из геномов клеток млекопитающих (например, металлотионеиновый промотор), или промоторы, происходящие из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса, промотор 7.5K вируса папилломы, промотор SV40, промотор цитомегаловируса и промотор tk вируса HSV), а в качестве последовательности терминации транскрипции они в общем включают в себя последовательность полиаденилирования (например, терминатор бычьего гормона роста и последовательность полиаденилирования, происходящую из SV40).

Дополнительно, рекомбинантный вектор по данному изобретению включает ген устойчивости к антибиотику, широко применяемый в данной области техники в качестве селективного маркера, и может включать, например, гены, придающие устойчивость к ампициллину, гентамицину, карбенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину, генетицину, неомицину и тетрациклину.

Рекомбинантный вектор по данному изобретению может дополнительно включать последовательность для облегчения очистки целевого белка, который нужно собрать, т.е. производного GLP-2. Дополнительно включаемые последовательности могут представлять собой последовательность метки для очистки белка, например, глутатион-S-трансферазу (Pharmacia, USA), мальтозо-связывающий белок (NEB, USA), FLAG (IBI,

USA), гексагистидиновую метку и т.д., однако виды последовательности, необходимой для очистки целевых белков, не ограничиваются перечисленными.

Слитые белки, экспрессируемые рекомбинантным вектором, включающим вышеупомянутую последовательность метки, могут быть очищены посредством аффинной хроматографии. Например, при слиянии с глутатион-S-трансферазой можно использовать глутатион, который является субстратом этого фермента, а когда используют 6-гистидиновую метку, целевой белок можно легко собрать посредством Ni-NTA-колонки.

Как используют здесь, термин «трансформация» относится к способу введения ДНК в клетку-хозяина и обеспечению в ней репликации ДНК как хромосомного фактора или после интеграции в хромосому, что представляет собой феномен искусственного внесения генетических изменений путем введения в клетку экзогенной ДНК.

Способ трансформации, используемый в данном изобретении, может представлять собой любой способ трансформации, и его можно легко осуществлять согласно общепринятой в данной области техники практике. Примеры широко применяемых способов трансформации могут включать способ преципитации  $\text{CaCl}_2$ , более эффективный способ Hanahan с использованием диметилсульфоксида (DMSO) в качестве восстанавливающего агента в способе преципитации  $\text{CaCl}_2$ , электропорацию, способ преципитации  $\text{CaPO}_4$ , способ слияния протопластов, способ с перемешиванием в присутствии карбидкремниевых волокон, трансформацию, опосредованную агробактериями, трансформацию с использованием PEG, трансформацию, опосредованную декстран-сульфатом, липофектаминам, и сухую/опосредованную супрессией трансформацию и т.д.

Способ для трансформации рекомбинантным вектором, включающим в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую производное GLP-2 по данному изобретению, не ограничен указанными способами, и для трансформации или трансфекции можно применять любой способ, обычно используемый в данной области техники.

Трансформант по данному изобретению может быть получен путем введения в клетку-хозяина рекомбинантного вектора, включающего целевую нуклеиновую кислоту, которая кодирует производное GLP-2.

Подходящий хозяин для использования в данном изобретении не ограничивается какими-либо конкретными, можно использовать любых хозяев, которые могут экспрессировать нуклеиновую кислоту по данному изобретению. Примеры подходящих

хозяев могут включать бактерии, относящиеся к роду *Escherichia*, такие как *E. coli*; бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*; бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas*, такие как *Pseudomonas putida*; дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*; клетки насекомых, таких как *Spodoptera frugiperda* (Sf9), и клетки животных, такие как CHO, COS и BSC. В частности, в качестве клетки-хозяина можно использовать *E. coli*, не ограничиваясь этим.

В еще одном аспекте данного изобретения предложен способ получения производного GLP-2 с использованием трансформанта.

В частности, в данном изобретении предложен способ получения производного GLP-2, включающий:

- а) культивирование трансформанта, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую производное GLP-2, для экспрессии производного GLP-2, и
- б) выделение и очистку экспрессированного производного GLP-2.

Среда, используемая в данном изобретении для культивирования трансформанта, должна отвечать требованиям для культивирования клеток-хозяев соответствующим образом. Специалист в данной области техники может подходящим образом выбрать источники углерода, которые могут содержаться в среде для роста клетки-хозяина, в зависимости от типа полученного трансформанта, и может выбрать соответствующие условия культивирования для контролирования продолжительности и масштабов культивирования.

Примеры источника углерода для использования в среде могут включать сахара и углеводы, такие как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, мальтоза, крахмал и целлюлоза; масла и жиры, такие как соевое масло, масло семян подсолнечника, касторовое масло и кокосовое масло; жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота, стеариновая кислота и линолевая кислота; спирты, такие как глицерин и этанол; и органические кислоты, такие как уксусная кислота. Указанные вещества могут быть использованы в отдельности или в комбинации.

Примеры используемого источника азота могут включать пептон, дрожжевой экстракт, мясной экстракт, мальтозный экстракт, кукурузный экстракт, соевую муку и мочевины или неорганические соединения, такие как сульфат аммония, хлорид аммония, фосфат аммония, карбонат аммония и нитрат аммония. Источник азота также можно использовать в отдельности или в комбинации.

Примеры используемого источника фосфора могут включать однозамещенный фосфат калия или двузамещенный фосфат калия или соответствующую натрий-содержащую соль. Кроме того, среда для культивирования может содержать соль металла, необходимую для роста, такую как сульфат магния или сульфат железа.

Наконец, можно использовать незаменимые для роста вещества, такие как аминокислоты и витамины. Кроме того, можно также использовать подходящие предшественники для культуральной среды. Указанные выше источники можно подходящим образом добавлять в культуру в ходе культивирования партиями или при непрерывном культивировании. Значение pH культуры можно подходящим образом доводить с использованием щелочного соединения, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия и аммония, или кислотного соединения, такого как фосфорная кислота или серная кислота. Кроме того, для предупреждения образования пены можно добавлять пеногаситель, такой как сложный полигликолевый эфир жирной кислоты. Кроме того, для поддержания аэробного состояния культуры можно закачивать в культуру кислород или кислород-содержащий газ (например, воздух).

Трансформант по данному изобретению можно культивировать при температуре от 20°C до 45°C, и в частности, от 25°C до 40°C. Кроме того, культивирование продолжают до тех пор, пока не будет получено максимальное количество продуцируемого целевого производного GLP-2, и в этой связи культивирование обычно может продолжаться от 10 часов до 160 часов.

Как описано выше, трансформант по данному изобретению может продуцировать производное GLP-2, когда обеспечены подходящие условия культивирования, соответствующие клетке-хозяину, и продуцируемое производное GLP-2 может секретироваться в цитоплазму или в периплазматическое пространство клетки-хозяина или внеклеточно, в зависимости от состава вектора и характеристик клетки-хозяина.

Экспрессируемые внутрь клетки-хозяина или во внешнее пространство белки можно очищать стандартным способом. Примеры способа очистки могут включать высаливание (например, преципитацию сульфатом аммония, преципитацию фосфатом натрия и т.д.), преципитацию растворителем (например, преципитацию белковой фракции с использованием ацетона или этанола и т.д.), диализ, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию или хроматографию, такую как колоночная хроматография с обращенной фазой, ультрафильтрацию и т.д., и указанные способы можно применять в отдельности или в комбинации.

В следующем аспекте данного изобретения предложена композиция, которая увеличивает период полувыведения и биодоступность производного GLP-2 или которая поддерживает его активность постоянной. В частности, композиция относится к композиции, содержащей носитель, который ковалентно связан непосредственно с производным GLP-2, или к композиции, содержащей компонент, способный усиливать поддержание активности производного GLP-2 *in vivo* даже в отсутствие прямой ковалентной связи.

Кроме того, в еще одном аспекте данного изобретения предложен конъюгат GLP-2, в котором производное GLP-2 и вещество, способное увеличивать период полувыведения производного GLP-2 *in vivo*, связаны. Кроме того, производное GLP-2 по данному изобретению обладает более высокой активностью по сравнению с нативным GLP-2, и его конъюгат пролонгированного действия имеет существенно увеличенный период полувыведения в крови. Таким образом, конъюгат GLP-2 по данному изобретению можно с высокой эффективностью применять для предупреждения, лечения и/или облегчения заболевания кишечника, повреждения кишечника или гастропатии.

Производное GLP-2 является таким, как описано выше.

В конкретном воплощении производное GLP-2 в составе конъюгата по данному изобретению и вещество, способное увеличивать период полувыведения производного GLP-2 *in vivo*, могут быть связаны посредством линкера.

В конъюгате GLP-2 по данному изобретению ковалентная связь образуется между линкером и тиоловой группой, аминогруппой или азидной группой, которая введена в производное GLP-2, и таким образом, сайт связывания производного GLP-2 и линкер могут быть избирательно скорректированы.

Кроме того, в конъюгате GLP-2 аминогруппа на N-конце производного GLP-2 замещена, удалена или модифицирована таким образом, что предотвращается связывание линкера с N-концом, который является важным сайтом для активности *in vivo*, и поэтому сайт связывания производного GLP-2 и линкер могут быть избирательно скорректированы, без конкретного ограничения.

В данном описании термин «вещество, способное увеличивать период полувыведения *in vivo*» относится к веществу, которое может быть связано с производным GLP-2, чтобы таким образом пролонгировать период полувыведения производного GLP-2. В данном описании термин «вещество, способное увеличивать период полувыведения *in vivo*»

*vivo*» может быть использован взаимозаменяемо с термином «биосовместимый материал» или «носитель».

Биосовместимый материал или носитель может включать любое вещество, при условии, что оно может быть присоединено к производному GLP-2 и пролонгировать период полувыведения производного GLP-2, например, может быть выбрано из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, альбумин-связывающего вещества, полимера из повторяющихся фрагментов конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или ее производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара и полимера, но не ограничивается перечисленным.

Биосовместимый материал или носитель может быть связан с производным GLP-2 посредством ковалентной или нековалентной связи. Кроме того, способ связывания производного GLP-2 с биосовместимым материалом или носителем может включать технологию генетической рекомбинации и связывание *in vitro* с использованием полимеров или низкомолекулярных химических веществ, но не ограничивается каким-либо конкретным способом связывания.

В данном изобретении, когда в качестве носителя используют полиэтиленгликоль, можно применять технологию Recode компании Ambrx, Inc., которая позволяет присоединять полиэтиленгликоль в определенном положении, а также технологию гликопегилирования компании Neose Technologies, Inc., которая обеспечивает специфическое присоединение в области гликана. Кроме того, способ может включать технологию высвобождаемого PEG, которая обеспечивает медленное высвобождение полиэтиленгликоля в организме, однако способ не ограничивается перечисленными, и можно также применять технологии, позволяющие увеличивать биодоступность *in vivo* с использованием PEG.

Кроме того, с использованием вышеуказанных технологий к производному GLP-2 может быть присоединен один или более чем один полимер, такой как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахарид, декстран, поливинилэтиловый эфир, биоразлагаемый полимер, липополимер, хитин или гиалуроновая кислота.

В данном изобретении, когда в качестве носителя используют альбумин, можно применять технологию, обеспечивающую увеличение стабильности *in vivo* посредством

прямого ковалентного связывания между альбумином или фрагментом альбумина и производным GLP-2. Кроме того, вместо прямого связывания альбумина с производным GLP-2 можно применять технологию, которая позволяет опосредованно присоединять альбумин к производному GLP-2, путем присоединения вещества, способного связываться с альбумином, например, специфичного к альбумину антитела или фрагмента антитела, к производному GLP-2; технологию присоединения конкретного пептида/белка, имеющего аффинность связывания с альбумином (например, альбумин-связывающим пептидом, полученным при помощи технологии Albumod, разработанной Affibody AB), к производному GLP-2; и технологию присоединения жирной кислоты и тому подобного, имеющих аффинность связывания с альбумином, и т.д., однако способ не ограничивается перечисленным, и можно использовать любую технологию или способ связывания, которые могут улучшать стабильность *in vivo* с использованием альбумина, без ограничения.

Для увеличения периода полувыведения *in vivo* данное изобретение также может включать в свой объем технологию связывания с производным GLP-2 с использованием антитела или фрагмента антитела в качестве носителя. Это может быть антитело или фрагмент антитела, включающий FcRn-связывающую область, или фрагмент антитела, который не включает FcRn-связывающую область, такой как Fab, и т.д. В объеме изобретения также может быть использована технология CovX-body, разработанная CovX Research LLC, с использованием каталитического антитела, и технология увеличения периода полувыведения *in vivo* с использованием Fc области иммуноглобулина.

Вещество, связывающееся с FcRn, может представлять собой Fc область иммуноглобулина.

Как используют здесь, термин «Fc область иммуноглобулина» относится к части иммуноглобулина, за исключением переменных областей тяжелой и легкой цепей, константной области тяжелой цепи 1 (CH1) и константной области легкой цепи (CL), и может дополнительно включать шарнирный участок в константной области тяжелой цепи. В частности, Fc область иммуноглобулина может представлять собой фрагмент, включающий часть или всю Fc область иммуноглобулина, и поэтому может быть использован взаимозаменяемо с термином «фрагмент иммуноглобулина» или «константная область иммуноглобулина».

Нативная Fc область имеет углеводную цепь в положении Asn297 константной области тяжелой цепи 1, однако рекомбинантная Fc область, имеющая происхождение из

*E. coli*, экспрессируется в агликозилированной форме. Удаление сахарных цепей из Fc приводит к снижению аффинности связывания Fc гамма-рецепторов 1, 2 и 3 и комплемента (C1q) с константной областью тяжелой цепи 1, что ведет к снижению или потере антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или комплемент-зависимой цитотоксичности.

Как используют здесь, термин «константная область иммуноглобулина» относится к фрагменту иммуноглобулина, который лишен переменных областей легкой и тяжелой цепей, константной области тяжелой цепи 1 (CH1) и константной области легкой цепи (CL), что означает, что Fc область состоит из константных областей 2 и 3 тяжелой цепи (CH2 и CH3) (или включая константную область 4 тяжелой цепи (CH4)). Возможно, Fc область иммуноглобулина может дополнительно включать шарнирный участок в константной области тяжелой цепи. Кроме того, константная область иммуноглобулина по данному изобретению может представлять собой продленную Fc область иммуноглобулина, включающую в себя часть или всю константную область 1 тяжелой цепи (CH1) и/или константную область легкой цепи (CL), кроме переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, при условии, что она обладает эффектами, по существу идентичными или превосходящими таковые для константной области нативного иммуноглобулина. Кроме того, константная область иммуноглобулина по данному изобретению может быть лишена существенной части аминокислотной последовательности, соответствующей CH2 и/или CH3. Соответственно, константная область иммуноглобулина по данному изобретению может содержать (1) CH1 домен, CH2 домен, CH3 домен и CH4 домен, (2) CH1 домен и CH2 домен, (3) CH1 домен и CH3 домен, (4) CH2 домен и CH3 домен, (5) комбинацию одного или более константных доменов и шарнирный участок иммуноглобулина (или часть шарнирного участка) или (6) димер каждого константного домена тяжелой цепи и константной области легкой цепи. Константная область иммуноглобулина, включая Fc область, представляет собой биоразлагаемый полипептид, который может метаболизироваться *in vivo*, так что он может быть безопасно использован в качестве носителя лекарственного средства. Кроме того, Fc область иммуноглобулина имеет больше преимуществ в плане получения, очистки и выхода конъюгата по сравнению с целой молекулой иммуноглобулина, благодаря своей относительно низкой молекулярной массе. Помимо этого, будучи лишенной Fab, которая проявляет высокую гетерогенность ввиду различий в аминокислотной последовательности у различных антител, Fc область иммуноглобулина

сама по себе обеспечивает существенно повышенную гомогенность конъюгата и снижает вероятность проявления антигенных свойств в крови.

С другой стороны, константная область иммуноглобулина может быть человеческого или животного происхождения, например, происходить от коров, овец, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс, морских свинок и т.д. и, в частности, может быть человеческого происхождения. Также, константная область иммуноглобулина может быть выбрана из константных областей, происходящих из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, или их комбинаций или гибридов. В частности, константная область происходит из IgG или IgM, которые являются наиболее распространенными в крови человека и, в частности, из IgG, который, как известно, увеличивает период полувыведения лиганд-связывающих белков. В данном изобретении Fc область иммуноглобулина может представлять собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных иммуноглобулинов, состоящих из доменов одинакового происхождения.

Как используют здесь, термин «комбинация» означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные константные области иммуноглобулинов одинакового происхождения (предпочтительно, Fc областей), связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Это означает, что димер или мультимер могут быть образованы из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из Fc фрагментов IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc и IgE Fc.

В данном описании термин «гибрид» означает, что последовательности, кодирующие две или более константных областей различного происхождения, находятся в составе одной цепи константной области иммуноглобулина (предпочтительно, Fc области). В данном изобретении возможны различные формы гибридов. Например, гибридный домен может состоять из 1-4 доменов, выбранных из группы, состоящей из доменов CH1, CH2, CH3 и CH4 Fc области IgG, Fc области IgM, Fc области IgA, Fc области IgE и Fc области IgD, и может дополнительно включать шарнирный участок.

IgG можно подразделить на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и данное изобретение может охватывать их комбинации или гибриды. Предпочтительными являются подклассы IgG2 и IgG4, и наиболее предпочтительной является Fc область IgG4, которая редко обладает эффекторными функциями, такими как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC).

Кроме того, константная область иммуноглобулина может быть гликозилирована в той же степени или в большей или меньшей степени по сравнению с нативной формой или быть в дегликозилированной форме. Увеличение или уменьшение гликозилирования или дегликозилирование константной области иммуноглобулина может быть достигнуто стандартными способами, например, химическим способом, ферментативным способом или генноинженерным способом с использованием микроорганизмов. Так, при дегликозилировании связывание комплемента (C1q) с константной областью иммуноглобулина существенно снижается, и антитело-зависимая цитотоксичность или комплемент-зависимая цитотоксичность снижается или устраняется, таким образом не происходит индукции нежелательных иммунных ответов *in vivo*. В этой связи дегликозилированные или агликозилированные константные области иммуноглобулина больше соответствуют назначению носителей лекарственных средств. Следовательно, Fc область иммуноглобулина может быть, в частности, агликозилированной Fc областью, происходящей из IgG4 человека, т.е., агликозилированной Fc областью IgG4 человеческого происхождения. Fc область человеческого происхождения является более предпочтительной по сравнению с Fc областью, не являющейся человеческого происхождения, которая может действовать в качестве антигена в человеческом организме и вызывать нежелательные иммунные ответы, такие как образование новых антител к антигену.

Кроме того, константная область иммуноглобулина по данному изобретению включает не только нативную аминокислотную последовательность, но также и производные этой последовательности (мутанты). Производное аминокислотной последовательности означает, что оно имеет аминокислотную последовательность, отличную от аминокислотной последовательности дикого типа вследствие делеции, вставки, консервативной или неконсервативной замены одного или более чем одного аминокислотного остатка или их комбинации. Например, подходящими для модификации сайтами могут служить аминокислотные остатки Fc IgG в положениях с 214 по 238, с 297 по 299, с 318 по 322 или с 327 по 331, которые, как известно, важны для связывания. Могут быть использованы различные производные, такие которые получены путем удаления сайтов, способных образовывать дисульфидные связи, удаления N-концевых аминокислот из нативного Fc или добавления метионина к N-концу нативного Fc. Кроме того, для устранения эффекторной функции можно удалять сайты присоединения комплемента, например, сайты присоединения C1q или сайты ADCC. Методики

получения производных последовательности константной области иммуноглобулина изложены в публикациях международных заявок WO97/34631 и WO 96/32478.

В данной области техники хорошо известны аминокислотные замены в молекуле белка или пептида, которые не изменяют активность молекулы (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами являются замены аминокислотных остатков Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly, в обоих направлениях. Возможно, аминокислоты могут быть модифицированы путем фосфорилирования, сульфатирования, ацилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и т.п.

Описанное выше производное константной области иммуноглобулина может представлять собой производное, которое обладает биологической активностью, эквивалентной таковой для константной области иммуноглобулина по данному изобретению, но имеет более высокую структурную стабильность константной области иммуноглобулина к воздействию нагревания, pH и т.д. Кроме того, константная область иммуноглобулина может быть получена из нативной константной области, выделенной у человека и животных, таких как коровы, овцы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы, морские свинки и т.д., или может быть их рекомбинантными формами или производными, полученными из трансформированных клеток животных или микроорганизмов. Так, они могут быть получены из нативного иммуноглобулина путем выделения целых иммуноглобулинов из организмов человека или животного и последующей их обработки протеолитическим ферментом. Папаин расщепляет нативный иммуноглобулин на фрагменты Fab и Fc, а обработка пепсином приводит к образованию фрагментов pF'c и F(ab)<sub>2</sub>. Эти фрагменты можно подвергать, например, эксклюзионной хроматографии для выделения фрагментов Fc или pF'c.

В частности, константная область иммуноглобулина человеческого происхождения может представлять собой константную область рекомбинантного иммуноглобулина, полученного из микроорганизма.

В данном изобретении линкер может быть связан с N-концом, C-концом, тиоловой группой (например, цистеина), аминогруппой (например, лизина, аргинина, глутамина или гистидина) и/или гидроксильной группой вещества, способного увеличивать период полувыведения *in vivo*; и может быть присоединен к N-концу, C-концу, тиоловой группе

(например, цистеина), аминогруппе (например, лизина, аргинина, глутамина или гистидина), азидной группе (например, 6-азидо-лизина) и/или гидроксильной группе производного GLP-2, но не ограничивается перечисленным.

Линкер может представлять собой пептидный линкер или непептидный линкер.

Благодаря использованию в качестве пептидного линкера полимера, устойчивого к протеиназе, период полувыведения производного GLP-2 в крови можно поддерживать таким же образом, как при помощи вещества, способного увеличивать период полувыведения производного GLP-2 *in vivo*. Следовательно, в данном изобретении можно использовать любой непептидный линкер без ограничений, при условии, что он представляет собой непептидный полимер, обладающий устойчивостью к протеиназе *in vivo*.

Как используют здесь, термин «непептидный полимер» охватывает биосовместимый полимер, в котором конъюгированы два или более повторяющихся блока, и он может быть использован взаимозаменяемо с термином «непептидный линкер». Повторяющиеся блоки связаны друг с другом посредством любой ковалентной связи, но не пептидной связью. В данном изобретении непептидный полимер включает реакционноспособные группы на своих концах, и поэтому конъюгат может быть образован в результате взаимодействия с другими компонентами, составляющими конъюгат. Такой непептидный полимер может иметь два конца или три конца.

Как используют здесь, термин «непептидная полимерная связывающая группировка» относится к элементу, составляющему конъюгат, который был образован путем присоединения непептидного полимера, имеющего на обоих концах реакционноспособные группы, к Fc области иммуноглобулина и производному GLP-2 посредством каждой реакционноспособной группы непептидного полимера.

В конкретном воплощении данного изобретения конъюгат GLP-2 может представлять собой конъюгат, в котором Fc область иммуноглобулина и производное GLP-2 связаны друг с другом посредством непептидного полимера, который включает на обоих концах реакционноспособные группы, которые могут быть присоединены к Fc области иммуноглобулина и производного GLP-2.

В частности, непептидный полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота

(PLA) и сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA), липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации, без ограничения. В более конкретном воплощении непептидный полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, но не ограничивается им. Кроме того, в объем данного изобретения также входят производные указанных выше веществ, уже известные в данной области техники, и производные, которые могут быть легко получены при помощи технологий, известных из уровня техники.

Присоединение линкера может быть осуществлено посредством химической связи, такой как нековалентная химическая связь или ковалентная химическая связь, без ограничения.

В данном изобретении можно использовать любой непептидный полимер без ограничений, при условии, что он представляет собой полимер, обладающий устойчивостью к протеазам *in vivo*. В частности, молекулярная масса непептидного полимера может находиться в диапазоне значений выше 0 кДа и до 200 кДа, в частности в диапазоне от 1 кДа до 100 кДа, более конкретно в диапазоне от 1 кДа до 50 кДа, еще более конкретно в диапазоне от 1 кДа до 20 кДа, еще более конкретно в диапазоне от 3,4 кДа до 10 кДа, и наиболее конкретно приблизительно 3,4 кДа, без ограничения.

Кроме того, носитель, в частности непептидный полимер, по данному изобретению, связанный с Fc областью иммуноглобулина, может представлять собой полимер одного типа или комбинацию различных типов полимеров.

В одном конкретном воплощении оба конца непептидного полимера могут быть присоединены к тиоловой группе, аминогруппе или гидроксильной группе Fc области иммуноглобулина и могут быть связаны с тиоловой группой, аминогруппой, азидной группой или гидроксильной группой производного GLP-2.

В частности, непептидный полимер может иметь на обоих концах реакционноспособную группу, способную связываться как с Fc областью иммуноглобулина, так и с производным GLP-2. В частности, реакционноспособная группа может связываться с тиоловой группой цистеина; аминогруппой, расположенной на N-конце лизина, аргинина, глутамина и/или гистидина; и/или гидроксильной группой, расположенной на C-конце Fc области иммуноглобулина, и может связываться с тиоловой группой; аминогруппой лизина, аргинина, глутамина и/или гистидина; азидной группой азидо-лизина; и/или гидроксильной группой производного GLP-2, однако реакционноспособные группы не ограничиваются перечисленными.

Более конкретно, реакционноспособная группа непептидного полимера может представлять собой одну или более выбранных из группы, состоящей из альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного, без ограничения.

В указанном выше примерами альдегидной группы могут быть пропиональдегидная группа или бутиральдегидная группа, однако альдегидная группа не ограничена перечисленными.

В указанном выше примерами сукцинимидного производного может быть сукцинимидилкарбоксиметил, сукцинимидилвалерат, сукцинимидилметилбутаноат, сукцинимидилметилпропионат, сукцинимидилбутаноат, сукцинимидилпропионат, N-гидроксисукцинимид или сукцинимидилкарбонат, но не ограничиваясь перечисленным.

Непептидный полимер может быть связан с Fc областью иммуноглобулина и производным GLP-2 посредством реакционноспособных групп для преобразования в непептидную полимерную связывающую группировку.

Кроме того, конечный продукт, полученный восстановительным алкилированием по альдегидной связи, является более стабильным, чем тот, который присоединен амидной связью. Альдегидная реакционноспособная группа избирательно взаимодействует с N-концом при низких значениях pH и способна образовывать ковалентную связь с остатком лизина при высоких значениях pH (например, pH 9,0).

Концевые реакционноспособные группы непептидного полимера по данному изобретению могут быть одинаковыми или различаться между собой. Непептидный полимер может иметь альдегидную реакционноспособную группу на обоих концах. Альтернативно, непептидный полимер может иметь на каждом конце альдегидную группу и малеимидную группу, или может иметь на каждом конце альдегидную группу и сукцинимидную реакционноспособную группу, но не ограничиваясь перечисленным.

Например, непептидный полимер может иметь малеимидную группу на одном конце и альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу на другом конце. В другом примере непептидный полимер может иметь сукцинимидильную группу на одном конце и пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу на другом конце.

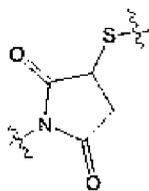
Когда в качестве непептидного полимера используют поли(этиленгликоль), имеющий гидроксильную группу на пропиональдегидном конце, гидроксильную группу можно активировать в различные реакционноспособные группы при помощи известных

химических реакций, или можно использовать имеющийся в продаже поли(этиленгликоль), имеющий модифицированные реакционноспособные функциональные группы, для получения конъюгата по данному изобретению.

В одном конкретном воплощении реакционноспособная группа непептидного полимера может быть связана с остатком цистеина производного GLP-2, в частности, с -SH группой цистеина, но не ограничивается указанным.

В случае использования малеимид-PEG-альдегида, малеимидная группа может быть связана с -SH группой производного GLP-2 тиоэфирной связью, и альдегидная группа может быть связана с -NH<sub>2</sub> группой Fc области иммуноглобулина посредством реакции восстановительного алкилирования, однако данное изобретение не ограничивается указанным примером, который является лишь одним из воплощений.

В результате такого восстановительного алкилирования N-концевая аминогруппа Fc области иммуноглобулина связывается с атомом кислорода, расположенным на одном конце PEG через функциональную группу линкера, имеющую структуру -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, с образованием структуры -PEG-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-Fc иммуноглобулина. Кроме того, благодаря тиоэфирной связи может быть образована структура, в которой один конец PEG связан с атомом серы, расположенным в цистеине производного GLP-2. Тиоэфирная связь,



описанная выше, может включать структуру .

Однако, данное изобретение не ограничивается приведенным выше примером, который является лишь одним из воплощений.

Кроме того, в конъюгате реакционноспособная группа непептидного полимера может быть присоединена к группе -NH<sub>2</sub>, расположенной на N-конце Fc области иммуноглобулина, однако это является всего лишь одним из примеров.

Кроме того, в конъюгате реакционноспособная группа производного GLP-2 может быть присоединена к непептидному полимеру, имеющему реакционноспособную группу, через C-конец производного GLP-2, однако это является всего лишь одним из примеров.

Как используют здесь, термин «C-конец» означает карбокси-конец пептида и означает положение, в котором может быть присоединен непептидный полимер для реализации назначения данного изобретения. Например, C-конец может включать как аминокислотный остаток на самом C-конце, так и аминокислотный остаток вблизи C-

конца и, в частности, может включать от 1-го до 20-го аминокислотного остатка от самого конца, без ограничения.

В одном конкретном воплощении связывание вещества, способного пролонгировать период полувыведения производного GLP-2 *in vivo*, может быть осуществлено методом генетической рекомбинации.

В одном конкретном воплощении конъюгат GLP-2 по данному изобретению представляет собой конъюгат GLP-2, в котором производное GLP-2 и Fc область иммуноглобулина ковалентно соединены через непептидный полимер по обоим концам непептидного полимера.

Так, непептидный полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты или их комбинации.

В частности, в производном GLP-2 по данному изобретению ковалентная связь может быть образована между линкером, который представляет собой непептидный полимер, и введенной тиоловой группой, аминогруппой или азидной группой. Таким образом, когда используют производное GLP-2 по данному изобретению, может быть получен конъюгат GLP-2, в котором сайт связывания избирательно скорректирован.

Кроме того, поскольку в производном GLP-2 по данному изобретению N-концевая аминокислотная группа замещена, удалена или модифицирована, предотвращается связывание непептидного полимера с N-концом, который является важным сайтом для активности *in vivo*, и поэтому может быть получен конъюгат GLP-2, в котором сайт связывания избирательно скорректирован.

В данном изобретении конъюгат GLP-2 используют взаимозаменяемо с термином «конъюгат производного GLP-2» или «конъюгат производного GLP-2 пролонгированного действия».

В еще одном аспекте данного изобретения предложен способ получения конъюгата GLP-2, включающий связывание производного GLP-2 с веществом, способным увеличивать период полувыведения производного GLP-2 *in vivo*.

Производное GLP-2, вещество, способное увеличивать период полувыведения производного GLP-2 *in vivo*, и конъюгат GLP-2 являются такими, как описано выше.

В частности, способ может включать:

(а) получение комплекса путем взаимодействия между непептидным полимером, имеющим две или более концевых реакционноспособных группы, с одним из производного GLP-2 и носителя (например, Fc области иммуноглобулина), так чтобы в данном комплексе производное GLP-2 или носитель были присоединены к одному концу непептидного полимера, а реакционноспособная группа была на другом конце; и

(б) получение конъюгата путем взаимодействия комплекса, полученного на стадии (а), с одним из носителя и производного GLP-2, не присоединенных к комплексу, так чтобы производное GLP-2 и носитель были соединены через непептидный полимер.

Приведенное выше описание применимо к непептидному полимеру, носителю, производному GLP-2 и их связыванию между собой.

Как используют здесь, термин «комплекс» относится к промежуточному соединению, в котором только один из производного GLP-2 и носителя связан с непептидным полимером посредством ковалентной связи. Производное GLP-2 или носитель, не присоединенные к комплексу, могут быть присоединены к концу непептидного полимера комплекса, в котором этот конец не связан с производным GLP-2 или носителем.

В еще одном аспекте данного изобретения предложена композиция GLP-2 пролонгированного действия, обладающая увеличенной продолжительностью действия и стабильностью *in vivo*, содержащая конъюгат GLP-2.

При этом, композиция, способная увеличить биодоступность или обеспечить пролонгированную активность, может включать композиции с замедленным высвобождением, в которых применяют микрочастицы и наночастицы, в которых используется PLGA, гиалуроновая кислота, хитозан и т.д.

Кроме того, примеры других форм композиций, которые могут увеличивать биодоступность или поддерживать пролонгированную активность, могут включать имплантаты, ингаляции, композиции для назального введения и пластыри.

Конъюгат GLP-2 по данному изобретению может поддерживать активность обычного GLP-2 *in vivo* и также может увеличивать период полувыведения производного GLP-2 в крови и значительно увеличивать продолжительность действия пептида *in vivo*, и следовательно, конъюгат GLP-2 полезен в лечении заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии.

В еще одном аспекте данного изобретения предложена композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая производное GLP-2 и/или конъюгат GLP-2.

Фармацевтическая композиция может представлять собой фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии.

Производное GLP-2 и конъюгат GLP-2 являются такими, как описано выше.

Как используют здесь, термин «заболевание кишечника» может относиться к синдрому короткого кишечника, синдрому раздраженного кишечника, воспалительному заболеванию кишечника, болезни Крона, колониту, колиту, панкреатиту, илеиту, мукозиту или атрофии кишечника, но не ограничивается перечисленным.

Как используют здесь, термин «гастропатия» может относиться к спазму желудка, гастриту, язве желудка, дуодениту или язве двенадцатиперстной кишки, но не ограничивается перечисленным.

Как используют здесь, термин «предупреждение» относится к любой деятельности для подавления или отсрочивания начала заболевания путем введения фармацевтической композиции. Термин «лечение» относится ко всем видам деятельности, улучшающей или благоприятным образом изменяющей симптомы заболевания благодаря введению фармацевтической композиции.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может включать в себя фармацевтически приемлемый носитель.

Как используют здесь, термин «фармацевтически приемлемый» относится к свойствам находиться в достаточном для проявления терапевтического эффекта количестве, не вызывая побочных эффектов, которое может быть без затруднений установлено специалистом в данной области техники на основании факторов, хорошо известных в области медицины, таких как тип заболевания, возраст, масса тела, состояние здоровья, пол, чувствительность пациента к лекарственному средству, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения, лекарственное(ые) средство(а) для смешивания или одновременного введения и т.д.

Для перорального введения фармацевтически приемлемый носитель может включать: связывающее вещество, скользящее вещество, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизующее вещество, диспергирующее вещество, стабилизирующее вещество, суспендирующий агент, краситель, корригент и т.д.; для инъекций: буферизующее вещество, консервант, анальгетик, солюбилизующее вещество, изотонический агент, стабилизирующее вещество и т.д., которые можно комбинировать для применения; для местного введения: основу, эксципиент, смазывающее вещество, консервант и т.д.

Композиция по данному изобретению может быть приготовлена в виде различных лекарственных форм путем объединения с фармацевтически приемлемым носителем, описанным выше. Например, для перорального введения композиция может быть представлена в форме таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.д. Для инъекций композиция может быть представлена в однодозовых ампулах или в многодозовых контейнерах. Кроме того, композиция также может быть приготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, пилуль, капсул, препаратов с замедленным высвобождением и т.д.

При этом, примеры подходящих носителей, эксципиентов и разбавителей могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и т.д. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнитель, антикоагулянт, смазывающее вещество, увлажняющее вещество, корригент, консервант и т.д.

Кроме того, производное GLP-2 и/или конъюгат GLP-2 по данному изобретению может содержаться в количестве от 0,001 масс.% до 10 масс.% из расчета на общую массу композиции по данному изобретению, без конкретного ограничения.

В еще одном аспекте данного изобретения предложен способ предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, производного GLP-2, конъюгата GLP-2 и/или фармацевтической композиции, содержащей их в качестве активного ингредиента.

Производное GLP-2, конъюгат GLP-2, фармацевтическая композиция, заболевание кишечника, повреждение кишечника, гастропатия, предупреждение и лечение являются такими, как описано выше.

Как используют здесь, термин «субъект» относится к субъекту, у которого подозревают наличие заболевания кишечника, повреждения кишечника или гастропатии, и субъект, у которого подозревают наличие заболевания, относится к млекопитающим, включая человека, крыс, домашний скот и т.д., которые имеют или подвержены риску возникновения заболевания, однако охватывает любого субъекта, которого можно лечить

указанным производным GLP-2, конъюгатом GLP-2 или композицией по данному изобретению, содержащей их, без ограничения.

Как используют здесь, термин «введение» относится к введению конкретного вещества пациенту любым соответствующим способом, а путь введения композиции может представлять собой любой стандартный путь, который обеспечивает доставку лекарственного средства к ткани-мишени. Это может быть внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутрикожное введение, пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, внутривенное введение, интравенное введение и т.д., без ограничения. Однако, поскольку пептиды при пероральном введении подвергаются катаболизму, действующие вещества композиции для перорального введения предпочтительно должны иметь покрытие или защиту от разложения в желудке, и в частности, могут быть введены в инъекционной форме. Кроме того, фармацевтическую композицию можно вводить при помощи некоторых устройств, способных доставлять действующие вещества в клетку-мишень.

Кроме того, фармацевтическая композиция по данному изобретению может определяться типами действующих веществ, использованных в лекарственном средстве, а также рядом факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, путь введения, возраст, пол и масса тела пациента, тяжесть заболевания и т.д. Поскольку фармацевтическая композиция по данному изобретению имеет превосходную продолжительность действия *in vivo*, количество и частота введений фармацевтической композиции по данному изобретению могут быть существенно сокращены.

Суммарную эффективную дозу композиции по данному изобретению можно вводить пациенту в виде однократной дозы или можно вводить в течение длительного периода времени в виде многократных доз согласно протоколу лечения с дробным введением. В фармацевтической композиции по данному изобретению содержание активного(ых) ингредиента(ов) может варьироваться в зависимости от тяжести заболевания. В частности, общая суточная доза производного GLP-2 или конъюгата GLP-2 по данному изобретению может составлять от приблизительно 0,0001 мг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента.

Однако, эффективную дозу производного GLP-2 или конъюгата GLP-2 определяют с учетом различных факторов, включая, помимо пути введения и частоты введения фармацевтической композиции, возраст, массу тела, состояние здоровья, пол пациента,

тяжесть заболевания, диету и скорость экскреции. В этой связи, специалисты в данной области техники могут без труда определить эффективную дозу, подходящую для конкретного применения фармацевтической композиции по данному изобретению. Фармацевтическая композиция по данному изобретению не ограничивается конкретной композицией и способом и путем введения, при условии, что она демонстрирует эффекты, описанные в данном изобретении.

В следующем аспекте данного изобретения предложено применение производного GLP-2 или конъюгата GLP-2 для изготовления лекарственного средства.

В одном аспекте лекарственное средство может быть использовано для предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, но не ограничивается перечисленным.

В еще одном аспекте данного изобретения предложено применение производного GLP-2 или конъюгата GLP-2 для предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии.

Производное GLP-2, конъюгат GLP-2, заболевание кишечника, повреждение кишечника и гастропатия являются такими, как описано выше.

Приведенные далее Примеры служат дополнительной иллюстрацией к данному изобретению. При этом следует понимать, что указанные Примеры служат исключительно в целях иллюстрации и не ограничивают данное изобретение в какой-либо форме.

**Пример 1. Получение конъюгата CA-GLP-2 KC-PEG (10K)-Fc иммуноглобулина или конъюгата CA-GLP-2 RC-PEG (10K)-Fc иммуноглобулина**

Для пегилирования 34<sup>го</sup> остатка цистеина CA-GLP-2 KC или CA-GLP-2 RC (CPC, Chinese Peptide Co, China) при помощи 10 кДа MAL-ALD PEG (полиэтиленгликоль, имеющий молекулярную массу 10 кДа, в котором водородная связь на каждом конце модифицирована 3-[(3-N-малеимидил)пропаноил]аминопропильной группой и пропилальдегидной группой, соответственно; NOF Inc., Japan) проводили реакцию в течение 1-3 часов при молярном отношении CA-GLP-2 KC или CA-GLP-2 RC к PEG от 1:1 до 2 и концентрации пептида от 1 мг/мл до 3 мг/мл. При этом реакцию проводили в смешанном растворителе, содержащем 50 mM Tris (pH 7,5) и изопропанол. Из реакционного раствора выделяли моно-ПЕГилованный CA-GLP-2 KC или моно-ПЕГилованный CA-GLP-2 RC с использованием высокопроизводительной колонки с

сульфопропилсефарозой (GE, U.S.A.), используя градиент концентрации хлорида калия и буфер, содержащий этанол и цитрат натрия (pH 2,0).

Затем проводили реакцию при температуре от 2°C до 8°C в течение от 12 до 20 часов при молярном соотношении очищенного моно-ПЕГирированного СА-GLP-2 КС или моно-ПЕГирированного СА-GLP-2 RC и Fc фрагмента иммуноглобулина от 1:2 до 1:6 и общей концентрации белка от 30 мг/мл до 35 мг/мл. При этом реакционный раствор содержал 20 мМ цианборгидрид натрия (NaCNBH<sub>3</sub>), который добавляли в качестве восстанавливающего агента к 100 мМ буферному раствору фосфата калия (pH 6,0) и изопропанолу.

По завершении реакции конъюгат производного СА-GLP-2 RC (10K PEG) пролонгированного действия (СА-GLP-2 КС-PEG(10K)-Fc иммуноглобулина) и конъюгат производного СА-GLP-2 RC (10K PEG) пролонгированного действия (СА-GLP-2 RC-PEG(10K)-Fc иммуноглобулина), в котором СА-GLP-2 КС или СА-GLP-2 RC ковалентно связан с Fc иммуноглобулина посредством PEG, очищали из реакционного раствора путем нанесения на колонку Source15Q (GE, U.S.A.), используя градиент концентрации бис-Трис буфера (pH 6,5) и хлорида натрия, и путем нанесения на колонку Source 15ISO (GE, U.S.A.), используя градиент концентрации сульфата аммония и цитрата натрия (pH от 5,0 до 5,2). По результатам анализа ВЭЖХ с обращенной фазой чистота конъюгатов составляла 92,9% и 95,6%, соответственно, и результаты определения показаны на Фиг. 1.

### **Пример 2. Получение конъюгата СА-GLP-2 RK-PEG (3,4К или 10К)-Fc иммуноглобулина**

Для пегилирования 34<sup>го</sup> остатка лизина СА-GLP-2 RK (CPC, Chinese Peptide Co, China) при помощи 3,4 кДа или 10 кДа ALD(2) PEG (полиэтиленгликоль, имеющий молекулярную массу 3,4 кДа, где водороды на каждом конце модифицированы пропилальдегидными группами; NOF Inc., Japan) проводили реакцию при температуре от 2°C до 8°C в течение 4-16 часов при молярном отношении СА-GLP-2 RK к PEG от 1:5 до 1:20 и концентрации пептида от 5 мг/мл до 10 мг/мл. При этом реакцию проводили в 20 мМ HEPES (pH 7,5) и этаноле при добавлении 20 мМ цианборгидрида натрия в качестве восстанавливающего агента. Из реакционного раствора выделяли моно-ПЕГирированный СА-GLP-2 RK с использованием колонки Source 15S (GE, U.S.A.), используя градиент концентрации хлорида калия и буфер, содержащий этанол и цитрат натрия (pH 2,0).

Затем получали конъюгат очищенного моно-ПЕГирированного СА-GLP-2 RK и Fc иммуноглобулина и очищали, используя такие же условия реакции и очистки, как в

Примере 1. По результатам анализа ВЭЖХ с обращенной фазой чистота конъюгата производного СА-GLP-2 РК (3,4К PEG) пролонгированного действия (СА-GLP-2 РК-PEG (3,4К)-Fc иммуноглобулина) и конъюгата производного СА GLP-2 РК (10К PEG) пролонгированного действия (СА-GLP-2 РК-PEG (10К)-Fc иммуноглобулина), в котором СА-GLP-2 РК ковалентно связан с Fc иммуноглобулина посредством PEG, составляла 94,3% и 92,6%, соответственно, и результаты определения показаны на Фиг. 1.

**Пример 3. Получение конъюгата СА-GLP-2 КК-PEG (10К)-Fc иммуноглобулина и конъюгата СА-GLP-2 K<sub>AZ</sub>К-PEG(10К)-Fc иммуноглобулина**

Используя СА-GLP-2 КК и СА-GLP-2 K<sub>AZ</sub>К в соответствии со способом, описанным в Примере 2, получали и очищали конъюгат производного СА GLP-2 КК (10К PEG) пролонгированного действия (СА-GLP-2 КК-PEG(10К)-Fc иммуноглобулина) и конъюгат производного СА GLP-2 K<sub>AZ</sub>К (10К PEG) пролонгированного действия, в которых СА-GLP-2 КК или СА-GLP-2 K<sub>AZ</sub>К ковалентно связаны с Fc иммуноглобулина посредством PEG.

**Пример 4. Подтверждение активности *in vitro* производного GLP-2 и его конъюгата пролонгированного действия**

Для измерения активности производных GLP-2 и конъюгатов производных GLP-2 пролонгированного действия, которые были получены в предыдущих Примерах, использовали клеточную линию, в которой рецептор GLP-2 трансформирован, для определения клеточной активности *in vitro*. Клеточная линия представляет собой линию клеток яичников китайского хомячка (CHO)-K1, трансформированных для экспрессии человеческого рецептора GLP-2, и поэтому подходит для измерения активности GLP-2 (DiscoverX, U.S.A.).

Для измерения активности производных GLP-2 и его конъюгатов пролонгированного действия делали серию 3-кратных разведений человеческого GLP-2 и тедуглутида (Gattex®, Shire) от 166,7 нМ до 0,0028 нМ; серию 3-кратных разведений производных GLP-2 от 500 нМ до 0,0085 нМ; и серию 3-кратных разведений конъюгатов производных GLP-2 от 3000 нМ до 0,0508 нМ. У культивируемых клеток CHO-K1, экспрессирующих человеческий рецептор GLP-2, удаляли культуральную жидкость и затем к клеткам добавляли каждое из серийно разведенных веществ в количестве 5 мкл, соответственно. Затем добавляли буфер (5 мкл), содержащий антитело к цАМФ, и культивировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем к ним добавляли детектирующую смесь (10 мкл), содержащую лизирующий клетки буфер для разрушения

клеток и оставляли прореагировать при комнатной температуре в течение 60 минут. После завершения реакции клеточные лизаты использовали в наборе LANCE cAMP (PerkinElmer, США) для расчета значений EC<sub>50</sub> по накопленному cAMP и сравнивали между собой полученные значения. Относительные титры в сравнении с человеческим GLP-2 приведены ниже в Таблице 2.

Таблица 2. Относительные титры производных GLP-2

Производное GLP-2	Активность <i>in vitro</i> в сравнении с человеческим GLP-2 (%)	Конъюгат производного GLP-2	Активность <i>in vitro</i> в сравнении с человеческим GLP-2 (%)
Тедуглутид	147,5	-	-
CA GLP-2 KC	149,3	Конъюгат производного CA GLP-2 KC (10K PEG) пролонгированного действия	9,7
CA GLP-2 KK	205,6	Конъюгат производного CA GLP-2 KK (10K PEG) пролонгированного действия	ND
CA GLP-2 RC	120,0	Конъюгат производного CA GLP-2 RC (10K PEG) пролонгированного действия	46,0
CA GLP-2 RK	333,2	Конъюгат производного CA GLP-2 RK (10K PEG) пролонгированного действия	52,0
		Конъюгат производного CA GLP-2 RK (3,4K PEG) пролонгированного действия	52,6

Не опр = не определяли

Было подтверждено, что новые производные GLP-2 и их конъюгаты пролонгированного действия, полученные как описано выше, обладают функцией активации рецептора GLP-2, и что относительная активность производных GLP-2 значительно превосходит таковую человеческого GLP-2. Кроме того, поскольку подтвердили, что конъюгат производного GLP-2 пролонгированного действия (CA GLP-2 RK) с последовательностью SEQ ID NO: 4 и конъюгат производного GLP-2

продолженного действия (CA GLP-2 RC) с последовательностью SEQ ID NO: 6 обладали более высокой активностью по сравнению с конъюгатом производного GLP-2 продолженного действия (CA GLP-2 KC) с последовательностью SEQ ID NO: 2, их можно использовать в качестве веществ для лечения соответствующего заболевания.

**Пример 5. Подтверждение фармакокинетики конъюгата производного GLP-2 продолженного действия у крыс SD**

Сравнивали фармакокинетику конъюгатов производных GLP-2 продолженного действия у нормальных крыс.

Нормальных крыс в возрасте 8 недель распределяли в группу, получавшую конъюгат производного CA GLP-2 KC (10K PEG) продолженного действия (2,52 мг/кг), группу, получавшую конъюгат производного CA GLP-2 RC (10K PEG) продолженного действия (2,52 мг/кг), группу, получавшую конъюгат производного CA GLP-2 RK (10K PEG) продолженного действия (2,52 мг/кг), и группу, получавшую конъюгат CA GLP-2 RK (3,4K PEG) продолженного действия (2,52 мг/кг). Исследуемые вещества вводили однократно путем подкожной инъекции нормальным крысам каждой группы (3 крысы/группу). Затем у животных группы, получавшей конъюгат производного CA GLP-2 KC (10K PEG) продолженного действия, брали образцы цельной крови из хвостовой вены через 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 часов. Кроме того, через 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 и 336 часов брали образцы цельной крови из хвостовой вены у животных других групп, получавших конъюгаты производных CA GLP-2 продолженного действия. Цельную кровь помещали в микропробирки объемом 1,5 мл, центрифугировали при комнатной температуре при 5000 об/мин в течение 10 минут и затем отделяли сыворотку и хранили при -20°C. Для определения концентраций в хранившейся сыворотке из каждой группы использовали метод ELISA. Для конъюгатов производных CA GLP-2 меченое биотином поликлональное антитело к GLP-2 (Phoenix Pharmaceuticals, #B-028-14) иммобилизовали на планшете, покрытом стрептавидином (Roche, #11645692001), и затем оставляли прореагировать с сывороткой в течение 1 ч. После отмывания добавляли антитело к человеческому IgG4, конъюгированное с пероксидазой хрена (Alpha Diagonosis, #10124), и оставляли прореагировать при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем проводили цветную реакцию с использованием реагента ТМВ и измеряли абсорбцию при длине волны 450 нм. Рассчитывали параметры фармакокинетики, используя концентрации в сыворотке.

В результате подтвердили, что все конъюгаты производных СА GLP-2 пролонгированного действия демонстрировали сходные показатели AUC и периодов полувыведения. В частности, для конъюгата производного СА GLP-2 RK (3,4К PEG) пролонгированного действия период полувыведения был укорочен из-за короткоцепочечного PEG, однако существенных различий между AUC не наблюдалось. Результаты показаны на Фиг. 2 и в Таблице 3.

Таблица 3. Параметры фармакокинетики конъюгатов производных GLP-2 пролонгированного действия

Производное GLP-2	AUC <sub>last</sub> (нг×ч/мл)	C <sub>max</sub> (нг/мл)	T <sub>max</sub> (ч)	T <sub>1/2</sub> (ч)	MRT <sub>last</sub> (ч)
Конъюгат производного СА GLP-2 KC (10К PEG) пролонгированного действия	1138923,0 ±110855,6	11745,9 ±957,4	48,0 ±0,0	42,2 ±3,6	74,7 ±2,0
Конъюгат производного СА GLP-2 RC (10К PEG) пролонгированного действия	1384949,9 ±186817,6	13350,4 ±3611,4	26,7 ±20,1	54,4 ±6,9	88,9 ±9,4
Конъюгат производного СА GLP-2 RK (10К PEG) пролонгированного действия	1329137,5 ±215962,4	12085,8 ±1970,7	32,0 ±13,9	58,6 ±1,8	86,9 ±3,7
Конъюгат производного СА GLP-2 RK (3,4К PEG) пролонгированного действия	1058834,3 ±177030,1	12607,7 ±4030,1	13,3 ±9,2	37,0 ±2,2	71,7 ±11,2

- AUC<sub>last</sub>: ФК параметр, который отображает уровень воздействия лекарственного средства *in vivo*, и тесно связан с эффективностью/токсичностью лекарственных средств (чтобы лекарственные средства были эффективны *in vivo*, следует рассматривать определенный уровень воздействия лекарственного средства *in vivo*; избыточный уровень воздействия лекарственного средства *in vivo* может указывать на токсический эффект);

- MRT<sub>last</sub>: отражает среднее время удерживания лекарственных средств в организме, которое представляет собой среднее время до элиминации лекарственного средства из организма. Более высокие значения MRT указывают, что лекарственные средства находятся в организме в течение более длительного времени по сравнению с лекарствами, которые имеют более низкие значения MRT.

### **Пример 6. Сравнение фармакокинетики конъюгата производного GLP-2 пролонгированного действия и тедуглутида у крыс SD**

Сравнивали фармакокинетику тедуглутида и конъюгата производного GLP-2 пролонгированного действия. Нормальных крыс в возрасте 8 недель распределяли в группу, получавшую тедуглутид (2,5 мг/кг), и группу, получавшую конъюгат производного SA GLP-2 RK (3,4К PEG) пролонгированного действия (0,705 мг/кг). Исследуемые вещества вводили однократно путем подкожной инъекции нормальным крысам каждой группы (3 крысы/группу). Затем через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 часа брали образцы цельной крови из хвостовой вены у животных из группы, получавшей тедуглутид, и через 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 и 336 ч у животных группы, получавшей конъюгат производного SA GLP-2 RK пролонгированного действия. Цельную кровь помещали в микропробирки объемом 1,5 мл, центрифугировали при комнатной температуре при 5000 об/мин в течение 10 минут и затем отделяли сыворотку и хранили при -20°C. Для определения концентраций в хранившейся сыворотке каждой группы использовали метод ELISA. Для тедуглутида использовали набор GLP-2 ELISA (Alpco, #48-GP2HU-E01.1). Для конъюгата производного SA GLP-2 RK меченое биотином поликлональное антитело к GLP-2 (Phoenix Pharmaceuticals, #B-028-14) иммобилизовали на планшете, покрытом стрептавидином (Roche, #11645692001), и затем оставляли прореагировать с сывороткой в течение 1 ч. После отмывания добавляли антитело к человеческому IgG4, конъюгированное с пероксидазой хрена (Alpha Diagonosis, #10124), и оставляли прореагировать при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем проводили цветную реакцию с использованием реагента ТМВ и измеряли абсорбцию при длине волны 450 нм. С использованием концентраций в сыворотке рассчитывали параметры фармакокинетики.

В результате подтвердили, что показатели AUC и периоды полувыведения конъюгата производного SA GLP-2 RK пролонгированного действия существенно превосходили таковые тедуглутида. Результаты показаны на Фиг. 3 и в Таблице 4.

Таблица 4. Параметры фармакокинетики тедуглутида и конъюгата производного GLP-2 пролонгированного действия

Производное GLP-2	AUC <sub>last</sub> (нг×ч/мл)	C <sub>max</sub> (нг/мл)	T <sub>max</sub> (ч)	T <sub>1/2</sub> (ч)	MRT <sub>last</sub> (ч)
Тедуглутид	2596,6 ±580,7	1675,5 ±744,0	0,7 ±0,3	0,6 ±0,1	1,4 ±0,1
Конъюгат производного СА GLP-2 RK пролонгированного действия	199738,9 ±28544,5	2442,1 ±392,6	24,0 ±0,0	42,3 ±3,4	71,1 ±3,1

**Пример 7. Подтверждение эффекта увеличения массы кишечника нормальных мышей *in vivo* под воздействием конъюгата производного GLP-2 пролонгированного действия**

Эффект увеличения массы кишечника *in vivo* под воздействием тедуглутида и конъюгата производного GLP-2 пролонгированного действия исследовали на нормальных мышах.

Мышей C57BL/6 в возрасте 7 недель распределяли в группу, получавшую носитель, группу, получавшую тедуглутид (7,5 и 15 нмоль/кг дважды в сутки), и группу, получавшую конъюгат производного СА GLP-2 RK (3,4К PEG) пролонгированного действия (4,15, 7,5, 15, 30 нмоль/кг через день). В каждой группе было пять мышей, аутопсии проводили через 13 дней после введения. Осуществляли перфузию тонкого кишечника и измеряли массу тонкого кишечника и длину ворсинок тонкого кишечника.

В результате, и в группе, получавшей тедуглутид, и в группе, получавшей конъюгат производного СА GLP-2 RK пролонгированного действия, масса тонкого кишечника увеличивалась дозозависимым образом (Фиг. 4А), и на том основании, что увеличение массы кишечника связано с увеличением длины ворсинок (Фиг. 4В), заключили, что увеличение массы тонкого кишечника является следствием увеличения длины ворсинок. Эффект тедуглутида в высокой дозе (15 нмоль/кг/дважды в сутки), которая, как известно, соответствует его максимальной эффективности, был сопоставим с эффектом конъюгата производного СА GLP-2 RK пролонгированного действия в низкой дозе (4,15 нмоль/кг/через день), что подтверждало, что конъюгат производного СА GLP-2 RK пролонгированного действия оказывал дозозависимое действие, превосходящее максимальную эффективность тедуглутида. Результаты показаны на Фиг. 4.

На основании вышеизложенного специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение, поймут, что возможны и другие воплощения данного изобретения, без изменения технической концепции или существенных признаков данного изобретения. В этой связи, приведенные в качестве примера воплощения служат исключительно для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Напротив, данное изобретение охватывает не только приведенные в качестве примера воплощения, но также и различные альтернативы, модификации, эквиваленты и другие воплощения, которые могут соответствовать идее данного изобретения и входить в его объем, определяемый прилагаемой формулой изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат глюкагон-подобного пептида-2 (GLP-2), где производное GLP-2 и Fc область иммуноглобулина ковалентно соединены через непептидный полимер по обоим концам непептидного полимера, и

где непептидный полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

2. Конъюгат GLP-2 по п. 1, где производное GLP-2 содержит аминокислотную последовательность следующей общей формулы 1:

Общая Формула 1

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

где в вышеуказанной формуле

$X_1$  представляет собой гистидин, имидазоацетилдезгистидин, дезаминогистидин,  $\beta$ -гидроксиимидазопропионилдезгистидин, N-диметилгистидин или  $\beta$ -карбоксиимидазопропионилдезгистидин;

$X_2$  представляет собой аланин, глицин или 2-аминоизомасляную кислоту (Aib);

$X_{30}$  представляет собой лизин или аргинин, и

$X_{34}$  отсутствует или представляет собой лизин, аргинин, глутамин, гистидин, 6-азидо-лизин или цистеин;

при условии, что любая последовательность, идентичная аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 в общей формуле 1, исключена.

3. Конъюгат GLP-2 по п. 2, где (1)  $X_2$  представляет собой глицин, (2)  $X_{30}$  представляет собой аргинин, или (3)  $X_2$  представляет собой глицин и  $X_{30}$  представляет собой аргинин.

4. Конъюгат GLP-2 по п. 2 или п. 3, где

(1)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин, и  $X_{34}$  представляет собой цистеин;

(2)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой лизин;

(3)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой

глицин, X<sub>30</sub> представляет собой аргинин и X<sub>34</sub> представляет собой лизин;

(4) X<sub>1</sub> представляет собой имидазоацетилдезгистидин, X<sub>2</sub> представляет собой глицин, X<sub>30</sub> представляет собой лизин и X<sub>34</sub> представляет собой 6-азидо-лизин;

(5) X<sub>1</sub> представляет собой имидазоацетилдезгистидин, X<sub>2</sub> представляет собой глицин, X<sub>30</sub> представляет собой аргинин и X<sub>34</sub> представляет собой цистеин;

(6) X<sub>1</sub> представляет собой имидазоацетилдезгистидин, X<sub>2</sub> представляет собой Aib, X<sub>30</sub> представляет собой лизин и X<sub>34</sub> представляет собой цистеин; или

(7) X<sub>1</sub> представляет собой гистидин, X<sub>2</sub> представляет собой Aib, X<sub>30</sub> представляет собой лизин и X<sub>34</sub> представляет собой цистеин.

**5.** Конъюгат GLP-2 по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере один остаток производного GLP-2 представляет собой цистеин, лизин, аргинин, глутамин, гистидин или 6-азидо-лизин.

**6.** Конъюгат GLP-2 по любому из пп. 1-5, где производное GLP-2 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-8.

**7.** Конъюгат GLP-2 по любому из пп. 1-6, где один конец непептидного полимера конъюгирован с Fc областью иммуноглобулина, а другой его конец конъюгирован с гидроксильной группой, тиоловой группой, аминогруппой или азидной группой производного GLP-2.

**8.** Конъюгат GLP-2 по любому из пп. 1-7, где Fc область иммуноглобулина не гликозилирована.

**9.** Конъюгат GLP-2 по любому из пп. 1-8, где Fc область иммуноглобулина содержит шарнирный участок.

**10.** Конъюгат GLP-2 по любому из пп. 1-9, где Fc область иммуноглобулина представляет собой Fc область IgG4.

**11.** Производное GLP-2, содержащее аминокислотную последовательность следующей общей формулы 1:

Общая Формула 1

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>DGSFSDENMTILDNLAARDFINWLIQTX<sub>30</sub>ITDX<sub>34</sub> (SEQ ID NO: 9),

где в вышеуказанной формуле

X<sub>1</sub> представляет собой гистидин, имидазоацетилдезгистидин, дезаминогистидин, β-гидроксиимидазопропионилдезгистидин, N-диметилгистидин или β-карбоксиимидазопропионилдезгистидин;

$X_2$  представляет собой аланин, глицин или 2-аминоизомасляную кислоту (Aib);

$X_{30}$  представляет собой лизин или аргинин, и

$X_{34}$  отсутствует или представляет собой лизин, аргинин, глутамин, гистидин, 6-азидо-лизин или цистеин;

при условии, что любая последовательность, идентичная аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 в общей формуле 1, исключена.

**12.** Производное GLP-2 по п. 11, где (1)  $X_2$  представляет собой глицин, (2)  $X_{30}$  представляет собой аргинин, или (3)  $X_2$  представляет собой глицин, а  $X_{30}$  представляет собой аргинин.

**13.** Производное GLP-2 по п. 11 или п. 12, где:

(1)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин;

(2)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой лизин;

(3)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой аргинин и  $X_{34}$  представляет собой лизин;

(4)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой 6-азидо-лизин;

(5)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой глицин,  $X_{30}$  представляет собой аргинин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин;

(6)  $X_1$  представляет собой имидазоацетилдезгистидин,  $X_2$  представляет собой Aib,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин; или

(7)  $X_1$  представляет собой гистидин,  $X_2$  представляет собой Aib,  $X_{30}$  представляет собой лизин и  $X_{34}$  представляет собой цистеин.

**14.** Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая производное GLP-2 по любому из пп. 11-13.

**15.** Рекombинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 14.

**16.** Трансформант, содержащий рекombинантный экспрессионный вектор по п. 15.

**17.** Способ получения производного GLP-2, как оно определено в любом из пп. 11-13, включающий:

а) культивирование трансформанта, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую производное GLP-2 по любому из пп. 11-13, для экспрессии производного

GLP-2, и

б) выделение и очистку экспрессированного производного GLP-2.

**18.** Способ получения конъюгата GLP-2, включающий:

(а) получение комплекса путем взаимодействия непептидного полимера, имеющего две или более концевых реакционноспособных группы, с одним из производного GLP-2 по любому из пп. 11-13 и Fc области иммуноглобулина, так чтобы в данном комплексе производное GLP-2 или Fc область иммуноглобулина были присоединены к одному концу непептидного полимера, а реакционноспособная группа была на другом конце; и

(б) получение конъюгата путем взаимодействия комплекса, полученного на стадии (а), с одним из Fc области иммуноглобулина и производного GLP-2, не присоединенных к комплексу, так чтобы производное GLP-2 и Fc область иммуноглобулина были соединены через непептидный полимер.

**19.** Способ по п. 18, где непептидный полимер содержит одну или более чем одну реакционноспособную группу, выбранную из группы, состоящей из альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного.

**20.** Способ по п. 19, где сукцинимидное производное представляет собой сукцинимидилкарбоксиметил, сукцинимидилвалерат, сукцинимидилметилбутаноат, сукцинимидилметилпропионат, сукцинимидилбутаноат, сукцинимидилпропионат, N-гидроксисукцинимид или сукцинимидилкарбонат.

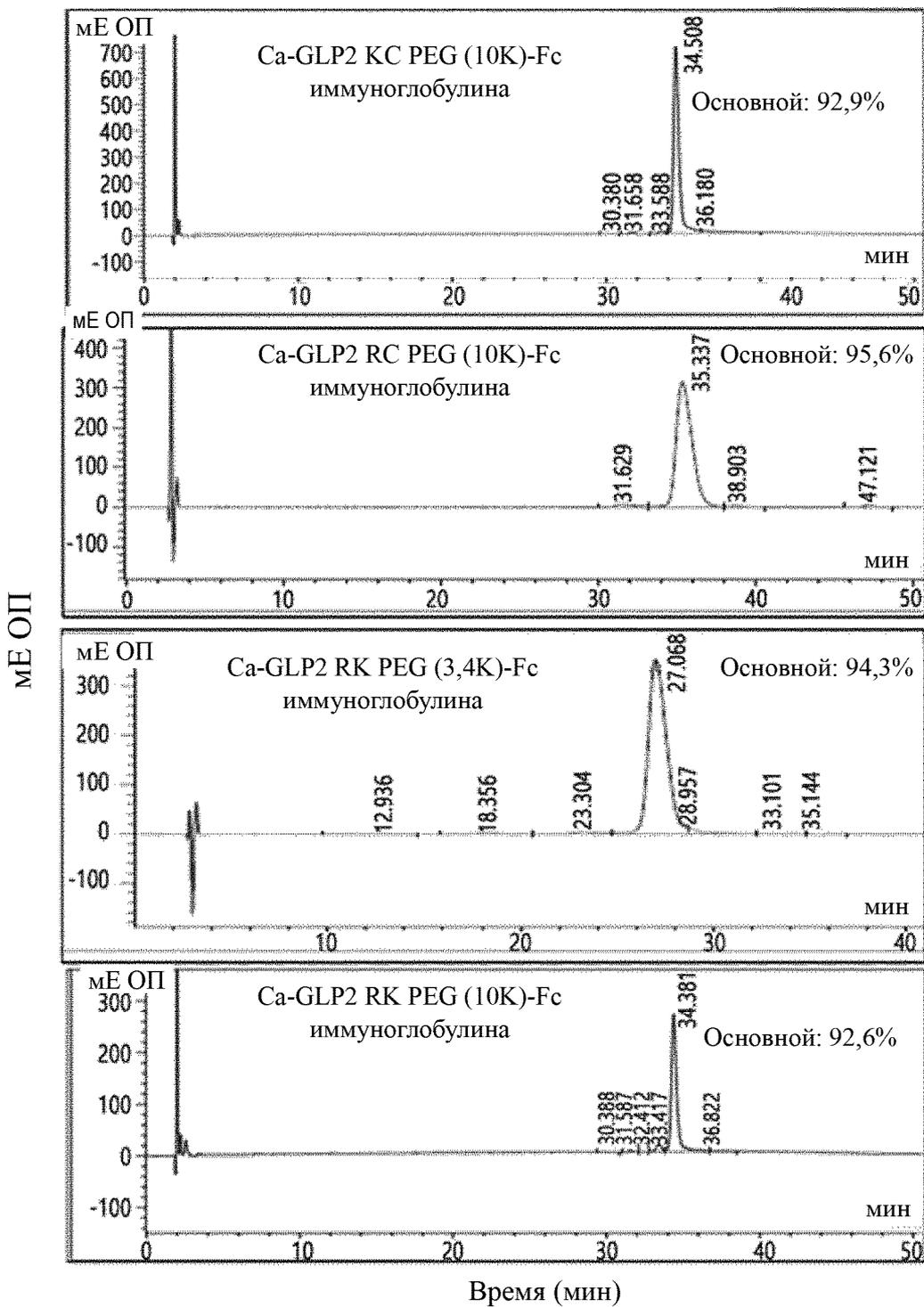
**21.** Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения одного или более чем одного заболевания, выбранного из заболевания кишечника, повреждения кишечника и гастропатии, содержащая конъюгат GLP-2 по любому из пп. 1-10 или производное GLP-2 по любому из пп. 11-13.

**22.** Фармацевтическая композиция по п. 21, где заболевание кишечника представляет собой синдром короткого кишечника, синдром раздраженного кишечника, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, колонит, колит, панкреатит, илеит, мукозит или атрофию кишечника.

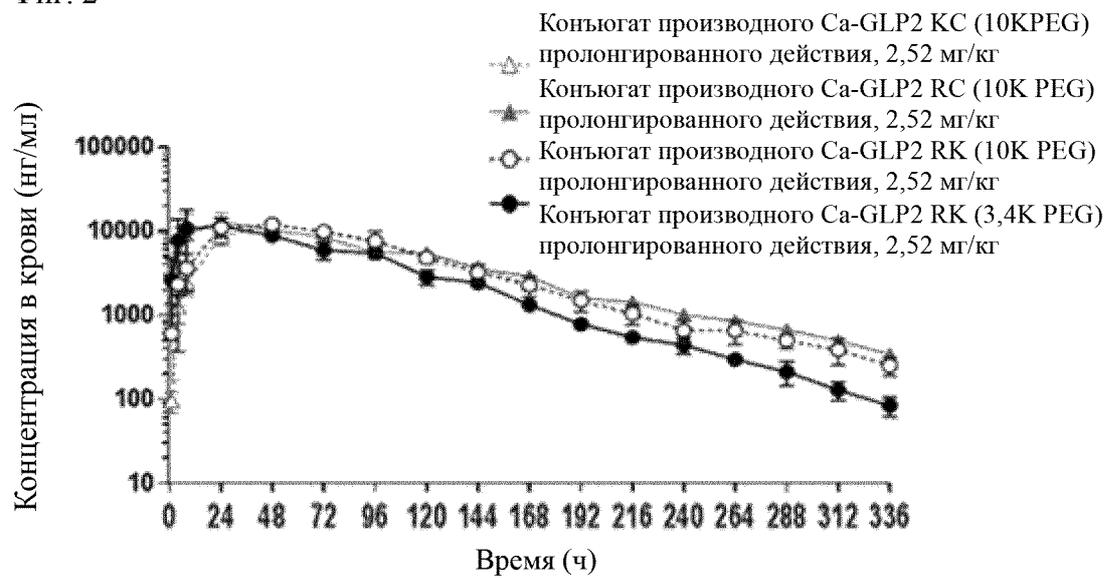
**23.** Фармацевтическая композиция по п. 21, где гастропатия представляет собой желудочные колики, гастрит, язву желудка, дуоденит или язву двенадцатиперстной кишки.

Фиг. 1

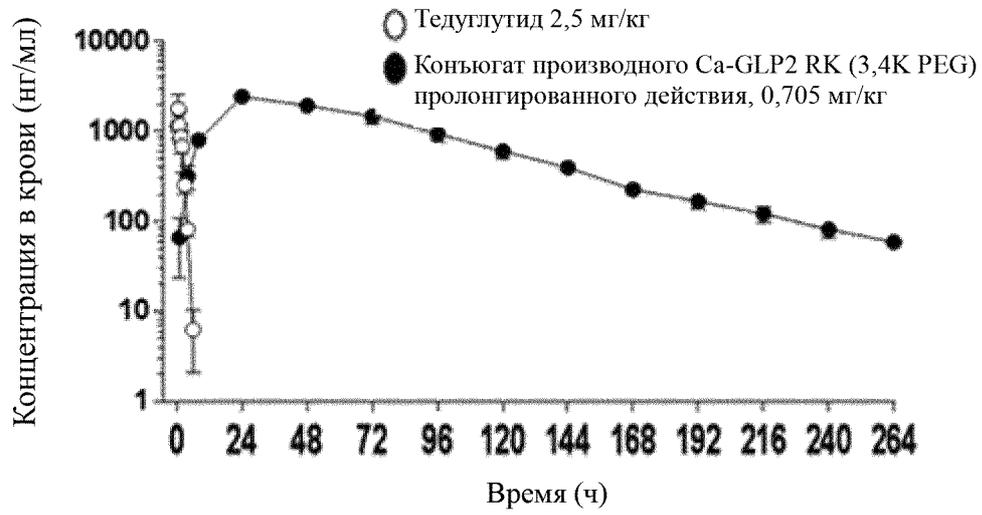
ВЭЖХ с обращенной фазой



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

