

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 805**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2012 PCT/KR2012/011748**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13100704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2012 E 12861579 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2797621**

54 Título: **Un conjugado de GLP-2 de sitio específico que usa un fragmento de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

30.12.2011 KR 20110147684

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.09.2019

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SEUNG SU;
LIM, SE YOUNG;
JUNG, SUNG YOUB y
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 725 805 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un conjugado de GLP-2 de sitio específico que usa un fragmento de inmunoglobulina

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un conjugado de péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2) de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjuntas; un método para preparar el conjugado de GLP-2; una composición farmacéutica que comprende el mismo; y el conjugado de GLP-2 para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades
10 intestinales, lesiones intestinales o gastrosis mediante el uso del mismo.

[Técnica antecedente]

El péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2) es una hormona peptídica de 33 aminoácidos que se produce por la célula L
15 endocrina intestinal tras la ingestión de nutrientes. La GLP-2 estimula el crecimiento de la mucosa en el intestino delgado y el intestino grueso (DG Burrin et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279(6): G1249-1256, 2000) y suprime la apoptosis de las células intestinales y las células de la cripta (Bernardo Yusta et al., Gastroenterology 137(3): 986-996, 2009). Además, el GLP-2 mejora la absorción de nutrientes en el intestino delgado (PALLE BJ et al., Gastroenterology 120: 806-815, 2001) y reduce la permeabilidad intestinal (Cameron HL et al., Am J Physiol
20 Gastrointest Liver Physiol 284(6): G905-12, 2003). Además, el GLP-2 suprime el vaciamiento gástrico y la secreción de ácido gástrico (Meier JJ et al., Gastroenterology 130(1): 44-54, 2006), aumentando al mismo tiempo el caudal sanguíneo intestinal (Bremholm L et al., Scand J Gastroenterol. 44(3): 314-9, 2009) y relaja el músculo liso intestinal (Amato A et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 296(3): G678-84, 2009).

25 Dado que el GLP-2 tiene capacidad para absorber y proteger la energía y activar la función de las células intestinales, ha demostrado un alto potencial terapéutico en diversos modelos *in vivo* de enfermedades y lesiones intestinales. Como hormona para regular la absorción de nutrientes, el GLP-2 es un agente terapéutico muy prometedor para el tratamiento del síndrome del intestino corto (SBS). El SBS es causado por una causa congénita o adquirida, tal como la extirpación quirúrgica del intestino, y conduce a deficiencias nutricionales debido a la
30 disminución en el área de absorción del intestino delgado. Se ha informado que el GLP-2 mejora la absorción y absorción de nutrientes en el tracto digestivo en modelos de ratas que tienen SBS (Ljungmann K et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 281(3): G779-85, 2001).

Además, la enfermedad de Crohn es una enfermedad intestinal inflamatoria crónica que puede ser causada en
35 cualquier región del tracto digestivo que va desde la boca hasta el ano. La causa de la enfermedad de Crohn aún no se conoce, pero se cree que está causada por una respuesta inflamatoria excesiva del cuerpo hacia las células bacterianas que normalmente se encuentran en el tracto digestivo junto con razones ambientales y genéticas. Se sabe que el GLP-2 puede prevenir o aliviar el daño en las células epiteliales de la mucosa cuando la mucositis, la colitis o la enfermedad inflamatoria intestinal se desarrolla por quimioterapia o por razones genéticas (Qiang Xiao et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 278(4): R1057-R1063, 2000).
40

La diarrea inducida por quimioterapia (CID) es uno de los factores que limitan la dosis de un agente anticanceroso y es el efecto secundario más común de la quimioterapia contra el cáncer. Aproximadamente el 10% de los pacientes tenían cáncer avanzado. Aproximadamente el 80% de los pacientes con cáncer avanzado que recibieron una terapia
45 única/combinada de 5-FU (5-fluorouracilo, Adrucil)/irinotecán (Camptosar) experimentaron CID y aproximadamente el 30% de ellos mostraron síntomas de diarrea grave de grado 3 a 5. Además, si se produce mucositis o neutropenia simultáneamente en los pacientes con CID, existe un posible riesgo de muerte. En los modelos de rata inducidos por CID, el GLP-2 muestra el efecto de aliviar la reducción del peso del intestino, la altura de las vellosidades y la profundidad de la cripta que se inducen por 5-FU, lo que demuestra su potencial terapéutico para el tratamiento de
50 CID (A. Tavakkolizadeh et al., J Surg Res. 91(1): 77-82, 2000).

A pesar de este alto potencial terapéutico, el GLP-2 todavía tiene limitaciones en el desarrollo de un fármaco comercial. Los péptidos, tal como el GLP-2, pueden transformarse fácilmente debido a la baja estabilidad, pueden degradarse por la proteasa en el cuerpo y perder actividad, y se eliminan fácilmente a través del riñón debido a su
55 tamaño relativamente pequeño. Por lo tanto, para mantener las concentraciones sanguíneas óptimas y los títulos de los fármacos peptídicos, existe la necesidad de administrar el fármaco peptídico con mayor frecuencia. Sin embargo, la mayoría de los fármacos peptídicos se administran en diversos tipos de inyecciones, y se requieren inyecciones frecuentes para mantener la concentración en sangre del fármaco peptídico, lo que causa un dolor grave en los pacientes. A este respecto, ha habido muchos intentos de resolver estos problemas, uno de los cuales ha

desarrollado un método para aumentar la permeabilidad de la membrana de un fármaco peptídico, lo que lleva a la administración del fármaco peptídico al cuerpo a través de una vía oral o nasal. Pero este método tenía una limitación de una baja eficacia de administración del fármaco peptídico en comparación con la inyección del mismo, y por lo tanto, sigue siendo difícil retener suficiente actividad biológica del fármaco peptídico para uso terapéutico.

5

En particular, el GLP-2 tiene una semivida *in vivo* extremadamente corta (7 minutos o menos) debido a su inactivación por la dipeptidil peptidasa-IV (DPP IV) que se escinde entre los aminoácidos en la posición 2 (Ala) y en la posición 3 (Asp) de GLP-2 (Bolette H. et al., The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 85(8): 2884-2888, 2000). Se ha intentado aumentar la semivida *in vivo* del GLP-2 mediante la sustitución de aminoácidos.

10

Actualmente, NPS Pharmaceuticals Inc. (EE.UU.) está desarrollando como agente terapéutico para la enfermedad de Crohn, SBS y enfermedad gastrointestinal un análogo de GLP-2, "Teduglutida", en el que el aminoácido en la posición 2 (Ala) del GLP-2 nativo se sustituye con asparaginas (Asp). La Teduglutida es resistente a la escisión por DPPIV a través de la sustitución del aminoácido en la posición 2, que a su vez aumenta la estabilidad y la eficacia.

15

Sin embargo, dado que el aumento en la resistencia a la escisión por DPPIV es insuficiente para extender la semivida *in vivo* de la Teduglutida. Por lo tanto, la teduglutida también debe administrarse mediante inyección una vez al día, lo que sigue siendo una gran carga para el paciente (documento WO 2005/067368).

Zealand Pharma (Dinamarca) está desarrollando actualmente análogos de GLP-2 mediante la sustitución de uno o más aminoácidos en las posiciones 3, 8, 16, 24, 28, 31, 32 y 33 del GLP-2 nativo. Estas sustituciones no solo mejoran la estabilidad y la eficacia del péptido, sino que también permiten el tratamiento selectivo de los síntomas al hacer que la actividad promotora del crecimiento sea más alta en el intestino delgado con respecto al colon dependiendo de la posición de sustitución, o viceversa. Además, Zealand Pharma está desarrollando Elsigliutida (ZP1846) como un análogo de GLP-2 dirigido a la mucositis gastrointestinal (GI) y CID, y la Elsigliutida se encuentra en un ensayo clínico de Fase I. Sin embargo, el análogo anterior tampoco tiene suficiente semivida *in vivo* y, por lo tanto, debe administrarse mediante inyección una vez al día (documento WO 2006/117565).

El polietilenglicol (PEG) se une no específicamente a un sitio específico o diversos sitios de un péptido diana y aumenta su peso molecular, previniendo de este modo la depuración renal y la hidrólisis del péptido diana sin causar ningún efecto secundario. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.179.337 describe un método para unir calcitonina con PEG para mejorar la semivida *in vivo* y la permeabilidad de la membrana de la calcitonina. El documento WO 2006/076471 describe un método para aumentar la semivida *in vivo* de un péptido natriurético de tipo B (BNP), que se ha utilizado como un agente terapéutico para la insuficiencia cardíaca congestiva, mediante la unión con PEG. Además, la Patente de Estados Unidos N.º 6.924.264 divulga un método para aumentar la semivida *in vivo* de la exendina-4 mediante la unión de PEG con un residuo de lisina del mismo. Aunque estos métodos pueden extender la semivida *in vivo* de los fármacos peptídicos al aumentar el peso molecular del PEG a unir con los mismos, hay varios problemas en que, a medida que aumenta el peso molecular del PEG, el título del fármaco peptídico se reduce y la reactividad del PEG con el fármaco peptídico también disminuye, lo que lleva a la reducción del rendimiento.

40

El documento de patente WO 02/46227 describe un método para preparar una proteína de fusión de GLP-1, exendina-4 o un análogo de la misma con albúmina de suero humano o una región Fc de inmunoglobulina. La Patente de Estados Unidos N.º 6.756.480 también describe un método para preparar una proteína de fusión de una hormona paratiroidea (PTH) o un análogo de la misma con una región Fc de inmunoglobulina. Estos métodos pueden superar los problemas de pegilación, tal como el bajo rendimiento y la no especificidad, pero el efecto de aumentar la semivida *in vivo* del péptido farmacológico no es perceptible como se esperaba, y algunas veces sus títulos también son bajos. Con el fin de maximizar el efecto de aumentar la semivida *in vivo* de un péptido farmacológico, se pueden usar diversos tipos de conectores peptídicos, pero existe el riesgo de inducir una respuesta inmunológica. Además, si se usa un fármaco peptídico que tiene un enlace disulfuro, tal como BNP, existe una alta probabilidad de plegamiento incorrecto. Finalmente, si se emplea un fármaco peptídico que incluye aminoácidos de origen sintético, es imposible producir su proteína de fusión por recombinación genética.

45

El documento de patente WO 2010/107256 A2 divulga un conjugado de GLP-2 que comprende un derivado de GLP-2 unido covalentemente a un fragmento de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico.

55

En el estudio anterior, los presentes inventores han desarrollado un método para preparar un conjugado de GLP-2 con una semivida *in vivo* extendida, en la que el conjugado de GLP-2 se prepara uniendo covalentemente el GLP-2 o su derivado a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico. En este método, los derivados de GLP-2, tal como beta-hidroxi-imidazo-propionil GLP-2, donde el grupo amina N-terminal de GLP-2 está

sustituido con un grupo hidroxilo, des-amino-histidil GLP-2, donde se elimina el grupo amina N-terminal del mismo, y un imidazo-acetil-GLP-2, donde se eliminan el carbono alfa de la primera histidina y el grupo amina N-terminal unidos al mismo, mostraron una mayor resistencia a la escisión de DPPIV mientras se mantenían sus bioactividades y, por lo tanto, las semividas *in vivo* de los conjugados de GLP-2 aumentaron notablemente.

5 Sin embargo, en el caso en el que el fragmento Fc de inmunoglobulina estaba unido específicamente al sitio al residuo de lisina de estos derivados de GLP-2, los conjugados de GLP-2 obtenidos de este modo mostraron una afinidad de unión significativamente reducida al receptor de GLP-2 y, por lo tanto, tenían el problema de que la eficacia *in vivo* y la duración del mismo se redujeron.

10 A la luz de investigar un método que puede aumentar la semivida *in vivo* de GLP-2 en sangre y maximizar la duración de la eficacia *in vivo*, los presentes inventores han desarrollado un conjugado de GLP-2 conjugando un derivado de GLP-2 en el cual se introduce un grupo tiol en su extremo C-terminal en un polímero no peptídico y un fragmento Fc de inmunoglobulina mediante enlace covalente, y se encontró que el conjugado de GLP-2 presenta
15 una afinidad de unión aumentada al receptor de GLP-2 y una duración mejorada notablemente de la eficacia *in vivo*. En particular, se ha encontrado que cuando el polímero no peptídico y el fragmento Fc de inmunoglobulina se unen específicamente en el sitio al residuo de cisteína introducido en el extremo C-terminal de un imidazo-acetil-GLP-2 donde el carbono α de la primera histidina y el grupo amina N-terminal unido al mismo se eliminan, lo que lleva a un aumento de la resistencia a DPPIV, la eficacia *in vitro* del conjugado de imidazoacetil-GLP-2 aumenta
20 significativamente.

[Divulgación]

[Problema técnico]

25 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un conjugado de GLP-2 que tenga una eficacia y estabilidad terapéuticas mejoradas *in vivo*.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar el conjugado de GLP-2.

30 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprenda el conjugado de GLP-2 como principio activo para la prevención o el tratamiento de enfermedades intestinales, lesiones intestinales o gastrostis.

35 [Solución técnica]

En un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2) definido por el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar el conjugado de GLP-2 de acuerdo con la presente invención de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado de GLP-2 de acuerdo con la presente invención como un principio activo para prevenir o tratar una o más
45 enfermedades seleccionadas de una enfermedad intestinal, lesión intestinal y gastrostis.

También se describe un método para prevenir o tratar una o más enfermedades seleccionadas de enfermedad intestinal, lesión intestinal y gastrostis, que comprende administrar el conjugado de GLP-2 de la presente invención a un paciente que lo necesite.

50

[Efectos ventajosos]

El conjugado de GLP-2 de la presente invención tiene una afinidad de unión notablemente alta por un aceptor de GLP-2, mostrando de este modo una eficacia terapéutica *in vivo* de larga duración y una semivida *in vivo*
55 prolongada. Por lo tanto, el conjugado de GLP-2 de la presente invención se puede usar eficazmente para el tratamiento o la prevención de enfermedad intestinal, lesión intestinal o gastrostis con una frecuencia de administración notablemente baja.

[Descripción de los dibujos]

La Figura 1 muestra el perfil de purificación de un conjugado de CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-Fc de inmunoglobulina, que se purifica usando una columna Source Phe.

5 La Figura 2 muestra el perfil de purificación de un conjugado de CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-Fc de inmunoglobulina, que se purifica usando una columna Source 15Q.

La Figura 3 muestra el perfil de purificación de un conjugado de CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-Fc de inmunoglobulina, que se purifica usando una columna Source ISO.

La Figura 4 muestra los resultados del análisis por HPLC de fase inversa para analizar la pureza de un conjugado de CA GLP-2(A2G, 34C)-10K PEG-Fc de inmunoglobulina.

10 La Figura 5 muestra los resultados *in vitro* de la medición de las afinidades de unión a un receptor de GLP-2 del derivado de GLP-2 y un GLP-2 nativo.

[Mejor modo]

15 En un aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un conjugado de péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2) de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento, el término "péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2)" se refiere a una hormona que es secretada por el intestino delgado, generalmente promueve la biosíntesis y secreción de insulina, inhibe la secreción de glucagón, y promueve la absorción de glucosa en las células. El GLP-2 tiene la función de tratar o 20 prevenir enfermedades intestinales, lesiones intestinales o gastrosis a través de la unión a un receptor de GLP-2. El GLP-2 consiste en 33 aminoácidos, siendo la secuencia de aminoácidos de GLP-2 nativo la siguiente:

GLP-2(1-33)

25 HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (SEQ ID NO: 1)

El GLP-2 de la presente invención incluye una forma nativa de GLP-2, o su derivado como se define en las reivindicaciones. También se divulgan agonistas, derivados, fragmentos o variantes de GLP-2 y similares.

30 Como se usa en el presente documento, el término "agonista de GLP-2" se refiere a una sustancia que puede unirse a un receptor de GLP-2 independientemente de su similitud estructural con GLP-2 e inducir la misma actividad fisiológica o similar a la de GLP-2 nativo.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento de GLP-2" se refiere a un péptido que tiene uno o más aminoácidos añadidos o eliminados del extremo N-terminal o C-terminal del GLP-2 nativo, en el que el 35 aminoácido añadido puede ser un aminoácido de origen sintético (por ejemplo, D-aminoácido).

El GLP-2 de la presente invención incluye uno que tiene un grupo tiol introducido en su extremo C-terminal, en el que el grupo tiol puede introducirse añadiendo un residuo de cisteína al extremo C-terminal de GLP-2.

40 Como se usa en el presente documento, el término "variante de GLP-2" se refiere a un péptido que tiene uno o más aminoácidos diferentes de los del GLP-2 nativo. Para esto, puede inducirse la sustitución con un aminoácido de origen sintético, así como un aminoácido de origen natural.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado de GLP-2" se refiere a un péptido que tiene al menos un 80% de homología de secuencia de aminoácidos en comparación con la de GLP-2 nativo, y a un péptido en el 45 que una porción de residuos de aminoácidos pueden estar químicamente sustituidos (por ejemplo, alfa-metilación, alfa-hidroxilación), eliminados (por ejemplo, desaminación), o modificados (por ejemplo, N-metilación). El derivado de GLP-2 se puede preparar por sustitución, eliminación o modificación del extremo N-terminal del GLP-2 nativo, y se puede seleccionar del grupo que consiste en péptidos, fragmentos y variantes del mismo que poseen la función 50 de GLP-2.

Preferiblemente, el derivado de GLP-2 de la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en:

55 un imidazoacetil-GLP-2 (CA-GLP2) donde se eliminan un carbono α del primer residuo de histidina en el extremo N-terminal de GLP-2 nativo y un grupo amina N-terminal unido al mismo;

un des-amino-histidil GLP-2 (DA-GLP2), donde se elimina un grupo amina N-terminal de GLP-2 nativo;

un beta-hidroxi-imidazo-propionil GLP-2 (OH-GLP-2), donde un grupo amina N-terminal de GLP-2 nativo está sustituido con un grupo hidroxilo;

un dimetil histidil GLP-2 (DM-GLP-2), donde un grupo amina N-terminal de GLP-2 nativo se modifica con

respecto a un grupo dimetilo; y
un beta-carboxi-imidazo-propionil GLP-2 (CX-GLP2), donde un grupo amina N-terminal de GLP-2 nativo está sustituido con un grupo carboxilo.

5 Incluso más preferiblemente, el derivado de GLP-2 puede ser un CA-GLP-2 en el que el carbono α del primer aminoácido N-terminal, la histidina de GLP-2 nativo y el grupo amina N-terminal unido al mismo se eliminan.

En una forma de realización preferida, el GLP-2, o sus derivados, de la presente invención puede ser el péptido en el que se introduce un residuo de cisteína en el extremo C-terminal del GLP-2 nativo, el carbono α del extremo N-terminal del mismo y un grupo amina unido al mismo se eliminan, y opcionalmente, el segundo aminoácido, alanina, está sustituido con glicina.

El GLP-2 nativo y los derivados de GLP-2 de acuerdo con la presente invención pueden sintetizarse usando un método de síntesis en fase sólida o tecnología de recombinación.

15 Como se usa en el presente documento, el término "polímero no peptidilo" se refiere a un polímero biocompatible que incluye al menos dos unidades de repetición que están unidas entre sí por cualquier enlace covalente distinto de un enlace peptídico. El polímero no peptidilo adecuado para la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables tales como ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos, y el preferido es polietilenglicol. Además, el alcance del polímero no peptidilo en la presente invención incluye derivados de los polímeros enumerados anteriormente que se conocen bien en la técnica o pueden prepararse fácilmente por un experto en la técnica.

25 Los conectores peptídicos usados en una proteína de fusión que se prepara mediante un método de fusión en marco convencional tienen la desventaja de que pueden escindir-se fácilmente por una enzima proteolítica, y por lo tanto, es difícil obtener un aumento significativo en la semivida *in vivo* de un polipéptido fisiológicamente activo debido al uso de un vehículo. Sin embargo, la presente invención emplea un polímero que tiene una resistencia a tal enzima proteolítica y, por lo tanto, la semivida *in vivo* de un polipéptido fisiológicamente activo se puede mantener para que sea similar a la de un vehículo.

Por lo tanto, cualquier polímero no peptidilo se puede usar en la presente invención sin limitación siempre que sea un polímero que tenga una resistencia a la enzima proteolítica. El polímero no peptidilo adecuado para la presente invención tiene un peso molecular en el intervalo de 1 a 100 kDa, y preferiblemente en el intervalo de 1 a 20 kDa. Además, el polímero no peptidilo de la presente invención que está unido al fragmento Fc de inmunoglobulina puede consistir en un tipo de polímero o combinación de diferentes tipos de polímeros.

El polímero no peptidilo de la presente invención tiene un grupo reactivo terminal que puede unirse al fragmento Fc de inmunoglobulina y al fármaco peptídico en ambos extremos del mismo. El grupo reactivo terminal en ambos extremos del polímero no peptidilo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un grupo aldehído reactivo, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida se puede ilustrar por propionato de succinimidilo, hidroxisuccinimidilo, succinimidil carboximetilo y carbonato de succinimidilo. Los grupos reactivos terminales en ambos extremos del polímero no peptidilo pueden ser iguales o pueden ser diferentes entre sí. Por ejemplo, el polímero no peptidilo puede poseer un grupo maleimida en un extremo terminal del mismo y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo terminal del mismo. En el caso de que se usa polietilenglicol (PEG) que tiene un grupo hidroxilo en ambos extremos como un polímero no peptidilo, el grupo hidroxilo se puede activar con respecto a diversos grupos reactivos a través de una reacción química convencional. Además, el PEG disponible comercialmente que tiene un grupo reactivo modificado se puede usar para preparar el conjugado GLP-2 de la presente invención.

En particular, cuando se emplea el polímero no peptidilo que tiene un grupo aldehído en un extremo y un grupo maleimida en el otro extremo, es posible minimizar la reacción no específica e inducir eficazmente la unión del GLP-2 o su derivado y el fragmento Fc de inmunoglobulina en cada extremo del polímero no peptidilo. Un producto final generado por un enlace aldehído a través de alquilación reductora es más estable que uno generado por un enlace amida. El grupo aldehído se une selectivamente al extremo N-terminal a niveles bajos de pH, pero a niveles altos de pH, tal como el pH 9,0, se une a un residuo de lisina para formar un enlace covalente.

En una forma de realización preferida, el polímero no peptídico de la presente invención puede tener un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído en el otro extremo, más preferiblemente puede ser un polietilenglicol que tiene un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído en el otro extremo.

5 En la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina (Ig) es adecuado para su uso como vehículo de fármaco porque se biodegrada *in vivo*. Además, el fragmento Fc es beneficioso en términos de preparación, purificación y rendimiento de un complejo con un fármaco peptídico porque tiene un peso molecular pequeño en relación con las moléculas de inmunoglobulina completas. Además, dado que se elimina la región Fab, que muestra una alta no homogeneidad debido a las diferencias en las secuencias de aminoácidos entre los anticuerpos, el
10 fragmento Fc tiene una homogeneidad de sustancia enormemente aumentada y un bajo potencial para inducir la antigenicidad sérica.

El término "vehículo", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia unida a un fármaco. Típicamente, un complejo que comprende un fármaco unido a un vehículo disminuye enormemente la actividad
15 fisiológica del fármaco. Sin embargo, con respecto a los objetos de la presente invención, se emplea un vehículo en la presente invención para minimizar la disminución en la actividad fisiológica de un fármaco de interés, unido al vehículo, y reducir la inmunogenicidad del vehículo, mejorando de este modo la estabilidad *in vivo* del fármaco. Para lograr estos objetos, la presente invención emplea un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico como vehículo.

20 Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina G (IgG)" significa colectivamente una proteína que participa en la inmunidad protectora del cuerpo actuando selectivamente contra los antígenos. Las inmunoglobulinas están compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Las cadenas ligeras y pesadas comprenden regiones variables y constantes. Existen cinco tipos distintos de cadenas
25 pesadas en función de las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: los tipos gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) y épsilon (ϵ), y las cadenas pesadas incluyen las siguientes subclases: gamma 1 (γ 1), gamma 2 (γ 2), gamma 3 (γ 3), gamma 4 (γ 4), alfa 1 (α 1) y alfa 2 (α 2). Además, hay dos tipos de cadenas ligeras basadas en las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: los tipos kappa (κ) y lambda (λ) (Coleman et al., *Fundamental Immunology*, 2ª Ed., 1989, 55-73). De acuerdo con las características de
30 las regiones constantes de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se clasifican en cinco isotipos: IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Se sabe que las inmunoglobulinas generan varios fragmentos estructuralmente diferentes, que incluyen Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, scFv, Fd y Fc. Entre los fragmentos de inmunoglobulina, Fab contiene las regiones variables de la
35 cadena ligera y la cadena pesada, la región constante de la cadena ligera y la primera región constante (CH1) de la cadena pesada, y tiene un único sitio de unión a antígeno. Los fragmentos F(ab') difieren de los fragmentos Fab en cuanto a que tienen la región bisagra que contiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C-terminal (término carboxilo) del dominio CH1 de cadena pesada. Los fragmentos F(ab')₂ se producen como un par de los fragmentos F(ab') por enlace disulfuro formado entre los residuos de cisteína de las regiones bisagra de los fragmentos F(ab').
40 Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene solo la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. Los fragmentos scfv (Fv monocatenarios) comprenden la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera que están unidas entre sí por un conector peptídico y, por lo tanto, están presentes en una única cadena polipeptídica. Además, los fragmentos Fd comprenden solo la región variable y el dominio CH1 de la cadena pesada.

45 Como se usa en el presente documento, el término "fragmento Fc de inmunoglobulina" se produce cuando una molécula de inmunoglobulina (Ig) se digiere con papaína, y es una región de una molécula de inmunoglobulina, excepto por la región variable (VL) y las regiones constantes (CL) de la cadena ligera y la región variable (VH) y la región constante 1 (CH1) de la cadena pesada. El fragmento Fc puede incluir además la región bisagra en la región
50 constante de cadena pesada. Además, el fragmento Fc puede ser sustancialmente idéntico a una forma nativa, o puede ser un fragmento Fc extendido que contiene una porción o la totalidad de la región constante de cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de cadena ligera 1 (CL1) siempre que tenga un efecto mejorado. Además, el fragmento Fc puede ser un fragmento que tiene una eliminación en una porción relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de CH2 y/o CH3. Un fragmento Fc preferido es un fragmento Fc derivado de IgG o IgM. Se prefiere
55 más un fragmento Fc derivado de IgG, y se prefieren particularmente los fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4.

El fragmento Fc modificado de acuerdo con la presente invención puede ser una combinación o híbrido de fragmentos Fc derivados de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. El término "combinación" significa un polipéptido dimérico o multimérico en el que los fragmentos Fc monocatenarios del mismo origen se unen a un fragmento Fc

monocatenario de un origen diferente para formar un dímero o multímero. El término "híbrido" significa un polipéptido en el que dos o más dominios de origen diferente están presentes en un fragmento Fc monocatenario. Por ejemplo, un híbrido puede estar compuesto por uno a cuatro dominios seleccionados de entre los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4 contenidos en Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4.

5

El fragmento Fc modificado de acuerdo con la presente invención puede derivarse de seres humanos u otros animales, incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, y preferiblemente seres humanos. El fragmento Fc derivado de seres humanos es preferible a un fragmento Fc derivado no humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunes no deseadas, tal como la

10

producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

El fragmento Fc modificado de acuerdo con la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos nativa y mutantes de secuencia (variantes) de los mismos. Un "mutante de secuencia de aminoácidos" significa que tiene una secuencia diferente debido a una eliminación, una inserción, una sustitución no conservadora o conservadora o

15

combinaciones de las mismas, de uno o más residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos nativa. Se conocen en la técnica intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos que generalmente no alteran la actividad de las proteínas o péptidos (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios que se producen más comunmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones.

20

Además, el fragmento Fc, si se desea, puede modificarse por fosforilación, sulfatación, acilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación.

La variante de aminoácidos puede ser un equivalente funcional que tenga una actividad biológica idéntica a una proteína nativa, o, si se desea, puede hacerse alterando la propiedad de la forma nativa. Por ejemplo, la variante

25

puede tener mayor estabilidad estructural contra el calor, pH, etc., o mayor alteración de la solubilidad y modificación de la secuencia de aminoácidos nativa de la misma. Por ejemplo, en un fragmento Fc de IgG, se pueden usar residuos de aminoácidos que se sabe que son importantes en la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331, como diana adecuada para la modificación. Además, son posibles diversos derivados diferentes, incluyendo uno en el que se elimina una región capaz de formar un enlace disulfuro, o se eliminan ciertos residuos

30

de aminoácidos en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa o se le añade un residuo de metionina. Además, para eliminar funciones efectoras, se puede producir una eliminación en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio ADCC. Se divulgan técnicas de preparación de dichos derivados de secuencia del fragmento Fc de inmunoglobulina en las publicaciones de patente internacional N.º WO97/34631 y WO96/32478.

35

El fragmento Fc modificado de acuerdo con la presente invención puede obtenerse a partir de una forma nativa aislada de seres humanos y otros animales, o puede obtenerse a partir de células animales transformadas o microorganismos mediante técnicas recombinantes.

El fragmento Fc modificado de acuerdo con la presente invención puede estar de forma que tenga cadenas de

40

azúcar nativas, cadenas de azúcar aumentadas en comparación con la forma nativa, o cadenas de azúcar reducidas en comparación con la forma nativa, o puede estar en una forma desglucosilada. Un fragmento Fc glucosilado tiene un alto riesgo de inducir respuestas inmunológicas debido a su mayor actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) que una forma aglucosilada. Por lo tanto, con respecto a los presentes objetos, se prefiere un fragmento Fc aglucosilado o desglucosilado.

45

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento Fc desglucosilado" se refiere a un fragmento Fc en el que los restos de azúcar se eliminan artificialmente y el término "fragmento Fc aglucosilado" significa un fragmento Fc que se produce en una forma no glucosilada por un procarionte, preferiblemente *E. coli*. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar del fragmento Fc se puede lograr mediante métodos comunes en la técnica,

50

tal como un método químico, un método enzimático y un método de ingeniería genética utilizando un microorganismo.

Un fragmento Fc recombinante tiene una sensibilidad enzimática aumentada debido a la diferencia en la estructura tridimensional de su forma nativa. Además, una IgG aglucosilada es altamente sensible a las enzimas proteolíticas

55

(pepsina, quimotripsina) cuando se compara con la IgG nativa (Morrison et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989). Un fragmento Fc recombinante tiene la misma afinidad de unión a FcRn que el Fc nativo producido por el tratamiento con papaína, pero el fragmento Fc nativo tiene una semivida en suero de 2 a 3 veces mayor que la del fragmento Fc recombinante (*Eur. J. Immunology* 29: 2819-2825, 1999). En el fragmento Fc modificado de acuerdo con la presente invención, un sitio de escisión enzimática está protegido por un polímero no péptido. Esta

protección evita que el fragmento Fc sea altamente sensible a las hidrolasas y que tenga una semivida *in vivo* reducida.

También se divulga un GLP-2 que se puede unir al polímero no peptídico en diversos sitios. Cuando el GLP-2 está unido al sitio distinto del extremo N-terminal que es importante para la actividad fisiológica del péptido, se puede introducir un grupo tiol reactivo en el residuo de aminoácido que se modificará en la secuencia de aminoácidos del GLP-2 nativo y después se puede formar un enlace covalente entre el grupo tiol de GLP-2 y un grupo maleimida o un grupo aldehído del polímero no peptídico.

10 Cuando se usa el grupo aldehído del polímero no peptídico, puede reaccionar con un grupo amino en el extremo N-terminal o el residuo de lisina. En este momento, se puede utilizar una forma modificada de GLP-2 para aumentar selectivamente el rendimiento de la reacción. Por ejemplo, es posible mantener solo un grupo amina capaz de reaccionar con el polímero no peptídico en el sitio deseado protegiendo el extremo N-terminal de GLP-2, sustituyendo el resto de lisina con otro aminoácido, e introduciendo un grupo amina en el extremo C-terminal del mismo, lo que
15 aumenta el rendimiento de la pegilación y la reacción de acoplamiento. Los métodos para proteger el extremo N-terminal pueden incluir dimetilación, metilación, desaminación, acetilación.

En una forma de realización preferida de la presente invención, para inducir la pegilación selectiva en el residuo de aminoácido C-terminal de GLP-2, se introduce un residuo de cisteína en el extremo C-terminal de un derivado de
20 GLP-2, y el PEG que tiene un grupo maleimida se une entonces al residuo de cisteína C-terminal de GLP-2. En particular, se ha encontrado que el conjugado de GLP-2, en el que un fragmento de inmunoglobulina Fc está unido específicamente en el sitio al extremo C-terminal de un imidazo-acetil-GLP-2 (CA-GLP-2) cuyo carbono alfa de la primera histidina y el grupo amina N-terminal unido al mismo, presentan una afinidad de unión mejorada a un receptor de GLP-2 en comparación con un derivado de GLP-2 de larga duración en el que un fragmento Fc de
25 inmunoglobulina está unido a un residuo de lisina original (véase la Figura 5).

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un método para preparar un conjugado de GLP-2 como se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

30 Como se usa en el presente documento, el término "complejo" se refiere a un intermedio entre el polímero no peptídico y el derivado de GLP-2 que están unidos covalentemente entre sí. Posteriormente, el otro extremo del polímero no peptídico que no está unido al derivado de GLP-2 se une al fragmento Fc de inmunoglobulina.

La etapa (1) consiste en unir covalentemente el GLP-2 o su derivado a un extremo del polímero no peptídico.
35 Preferiblemente, el GLP-2 o su derivado puede ser un GLP-2 nativo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o sus derivados N-terminales que tienen un grupo tiol que se introduce en el extremo C-terminal del GLP-2 o su derivado. Preferiblemente, el derivado de GLP-2 puede ser un CA-GLP-2, un DA-GLP2, un OH-GLP2, un DM-GLP-2, o un CX-CLP-2. Más preferiblemente, el derivado de GLP-2 puede ser un CA-GLP-2 en el que se introduce un residuo de cisteína en su extremo C-terminal.

40 En la Etapa 1), el grupo reactivo en ambos extremos del polímero no peptídico puede ser el mismo o diferente. Preferiblemente, un extremo del polímero no peptídico puede poseer un grupo maleimida y el otro extremo del mismo puede tener un grupo aldehído.

45 Además, el polímero no peptídico en la Etapa 1 está unido covalentemente al grupo tiol introducido en el extremo C-terminal de GLP-2 o su derivado, preferiblemente un grupo tiol del residuo de cisteína introducido en el extremo C-terminal del GLP-2 o su derivado. Para la unión de sitio específico del polímero no peptídico al grupo tiol del GLP-2 o su derivado, la reacción entre el GLP-2 o su derivado y el polímero no peptídico en la Etapa 1) se puede llevar a cabo a pH de 2 a 4, preferiblemente a pH 3. En este momento, la relación molar del GLP-2 o su derivado con respecto al
50 polímero no peptídico en esta reacción puede estar en un intervalo de 1:2 a 1:10.

La reacción de la Etapa 1) se puede llevar a cabo en presencia de un agente reductor dependiendo del tipo de grupo reactivo en ambos extremos del polímero no peptídico, si es necesario. El agente reductor adecuado para la reacción puede incluir cianoborohidruro de sodio (NaHBH₃), borohidruro de sodio, borato de dimetilamina o borato de
55 piridina.

La Etapa 2) consiste en aislar el complejo de GLP-2-polímero no peptídico, en el que el GLP-2 o su derivado está unido covalentemente a un extremo del polímero no peptídico, de la mezcla de reacción de la Etapa 1). Teniendo en cuenta las propiedades físicas tal como la pureza, un peso molecular y una carga neta de una proteína diana, el

aislamiento de la Etapa 2 se puede llevar a cabo seleccionando adecuadamente un método convencional conocido en la técnica para la purificación y el aislamiento de proteínas. Por ejemplo, se pueden usar diversos métodos convencionales que incluyen cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico y, si es necesario, se pueden combinar para aumentar el rendimiento de un producto diana purificado.

5

La Etapa 3) consiste en llevar a cabo la reacción entre el complejo (GLP-2-polímero no peptidilo) aislado en la Etapa 2) y el fragmento Fc de inmunoglobulina, para así unir covalentemente el fragmento Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptidilo incluido en el complejo.

10 En la Etapa 3), la reacción entre el complejo de GLP-2-polímero no peptidilo y el fragmento Fc de inmunoglobulina se puede llevar a cabo a un pH de 5,0 a 8,0, preferiblemente a un pH de 6,0. En este momento, la relación molar del complejo de GLP-2-polímero no peptidilo con respecto al fragmento Fc de inmunoglobulina en esta reacción puede estar en un intervalo de 1:2 a 1:10, preferiblemente de 1:4 a 1:8.

15 La reacción de la Etapa 3) se puede llevar a cabo en presencia de un agente reductor dependiendo del tipo de grupo reactivo en ambos extremos del polímero no peptidilo, si es necesario. El agente reductor adecuado para la reacción puede incluir cianoborohidruro de sodio (NaHBH₃), borohidruro de sodio, borato de dimetilamina o borato de piridina.

20 En una forma de realización preferible, el método para preparar un conjugado de GLP-2 de acuerdo con la presente invención comprende la siguiente etapa de:

1) unir covalentemente un polímero no peptidilo que tiene un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído en el otro extremo a un grupo tiol de GLP-2 nativo o su derivado, y en el que el grupo tiol se introduce en el extremo C-terminal del mismo;

25

2) aislar un complejo que comprende el polímero no peptidilo y GLP-2 o su derivado, de la mezcla de reacción de la Etapa 1), en el que el polímero no peptidilo está unido covalentemente al grupo tiol de GLP-2 o su derivado; y

30

3) unir covalentemente un fragmento Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptidilo del complejo aislado en la Etapa 2), para producir de este modo un conjugado de GLP-2 que comprende la región Fc de inmunoglobulina, el polímero no peptidilo y el GLP-2 o su derivado, en el que un extremo del polímero no peptidilo está unido covalentemente al fragmento Fc de inmunoglobulina y el otro extremo del mismo está unido covalentemente a GLP-2 o su derivado.

35 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado GLP-2 como principio activo.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para la prevención o el tratamiento de una o más enfermedades seleccionadas de enfermedades intestinales, lesiones intestinales y gastrosis. Especialmente, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para la prevención o el tratamiento de enfermedades que incluyen, enfermedad GI, incluyendo SBS, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis, pancreatitis, ileítis, íleo inflamatorio, mucositis causada por quimioterapia y/o radioterapia contra el cáncer, atrofia gástrica causada por la nutrición parenteral total o isquemia, insuficiencia ósea, trastornos gastrointestinales (GI) pediátricos, incluyendo insuficiencia intestinal que induce enteritis necrótica del recién nacido.

45

Como se usa en el presente documento, el término "prevención" o "prevenir" pretende abarcar todas las acciones para restringir o retrasar la aparición o el avance de las enfermedades mencionadas anteriormente tales como enfermedad intestinal, lesión intestinal y enfermedad de gastrosis, a través de la administración de la composición farmacéutica de la presente invención.

50

El término "tratamiento" o "tratar" en este contexto abarca todas las acciones para mejorar o cambiar de manera beneficiosa los síntomas de las enfermedades mencionadas anteriormente tales como enfermedad intestinal, lesión intestinal y enfermedad de gastrosis, a través de la administración de la composición farmacéutica de la presente invención.

55

La composición farmacéutica de la presente invención comprende como principio activo el conjugado de GLP-2 de larga duración con una semivida *in vivo* extendida y una eficacia y estabilidad *in vivo* mejoradas de acuerdo con la presente invención, y por lo tanto, puede reducir considerablemente la dosis de administración del fármaco y

presentar un mejor cumplimiento del fármaco sin fluctuaciones en el nivel de glucosa en sangre. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar eficazmente para prevenir y tratar enfermedad intestinal, lesión intestinal o gastrosis.

- 5 La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un aglutinante, un lubricante, un disgregante, un excipiente, un solubilizante, un agente dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, un agente colorante y un perfume. Para la administración inyectable, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente tamponante, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico y un estabilizante. Para la administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante y un agente conservante.

15 La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una diversidad de formas de dosificación en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para la administración inyectable, la composición farmacéutica puede formularse en una ampolla como una forma de dosificación de dosis única o una forma de dosificación unitaria, tal como un recipiente multidosis. La composición farmacéutica también se puede formular en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

20 Por otro lado, los ejemplos del vehículo, excipiente y diluyente adecuados para la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir adicionalmente

25 cargas, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes y antisépticos.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a través de una cualquiera de las vías comunes, siempre que sea capaz de alcanzar un tejido deseado. Se contemplan una diversidad de modos de

30 administración, incluyendo por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal.

Sin embargo, dado que los péptidos se digieren tras la administración oral, el ingrediente eficaz de la composición farmacéutica para administración oral debe recubrirse o formularse para proteger contra la degradación en el

35 estómago. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse usando un cierto aparato capaz de transportar el ingrediente eficaz a una célula diana.

La frecuencia de administración y la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención pueden

40 determinarse por varios factores relacionados, incluyendo los tipos de enfermedades a tratar, las rutas de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso y la gravedad de la enfermedad, así como por los tipos de fármaco como un ingrediente eficaz. Sin embargo, la dosis puede aumentarse o disminuirse de acuerdo la vía de administración, la gravedad de la enfermedad, y el sexo, el peso y la edad del paciente, y, por lo tanto, no limita el alcance de la presente invención. Al mostrar una excelente persistencia y título *in vivo*, la composición farmacéutica

45 de la presente invención puede disminuir notablemente la frecuencia de administración. Dado que la composición farmacéutica de la presente invención tiene una excelente durabilidad y estabilidad *in vivo* con una semivida *in vivo* prolongada, puede reducir notablemente la frecuencia de administración y la dosis de los fármacos.

De acuerdo con todavía un aspecto adicional, la presente invención proporciona un conjugado de GLP-2 de acuerdo

50 con la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad intestinal, lesión intestinal o gastrosis, que comprende administrar el conjugado de GLP-2 de acción prolongada en una cantidad terapéuticamente eficaz para un sujeto que lo necesite.

Como se usa en el presente documento, el término "administración" o "administrar" se refiere a la introducción de un

55 ingrediente eficaz en un paciente de una manera adecuada. Siempre que permita que el principio eficaz alcance un tejido diana, se puede tomar cualquier administración. Los ejemplos de la vía de administración incluyen administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, interdérmica, oral, local, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal. Sin embargo, dado que los péptidos se digieren tras la administración oral, el ingrediente eficaz de una composición para administración oral debe recubrirse o formularse para proteger contra la

degradación en el estómago. Preferiblemente, el ingrediente eficaz puede formularse en una inyección. Además, el conjugado de acción prolongada se puede administrar con la ayuda de cualquier dispositivo que ayude a transmitir el ingrediente eficaz a las células diana.

- 5 Los ejemplos del sujeto a tratar incluyen seres humanos, monos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, pollos, codornices, gatos, perros, ratones, ratas, conejos y cobayas. Los sujetos preferidos son los mamíferos, particularmente los seres humanos.

10 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el contexto del ingrediente eficaz, se refiere a una cantidad suficiente para prevenir o tratar una enfermedad, es decir, enfermedad intestinal, lesión intestinal o gastrosis en una relación beneficio/riesgo razonable para que sea aplicable al tratamiento médico.

15 El conjugado de GLP-2 de acción prolongada de la presente invención muestra una semivida *in vivo* prolongada y una durabilidad y estabilidad *in vivo* mejoradas. Por lo tanto, el conjugado de GLP-2 de acción prolongada de la presente invención puede administrarse a una dosis notablemente baja y presentar una mejora en el cumplimiento del fármaco sin fluctuación en el nivel de glucosa en sangre. Por consiguiente, el conjugado GLP-2 de acción prolongada de la presente invención puede usarse eficazmente para prevenir o tratar una enfermedad intestinal, una lesión intestinal o una gastrosis.

20 [Modo de la invención]

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Pegilación de imidazo-acetil-GLP-2

25 Se hizo reaccionar imidazo-acetil GLP-2 (CA-GLP-2, A2G, 34C, American Peptide, EE.UU.) con 10K MAL-PEG-ALD PEG (PEG heterobifuncional que tenía un grupo maleimida y un grupo aldehído en cada extremo, NOF Inc., Japón), para pegilar el 34º residuo de cisteína (Cys34) del CA-GLP-2. Aquí, la relación molar de CA-GLP-2 con respecto a PEG fue de 1:3, y la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 3 horas, con una concentración peptídica de 3,5 mg/ml. Además, la reacción se realizó en un tampón Tris-HCl 50 mM en presencia de cianoborohidruro de sodio (SCB) 20 mM como agente reductor. Una vez completada la reacción, el producto resultante, el complejo de CA-GLP-2-PEG mono-pegilado se purificó por cromatografía usando una columna SOURCE S (LRC25, Pall Corporation) en las siguientes condiciones.

35 Columna: SOURCE S (LRC25, Pall Corporation)
Caudal: 4,0 ml/min
Gradiente: eluyente B al 0% → 40% durante 240 min (A: Ácido cítrico 20 mM, pH 2,0 + etanol al 45%, B: A + KCl 1 M)

Ejemplo 2: Preparación de conjugado de imidazo-acetil-GLP-2(A2G, 34C)-PEG-Fc de inmunoglobulina

El complejo de CA-GLP-2 (A2G, 34C) mono-pegilado purificado anteriormente se mezcló con un fragmento Fc de inmunoglobulina (IgG) (Patente Coreana N.º 10-725315) a una relación molar de 1:6, seguido de su reacción a 4°C

45 durante 20 horas, con una concentración peptídica de 20 mg/ml. En este momento, la reacción se realizó en un tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) en presencia de SCB 20 mM como agente reductor. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se sometió a una cromatografía de tres etapas utilizando una columna SOURCE Phe (XK16, GE Healthcare), una columna SOURCE 15Q (LRC25, Pall Corporation) y una columna SOURCE ISO (HR16, GE Healthcare) en las siguientes condiciones.

50 Columna: SOURCE Phe (XK16, GE Healthcare)
Caudal: 2,0 ml/min
Gradiente: eluyente B al 100% → 0% (A: Tris 20 mM, pH 8,0; B: A + NaCl 2,6 M)
55 Columna: SOURCE 15Q (LRC25, Pall Corporation)
Caudal: 5,0 ml/min
Gradiente: eluyente B al 0 → 30% durante 120 min (A: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, B: A + NaCl 1 M)
Columna: SOURCE ISO (HR16, GE Healthcare)
Caudal: 2,0 ml/min
Gradiente: eluyente B al 100% → 0% durante 100 min (A: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, B: A + sulfato de amonio

1,1 M)

Cada perfil de purificación de la columna SOURCE Phe, la columna SOURCE 15Q y la columna SOURCE ISO se muestran en las Figuras 1, 2 y 3, respectivamente. Como resultado del análisis por HPLC de fase inversa, el conjugado de CA-GLP-2 (A2G, 34C)-10K PEG-Fc se purificó con una pureza del 94,2% (Figura 4), y el rendimiento del mismo era del 12,5%.

Ejemplo 3: Medición de la afinidad de unión *in vitro* del conjugado de CA-GLP-2 (A2G, 34C)-10K PEG-Fc con respecto al receptor de GLP-2

10 Para medir la eficacia del conjugado de CA-GLP-2 (A2G, 34C)-10K PEG-Fc (en lo sucesivo en el presente documento, "conjugado de GLP-2") preparado en el Ejemplo 2, se usó un método para medir la actividad celular *in vitro* como se indica a continuación. En este método, se empleó una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), CHO/hGLP-2R que se transformó para expresar un gen que codifica el receptor de GLP-2 humano.

15 Las células CHO/hGLP-2R se subcultivaron de 2 a 3 veces a la semana, y se sembraron en una placa de 96 pocillos a una concentración de 1×10^5 células/pocillo, seguido de cultivo durante 24 horas. Las células CHO/hGLP-2R cultivadas de este modo se trataron con GLP-2 nativo a una concentración de 1000 a 0,002 nM; una formulación de acción prolongada de GLP-2 nativo (conjugado de GLP-2-PEG-Fc, LAPS-GLP-2) a una concentración de 10000 a 20 0,02 nM; una formulación de acción prolongada de un derivado de GLP-2 a través de la conjugación específica de lisina (LAPS-DA-GLP-2, LAPS-CA-GLP-2, LAPS-OH-GLP-2) a una concentración de 10000 a 0,02 nM; y una formulación de acción prolongada de un derivado de GLP-2 a través de la conjugación específica de cisteína C-terminal (LAPS-CA-GLP-2 (A2G, 34C)) a una concentración de 10000 a 0,02 nM, respectivamente. El nivel intracelular de cAMP, como un segundo mensajero utilizado para la transducción de señal, en las células 25 CHO/hGLP-2R tratadas con cada compuesto se midió utilizando un kit de ensayo de cAMP (MD, EE.UU.) y se ensayó la actividad de luciferasa con un luminómetro VICTOR LIGHT (PerkinElmer Life Sciences). También se midió el valor de CE_{50} de cada compuesto.

30 Como se muestra en la Figura 5, la formulación de acción prolongada del derivado de GLP-2 a través de la conjugación específica de lisina (LAPS-DA-GLP-2, LAPS-CA-GLP-2, LAPS-OH-GLP-2) mostró una actividad *in vitro* más baja que la formulación de acción prolongada de GLP-2 nativo (LAPS-GLP-2) (2,6-7,5% frente a 8,6%). En contraste, la formulación de acción prolongada del derivado de GLP-2 a través de la conjugación específica de cisteína C-terminal (LAPS-CA-GLP-2 (A2G, 34C)) mostró una mayor actividad *in vitro* que la formulación de acción prolongada del GLP-2 nativo (LAPS-GLP-2) (9,9% comparado con el GLP-2 nativo).

35 Estos resultados han confirmado que el conjugado de GLP-2, en el que un extremo del polímero no peptídico está unido covalentemente al extremo C-terminal del derivado de GLP-2 y el otro extremo del mismo está unido covalentemente al fragmento Fc de inmunoglobulina, muestra una afinidad de unión mejorada a un receptor de GLP-2 en comparación con el conjugado GLP-2 anterior, extendiendo de este modo una semivida *in vivo* y mejorando la 40 durabilidad y estabilidad *in vivo*.

[Aplicabilidad industrial]

45 El conjugado de GLP-2 de la presente invención tiene una afinidad de unión notablemente alta por un aceptor de GLP-2, mostrando de este modo una eficacia terapéutica *in vivo* de larga duración y una semivida *in vivo* prolongada. Por lo tanto, el conjugado de GLP-2 de la presente invención se puede usar eficazmente para el tratamiento o la prevención de enfermedad intestinal, lesión intestinal o gastroenteritis con una frecuencia de administración notablemente baja.

50 <110> HANMI SCIENCE CO., LTD.

<120> UN CONJUGADO DE GLP-2 DE SITIO ESPECÍFICO QUE USA UN FRAGMENTO DE INMUNOGLOBULINA

55 <130> OPA12175PCT

<150> KR10-2011-0147684

<151> 30-12-2011

ES 2 725 805 T3

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

5

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 1

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2) que comprende GLP-2 nativo o su derivado y un fragmento Fc de inmunoglobulina que se une covalentemente a través de un polímero no peptídico, en el que el GLP-2 nativo o su derivado tiene un grupo tiol introducido en su extremo C-terminal, y un extremo del polímero no peptídico está unido al grupo tiol del GLP-2 o su derivado, en el que el derivado de GLP-2 se prepara por sustitución, eliminación o modificación del grupo amina N-terminal de un GLP-2 nativo y tiene la función de unirse a un receptor de GLP-2.
- 10 2. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el grupo tiol del GLP-2 o su derivado se introduce uniendo la cisteína al extremo C-terminal del mismo.
3. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el derivado de GLP-2 se selecciona del grupo que consiste en un derivado de GLP-2 preparado eliminando el carbono α de histidina, que es el primer aminoácido en el extremo N-terminal del GLP-2 nativo y un grupo amina N-terminal unido al mismo; un derivado de GLP-2 preparado eliminando un grupo amina N-terminal del GLP-2 nativo; un derivado de GLP-2 preparado sustituyendo un grupo amina N-terminal del GLP-2 nativo con un grupo hidroxilo; un derivado de GLP-2 preparado modificando un grupo amina N-terminal del GLP-2 nativo con un grupo dimetilo; y un derivado de GLP-2 preparado sustituyendo un grupo amina N-terminal del GLP-2 nativo con un grupo carboxilo.
- 15 20
4. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el otro extremo del polímero no peptídico está unido covalentemente al fragmento Fc de inmunoglobulina.
5. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos.
- 25 30
6. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico tiene un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo aldehído propiónico, un grupo butil aldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida en ambos extremos terminales del mismo.
- 35
7. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el derivado de succinimida se selecciona del grupo que consiste en propionato de succinimidilo, succinimidil carboximetilo, hidroxisuccinimidilo y carbonato de succinimidilo.
8. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el polímero no peptídico tiene un grupo maleimida en un extremo terminal y un grupo aldehído en el otro extremo terminal.
- 40 9. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc de inmunoglobulina no está glucosilado.
10. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc de inmunoglobulina está compuesto por 1 a 4 dominios seleccionados del grupo que consiste en los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4, y además comprende una región bisagra.
- 45
11. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG₄.
- 50 12. El conjugado de GLP-2 de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG₄ humana no glucosilada.
13. Un método para preparar el conjugado de GLP-2 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:
- 55
- 1) unir covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en derivados de aldehído, maleimida y succinimida en ambos extremos terminales a un grupo tiol de un GLP-2 o su derivado, en el que el GLP-2 o su derivado tiene un grupo tiol introducido en su extremo C-terminal;

2) aislar un complejo, en el que el polímero no peptidilo está unido covalentemente al grupo tiol del GLP-2 o su derivado, de la mezcla de reacción de la Etapa (1);

3) unir covalentemente el otro extremo del polímero no peptidilo en el complejo a un fragmento Fc de inmunoglobulina; y

5 4) aislar un conjugado de GLP-2, en el que ambos extremos del polímero no peptidilo están unidos al fragmento Fc de inmunoglobulina y al GLP-2 o su derivado, respectivamente, de la mezcla de reacción de la Etapa 3).

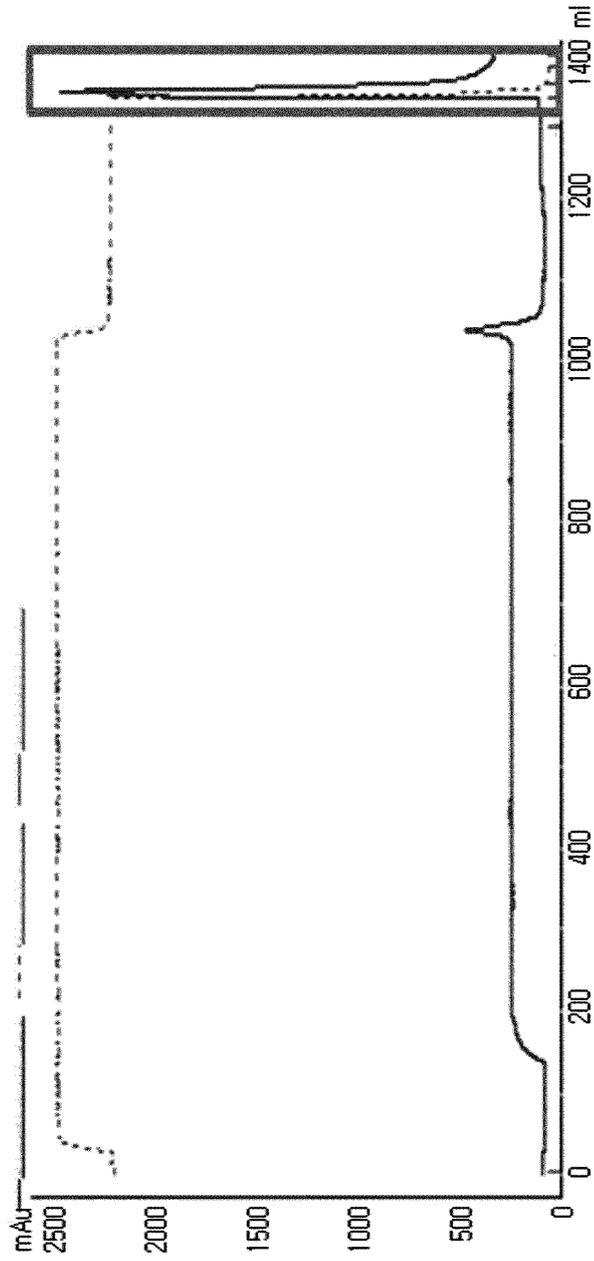
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el GLP-2 o su derivado y polímero no peptidilo en la Etapa (1) se hacen reaccionar en una relación molar de 1:2 a 1:10 en la condición de pH 2 a 4.

15. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de GLP-2 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 como un principio activo para prevenir o tratar una o más enfermedades seleccionadas de enfermedad intestinal, lesión intestinal y gastrosis.

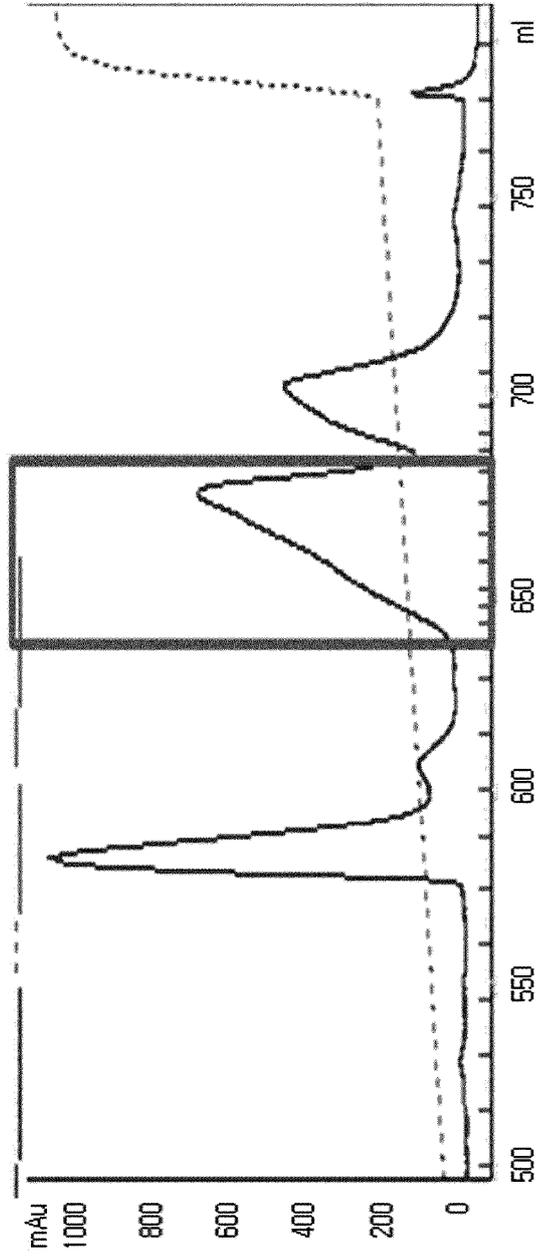
15

16. El conjugado de GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada de enfermedad intestinal, lesión intestinal y gastrosis.

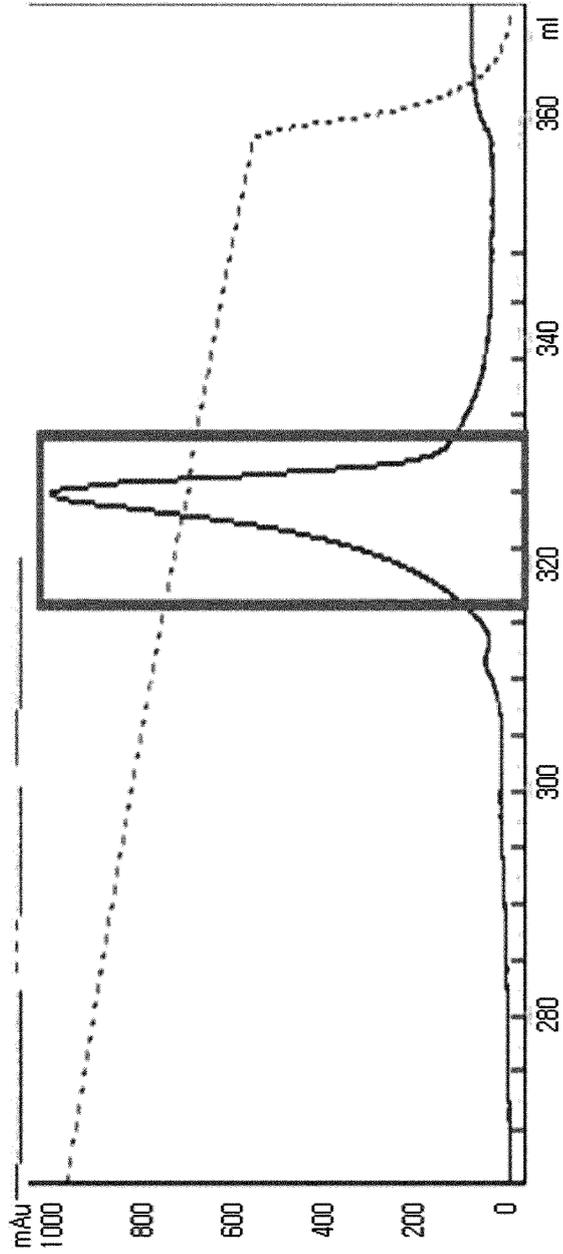
[Fig. 1]



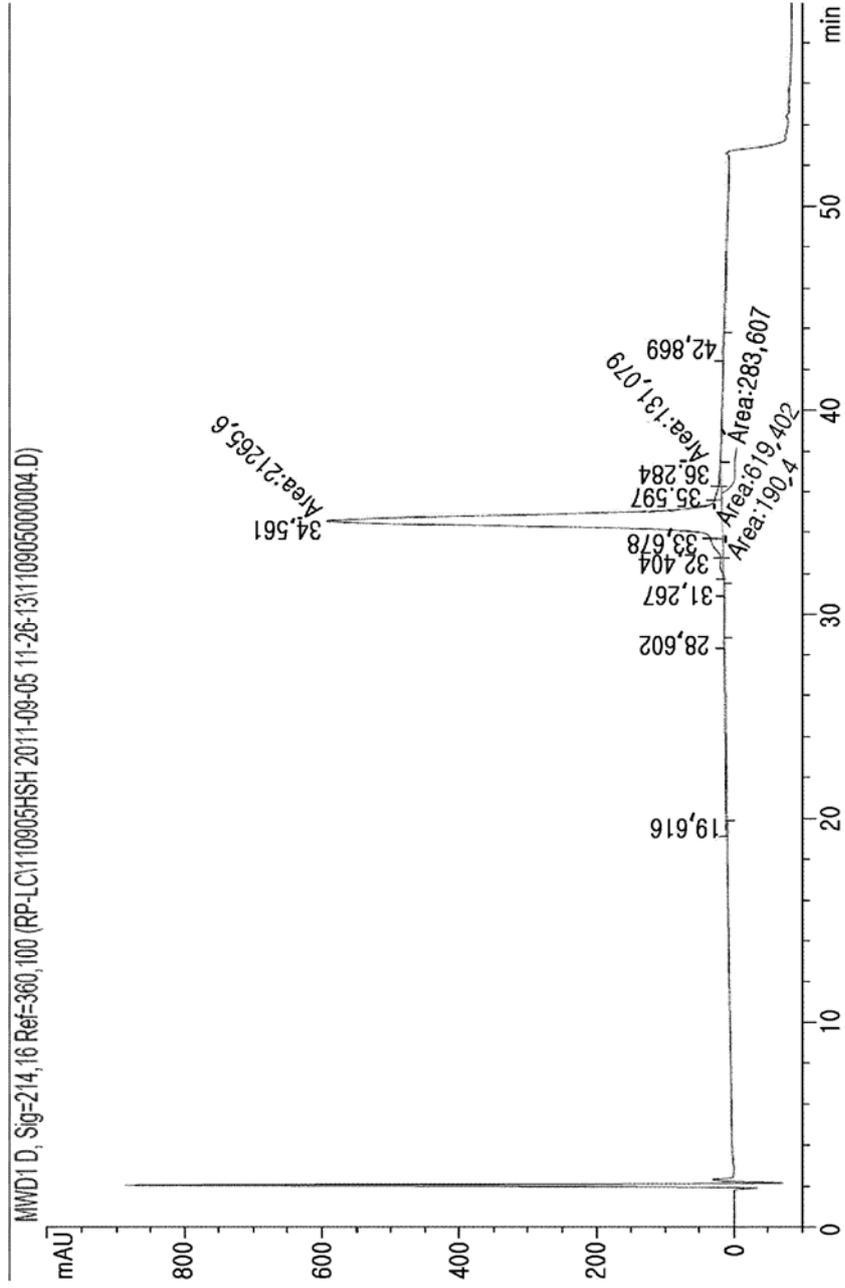
[Fig. 2]



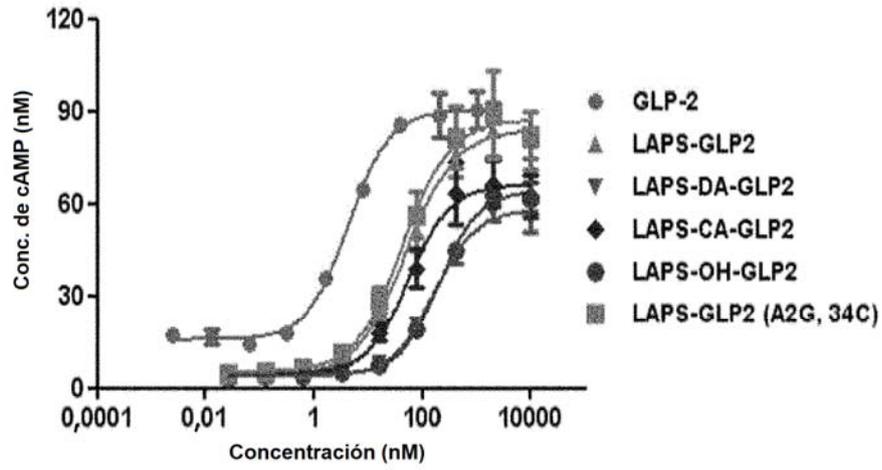
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



Materiales de ensayo	CE ₅₀ (nM)	Actividad relativa (% frente a GLP-2)
GLP-2	4,25	100
LAPS-GLP2	49,22	8,6
LAPS-DA GLP2	162,6	2,6
LAPS-CA GLP2	56,82	7,5
LAPS-OH GLP2	203,0	2,1
LAPS-CA GLP2 (A2G, 34C)	42,85	9,9