(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 7 월 13 일 (13.07.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/132609 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/00 (2006.01) *A61P 1/14* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/000110

(22) 국제출원일: 2023 년 1 월 3 일 (03.01.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0001657 2022 년 1 월 5 일 (05.01.2022) KR
10-2022-0050232 2022 년 4 월 22 일 (22.04.2022) KR

(71) 출원인: 주식회사 휴온스랩 (**HUONSLAB CO., LTD.**) [KR/KR]; 13201 경기도 성남시 중원구 갈마치로288번길 14, 8층, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김완섭 (**KIM, Wan Seop**); 13643 경기도 성남시 수정구 위례순환로211, 5406-1401, Gyeonggi-do (KR). 권오찬 (**KWON, Oh Chan**); 04153 서울특별시 마포구 독막로 266, 113-706, Seoul (KR). 유태형 (**YOO, Tae Hyoung**); 17066 경기도 용인시 기흥구 기흥역로58번길 78, 105-3602, Gyeonggi-do (KR).

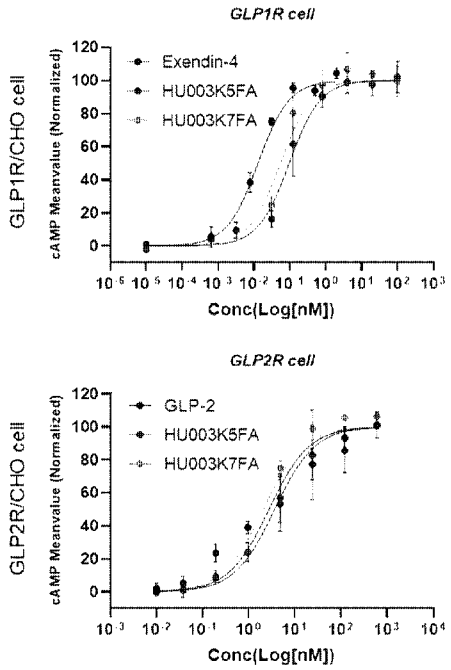
(74) 대리인: 이명진 (**LEE, Myoung-Jin**); 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) **Title:** LONG-ACTING FATTY ACID-PEPTIDE DERIVATIVE AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 지속형 지방산-펩타이드 유도체 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a long-acting fatty acid-peptide derivative and use thereof and, in particular, to a long-acting GLP-1/GLP-2 dual agonist, use thereof for treating intestinal diseases, intestinal damage, or gastric diseases, and the like. The fatty acid-peptide derivative of the present invention, which is an agonist for both GLP-1 and GLP-2 receptors, effectively stimulates GLP-1 and GLP-2 receptors known as targets for short bowel syndrome, has an excellent in-vivo long-acting effect compared to existing drugs, and exhibits a significantly superior therapeutic effect compared to a negative control and a positive control in a short bowel syndrome animal model, and thus can be effectively used in the prevention, amelioration and treatment of intestinal diseases and gastric diseases.

(57) **요약서:** 본 발명은 지속형 지방산-펩타이드 유도체 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 지속형 GLP-1/GLP-2 이중 작용제 및 이의 장질환, 장손상, 또는 위질환 치료 용도 등에 관한 것이다. 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체는 GLP-1 과 GLP-2 수용체 모두에 대한 작용제로서, 단장증후군의 타겟으로 알려진 GLP-1 및 GLP-2 수용체를 효과적으로 자극하며, 기존 약물 대비 생체 내 우수한 효력 지속 효과를 가지고, 단장증후군 동물 모델에서 음성 대조군 및 양성 대조군과 비교하여 현저히 우수한 치료 효과를 나타내는 바, 장질환 및 위질환의 예방, 개선 및 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

WO 2023/132609 A1

[다음 쪽 계속]

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 지속형 지방산-펩타이드 유도체 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 지속형 지방산-펩타이드 유도체 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 지속형 GLP-1/GLP-2 이중 작용제 및 이의 장질환, 장손상, 또는 위질환 치료 용도 등에 관한 것이다.

[2] 본 출원은 2022년 01월 05일에 출원된 한국특허출원 제10-2022-0001657호 및 2022년 04월 22일에 출원된 한국특허출원 제10-2022-0050232호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

[3]

배경기술

[4] 글루카곤-유사 펩타이드-1(glucagon-like peptide-1, 이하 GLP-1)은 인슐린 분비 자극, 글루카곤 분비 억제, 위 공복 억제, 위 운동 또는 장 운동 억제, 글루코오스 사용 증진 및 체중 감량 유도와 같은 다양한 생물학적 효과를 유도한다. 또한, GLP-1은 제2형 당뇨병인 인슐린 비-의존성 진성 당뇨병(Type IIdiabetes, Non-insulin dependence diabetes mellitus, NIDDM)이 진행됨에 따라 유발되는 췌장 β세포 퇴화의 예방 및 신생 β세포의 생성 촉진에 의한 인슐린 분비능의 회복 등의 작용을 할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[5] 글루카곤 유사 펩타이드-2(glucagon-like peptide-2, 이하 GLP-2)는 섭취된 영양분에 반응하여 소장의 L-세포에서 생성되는 33개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬이다. GLP-2는 소장, 대장에서 점막 성장을 유도하고, 장세포와 선와(crypt) 세포의 성장 촉진 및 세포사멸(apoptosis)을 억제한다. 또한 GLP-2는 소장에서 영양분의 흡수를 증가시키고 장 투과성을 감소시킨다. 또한 GLP-2는 위 배출(Gastric emptying) 및 위산 분비를 억제하고, 장 혈류 속도를 증가시키고, 장 평활근을 이완시킨다. GLP-2는 에너지 흡수 및 보호, 장 세포 기능의 활성화 등의 특징으로 다양한 장 질환과 장 손상의 실험모델에서 치료제로서 유망한 가능성을 보여왔다.

[6] 실제로, GLP-2 유사체인 Gattex(teduglutide)가 2012년 말에 미국의 NPS pharmaceuticals, Inc.에서 개발되어 단장증후군(short bowel syndrome, SBS) 치료제로 희귀의약품 지정을 받았으며, 적응증을 확대하여 염증성 장질환 환자들에서 임상 2상을 진행 중에 있다.

[7] 그런데 GLP-2 또는 이의 유사체를 약물로 상용화하기 위하여서는 먼저 해결해야 할 문제점들이 있다. GLP-2와 같은 펩타이드는 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 체내 단백질 가수 분해 효소에 의해 분해되어 그 활성을 잃으며, 또한 상대적으로 크기가 작아 신장을 통해 쉽게 제거되기 때문에 약리

성분으로 펩타이드를 포함하는 의약품의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 펩타이드 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나 펩타이드 약물은 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되며, 따라서 생리활성 펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사하게 되는데, 이는 환자의 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 다양한 시도가 있어 왔다. 그 중 하나로 펩타이드 약물의 생체막 투과도를 증가시켜 구강 또는 비강을 통한 흡입으로 펩타이드 약물을 체내로 전달하려는 시도가 있었다. 그러나 이러한 방법은 주사제에 비해 펩타이드의 체내 전달 효율이 낮으며, 따라서 아직까지는 펩타이드 약물의 체내 활성이 요구되는 조건으로 유지하는데 어려움이 많다. 특히, GLP-2는 생리 활성 반감기가 7분 이하로 매우 짧다. 이는 디펩티딜 펩티다아제 IV이하, DPPIV에 의한 GLP-2의 아미노산 2번(Ala)과 3번(Asp) 사이의 절단에 의한 GLP-2의 역가 상실에 기인한다.

[8] 이에, 본 발명자들은 기존 약물의 타겟인 GLP-2 뿐만 아니라 GLP-1의 활성을 동시에 가지고, GLP-1/GLP-2 간 시너지효과(Synergistic effect)로 기존의 약물보다 우수한 효능을 나타내는 펩타이드 제제를 개발하면서, 약물의 생리 활성 반감기를 증가시키고자 하였다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 이에 본 발명자들은 상기한 문제점을 해결하기 위해 장내 세포인 GLP-1 및 GLP-2 수용체에 결합하여 장질환 및 위질환 치료 효과를 나타내는 GLP-1/GLP-2 유사 펩타이드를 제작하고, 상기 펩타이드에 라이신 및 팔미트산을 결합시킴으로써, GLP-1 및 GLP-2 수용체에 이중으로 작용 활성을 나타냄에 따라 단장증후군 치료 효과 및 체내 반감기가 증대되는 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체를 완성하였다.

[11]

[12] 따라서, 본 발명의 목적은 하기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드에 지방산이 결합된 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드는 N 말단, C 말단, 또는 그 중간 사슬에 지방산이 결합된 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

[13] [일반식]

[14] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열-Kn

[15] (상기 일반식에서, K는 라이신(Lysine)이며, n은 1 내지 10의 정수이다.)

[16] 본 발명의 다른 목적은 상기 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 장질환, 장손상 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환 예방 또는 치료용 약학적

조성물을 제공하는 것이다.

[17]

[18] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[19]

과제 해결 수단

[20] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드에 지방산이 결합된 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드는 N 말단, C 말단, 또는 그 중간 사슬에 지방산이 결합된 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[21] [일반식]

[22] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열-Kn

[23] (상기 일반식에서, K는 라이신(Lysine)이며, n은 1 내지 10의 정수이다.)

[24] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 지방산은 C12 내지 C22의 포화 지방산 또는 불포화 지방산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[25] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 n은 2 내지 9의 정수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[26] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 지방산은 C 말단에 결합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[27] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드는 서열번호 2 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[28] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 생체 내 반감기($t_{1/2}$)가 2시간 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[29] 또한, 본 발명은 상기 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[30] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 장질환은 단장증후군, 과민성 장질환, 염증성 장질환, 크론씨병, 결장염, 대장염, 췌장염, 회장염, 점막염, 및 장 위축으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[31] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 장질환은 단장증후군일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[32] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 위질환은 위경련, 위염, 위궤양,

십이지장염, 및 십이지장궤양으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[33] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 주(week) 당 0.1 내지 200 mg/kg 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[34] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 소장 무게 또는 길이를 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 융모 높이를 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[36] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 소장의 단백질 또는 DNA 함량을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[37] 또한, 본 발명은 상기 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환 예방, 치료, 또는 개선 방법을 제공한다.

[38] 또한, 본 발명은 상기 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방, 치료, 또는 개선 용도를 제공한다.

[39] 또한, 본 발명은 상기 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 치료용 약제를 제조하기 위한 용도를 제공한다.

[40]

발명의 효과

[41] 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체는 GLP-1과 GLP-2 수용체 모두에 대한 작용제로서, 단장증후군의 타겟으로 알려진 GLP-1 및 GLP-2 수용체를 효과적으로 자극하며, 기존 약물 대비 생체 내 우수한 효력 지속 효과를 가지고, 단장증후군 동물 모델에서 음성 대조군 및 양성 대조군과 비교하여 현저히 우수한 치료 효과를 나타내는바, 장질환, 장손상, 및 위질환의 예방, 개선 및 치료에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

[42]

도면의 간단한 설명

[43] 도 1은 CCD-18co 세포주 및 Caco-2 세포주를 이용한 장 내 세포증식효능 평가방법 Scheme을 나타낸 것이다.

[44] 도 2는 정상 마우스의 장 증식에 미치는 영향을 확인하기 위한 매일 투여 시험 방법 Scheme을 나타낸 것이다.

[45] 도 3은 정상 마우스의 장 증식에 미치는 영향을 확인하기 위한 기간별 투여 시험(2차 시험) 방법 Scheme을 나타낸 것이다.

[46] 도 4는 정상 마우스의 장 증식에 미치는 영향을 확인하기 위한 최종 후보

선정을 위한 시험(3차 시험) 방법 Scheme을 나타낸 것이다.

[47] 도 5는 단장증후군 랫드 모델의 장 증식에 미치는 영향을 확인하기 위한 시험 방법 Scheme을 나타낸 것이다.

[48] 도 6은 HU003K5FA 및 HU003K7FA의 GLP-1 수용체 및 GLP-2 수용체 활성 시험 결과를 양성대조군(Exendin-4, GLP-2)과 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[49] 도 7은 대장 유래 장막 세포주 CCD-18co 세포 및 대장암 유래 Caco-2 세포의 세포 증식 평가 결과를 나타낸 것이다.

[50] 도 8은 HU003K2FA 및 HU003K7FA를 랫드에 단회 피하 투여한 후 시간에 따른 혈중 농도를 나타낸 것이다.

[51] 도 9는 매일 투여 시험에 따른 일별 체중 변화를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다.

[52] 도 10은 매일 투여 시험에 따른 8일차 체중을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. *p<0.05 vs. G1, **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &&p<0.01 vs. G3.

[53] 도 11은 매일 투여 시험에 따른 소장 무게를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. *p<0.05 vs. G1, **p<0.01 vs. G1.

[54] 도 12는 매일 투여 시험에 따른 체중 대비 소장 무게 비율을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1.

[55] 도 13은 기간별 투여 시험(2차 시험)에 따른 일별 체중 변화를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다.

[56] 도 14는 기간별 투여 시험(2차 시험)에 따른 8일차 체중을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. *p<0.05 vs. G1, **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &p<0.05 vs. G3, &&p<0.01 vs. G3, €€p<0.01 vs. G4.

[57] 도 15는 기간별 투여 시험(2차 시험)에 따른 소장 무게를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2.

[58] 도 16은 기간별 투여 시험(2차 시험)에 따른 체중 대비 소장 무게 비율을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, ##p<0.01 vs. G2, €€p<0.01 vs. G4.

[59] 도 17은 최종 후보 선정을 위한 시험(3차 시험)에 따른 일별 체중 변화를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다.

[60] 도 18은 최종 후보 선정을 위한 시험(3차 시험)에 따른 8일차 체중을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, ##p<0.01 vs. G2.

[61] 도 19는 최종 후보 선정을 위한 시험(3차 시험)에 따른 소장 무게를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &&p<0.01 vs. G3.

[62] 도 20은 최종 후보 선정을 위한 시험(3차 시험)에 따른 체중 대비 소장 무게 비율을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &p<0.05 vs. G3.

[63] 도 21은 단장증후군 모델 시험에 따른 일별 체중 변화를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다.

[64] 도 22는 단장증후군 모델 시험에 따른 16일차 체중을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, &p<0.05 vs. G3, &&p<0.01 vs. G3, €p<0.05 vs. G4, €€p<0.01 vs. G4.

[65] 도 23은 단장증후군 모델 시험에 따른 소장 무게를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. ##p<0.01 vs. G2, &&p<0.01 vs. G3, €€p<0.01 vs. G4.

[66] 도 24는 단장증후군 모델 시험에 따른 체중 대비 소장 무게 비율을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &p<0.05 vs. G3, &&p<0.01 vs. G3, €p<0.05 vs. G4, €€p<0.01 vs. G4.

[67] 도 25는 단장증후군 모델 시험에 따른 투여군 별 장 길이의 변화를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2.

[68] 도 26은 단장증후군 모델 시험에 따른 투여군 별 단백질 함량을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. *p<0.05 vs. G1, **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &p<0.05 vs. G3, €p<0.05 vs. G4, €€p<0.01 vs. G4.

[69] 도 27은 단장증후군 모델 시험에 따른 투여군 별 총 DNA 함량을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &p<0.05 vs. G3, &&p<0.01 vs. G3, €€p<0.01 vs. G4.

[70] 도 28은 단장증후군 모델 시험에 따른 투여군 별 H&E 염색 결과를 나타낸 것이다.

[71] 도 29는 단장증후군 모델 시험에 따른 투여군 별 십이지장(Duodenum)에서의 융모 높이, 움 깊이, 점막 두께를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. *p<0.05 vs. G1, **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &p<0.05 vs. G3, &&p<0.01 vs. G3, €p<0.05 vs. G4, €€p<0.01 vs. G4.

[72] 도 30은 단장증후군 모델 시험에 따른 투여군 별 공장(Jejunum)에서의 융모 높이, 움 깊이, 점막 두께를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. **p<0.01 vs. G1, #p<0.05 vs. G2, ##p<0.01 vs. G2, &p<0.05 vs. G3, €€p<0.01 vs. G4.

[73]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[74] 본 발명은 하기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드에 지방산이 결합된 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드는 N 말단, C 말단, 또는 그 중간 사슬에 지방산이 결합된 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 이를 유효성분으로 포함하는 장질환, 장손상, 또는 위질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[75] [일반식]

[76] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열-Kn

[77] (상기 일반식에서, K는 라이신(Lysine)이며, n은 1 내지 10의 정수이다.)

[78]

[79] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[80] 본 발명에서, 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:

[81] 알라닌 Ala, A;

[82] 아르지닌 Arg, R;

[83] 아스파라긴 Asn, N;

[84] 아스파르트산 Asp, D;

[85] 시스테인 Cys, C;

[86] 글루탐산 Glu, E;

[87] 글루타민 Gln, Q;

[88] 글리신 Gly, G;

[89] 히스티딘 His, H;

[90] 이소류신 Ile, I;

[91] 류신 Leu, L;

[92] 라이신 Lys, K;

[93] 메티오닌 Met, M;

[94] 페닐알라닌 Phe, F;

[95] 프롤린 Pro, P;

[96] 세린 Ser, S;

[97] 트레오닌 Thr, T;

[98] 트립토판 Trp, W;

[99] 티로신 Tyr, Y;

[100] 발린 Val, V.

[101] 본 발명에서, "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.

[102] 본 발명에서, "펩타이드"는 당업계에 공지된 화학적 합성(Creighton, Proteins; Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., NY, 1983)에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다(Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; A Practical Approach, Athert on & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989). 또한 본 발명의 펩타이드는 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 작제한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에

의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(Biosearch 또는 Applied Biosystems 사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 작제된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 하기에 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 당업계에 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 '실질적으로 순수한 펩티드'라 함은 본 발명에 따른 펩티드가 숙주로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다. 본 발명의 펩티드 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: Maniatis et al., Molecular Cloning; A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Edition; Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology, Guthrie & Fink (eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 및 Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:12073-12080, 1990.

[103] 본 발명의 용어 "GLP-1(glucagon like peptide-1)"은, 소화기관에서 분비되는 호르몬인 인크레틴의 일종으로, 섭취에 의존적으로 장관 내의 L 세포에서 분비되어 췌장의 인슐린 분비를 증가시키는 역할과 글루카곤의 분비를 억제하여 이로 인해 식후 혈당의 상승을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려진 단백질이다. 이렇듯, GLP-1은 기존에 당뇨병 치료 용도가 널리 알려져 있었으며, 식욕의 생리적 조절에도 관여하여 체중 감소 효과도 보고되어 있다. 또한 GLP-1은 장세포와 선와(crypt) 세포의 분열을 유도하여 장세포 수의 증가를 유도하는 연구보고가 이미 알려져 있다. 이는 기존의 GLP-2 활성에 소장의 융모세포의 세포분열을 유도하는 GLP-1의 활성이 융합됨으로써, 두 가지 활성 기작으로 소장 융모세포의 증식과 성장을 촉진시켜 단장증후군 치료에 보다 효과적일 것으로 예상된다.

[104] 본 발명의 용어 "GLP-2(glucagon like peptide-2)"는, 장의 장내분비 L 세포 및 뇌의 특정 영역에서 프로글루카곤 전구체 형태로 생성되어, 장내 효소에 의한 효소 절단을 통해 생성되는 33개의 짧은 아미노산을 갖는 펩타이드 호르몬으로서, 음식의 섭취와 함께 영양분 소화에 반응하여, 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 옥신토모듈린 및 글리센틴과 함께 동시 분비된다. 상기 GLP-2는 염증성 장질환 뿐만 아니라, 단장 증후군(Short bowel syndrome, SBS) 등에 효과적인 것이 널리 알려져 있었다. 실제로 GLP-2 유사체인 Gattex(teduglutide)가 2012년 말에 미국의 NPS pharmaceuticals, Inc.에서 개발되어 단장증후군 치료제로 희귀의약품 지정을 받았으며, 현재 적응증을 확대하여

염증성 장질환 환자들에서 임상 2상을 진행 중에 있다.

[105] 본 발명의 하기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드는 서열번호 1(His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Tyr-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Thr-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp)에 라이신이 1 내지 10개 결합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[106] [일반식]

[107] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열-Kn

[108] (상기 일반식에서, K는 라이신(Lysine)이며, n은 1 내지 10의 정수이다.)

[109] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 천연형 GLP-2의 16번째 아미노산인 N(Asn)을 A(Ala)로 변경한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이는 전체적인 펩타이드 사이즈를 줄이기 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[110] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 천연형 GLP-2의 2번째 아미노산인 A(Ala)를 Exendin-4와 gattex의 G(Gly)로 변경한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이는 GLP-1 및 GLP-2의 활성 증가를 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[111] 또한, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 천연형 GLP-2 아미노산을 기준으로 13번째 위치의 아미노산이 Tyr(Y) 및/또는 19번째 위치의 아미노산이 Thr(T)로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 치환은 GLP-1 및 GLP-2의 생물학적 활성을 증가시키기 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[112] 본 발명에서, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 이와 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % 또는 99 % 상동성을 가지는 변이체일 수도 있으며, 서열번호 1의 서열 내 일부 서열의 결실, 치환 또는 부가도 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있다.

[113] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 GLP-1 수용체 및 GLP-2 수용체에 대한 이중 작용제 활성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[114] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 GLP-1 수용체에 대한 작용제 활성보다 GLP-2 수용체에 대한 작용제 활성이 큰 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[115] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 GLP-1 수용체에 대한 상대 작용제 활성이 5 % 내지 30 %, 8 % 내지 30 %, 10 % 내지 30 %, 10 % 내지 25 %, 10 % 내지 23 %, 13 % 내지 25 %, 13 % 내지 23 %, 14 % 내지 23 %, 14 % 내지 21 %, 15 % 내지 25 %, 17 % 내지 23 %, 또는 18 % 내지 22 %인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[116] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 GLP-2 수용체에 대한 상대 작용제 활성이 30 % 내지 300 %, 30 % 내지 250 %, 30 % 내지 200 %, 30 % 내지 180 %, 30 % 내지 150 %, 30 % 내지 120 %, 40 % 내지 300 %, 40 % 내지 250 %, 40

% 내지 200 %, 40 % 내지 180 %, 40 % 내지 150 %, 40 % 내지 120 %, 50 % 내지 300 %, 50 % 내지 250 %, 50 % 내지 200 %, 50 % 내지 180 %, 50 % 내지 150 %, 50 % 내지 130 %, 70 % 내지 300 %, 70 % 내지 250 %, 70 % 내지 200 %, 70 % 내지 180 %, 70 % 내지 150 %, 70 % 내지 130 %, 또는 80 % 내지 100 %인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[117] 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체는 장질환, 장손상, 또는 위질환의 예방, 치료, 및 개선 효과를 나타내는 범위 내에서 하나 이상의 아미노산 변경을 포함할 수 있다.

[118] 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체는 아미노산 서열의 일부 부위를 선정하고 그 활성을 증가시키기 위해 아미노 말단 또는 카르복시 말단의 변형을 유도할 수 있다. 이러한 변형을 통해 본 발명의 펩타이드는 생체 내 투여 시에 증가된 반감기를 가질 수 있다.

[119] 본 발명에서, 상기 지방산은 C12 내지 C22의 포화 지방산 또는 불포화 지방산일 수 있다. 상기 지방산은 지방산기의 형태로 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드에 결합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[120] 본 발명에서 언급하는 포화 지방산기는 라우릴기(C12:0, lauryl), 트라이데실기(C13:0, tridecyl), 미리스틸기(C14:0, myristil), 펜타데실기(C15:0, pentadecyl), 팔미토일기(C16:0, palmitoyl), 마르가릴기(C17:0, margaryl), 스테아릴기(C18:0, stearyl), 노나데실기(C19:0, nonadecyl), 아라키딜기(C20:0, arachidyl), 헤네이코실기(C21:0, heneicosyl), 또는 베헤닐기(C22:0, behenyl)이다.

[121] 본 발명에서 언급하는 C12 내지 C22의 불포화 지방산기는 팔미트올레일기(C16:1, palmitoleyl), 올레일기(C18:1, oleyl), 미리스트올레일기(C14:1 myristoleyl), 리놀레일기(C18:2 linoleyl) 또는 아라키도닐기(C20:3, arachidonyl)이다.

[122] 본 발명에서, 상기 n은 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 3 내지 7, 4 내지 7, 5 내지 7, 또는 6 내지 8의 정수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[123] 본 발명에서, 상기 지방산은 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드의 C 말단에 결합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[124] 본 발명에서, 상기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드는 서열번호 2 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[125] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 생체 내 반감기($t_{1/2}$)가 2시간 이상, 3시간 이상, 4시간 이상, 5시간 이상, 6시간 이상, 7시간 이상, 8시간 이상, 9시간 이상, 10시간 이상, 11시간 이상, 12시간 이상, 13시간 이상, 14시간 이상, 15시간 이상, 16시간 이상, 17시간 이상, 18시간 이상, 또는 19시간 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체는 양성대조군 테두글루티드의 혈중반감기가 1.8시간인

것과 비교하여, 약 19시간의 혈중반감기를 나타내었다.

[126] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 혈중 평균 체류시간(MRT)이 3 내지 100시간, 3 내지 90시간, 3 내지 80시간, 3 내지 70시간, 3 내지 60시간, 3 내지 50시간, 3 내지 40시간, 5 내지 100시간, 5 내지 90시간, 5 내지 80시간, 5 내지 70시간, 5 내지 60시간, 5 내지 50시간, 5 내지 40시간, 10 내지 100시간, 10 내지 90시간, 10 내지 80시간, 10 내지 70시간, 10 내지 60시간, 10 내지 50시간, 10 내지 40시간, 20 내지 100시간, 20 내지 90시간, 20 내지 80시간, 20 내지 70시간, 20 내지 60시간, 20 내지 50시간, 20 내지 40시간, 25 내지 35시간, 또는 약 30시간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체는 양성대조군 테두글루티드의 혈중 평균 체류시간이 2.1시간인 것과 비교하여, 약 31.8시간의 혈중 평균 체류시간을 나타내었다.

[127] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 주 당 0.1 내지 200 mg/kg 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[128] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 소장 무게 또는 길이를 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[129] 본 발명에서, 상기 지방산-펩타이드 유도체는 융모 높이를 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[130] 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체의 N 말단 또는 C 말단은 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등의 보호기가 결합될 수 있으며, 펩타이드의 카르복시 말단은 히드록시기(-OH), 아미노기($-NH_2$), 아자이드($-NHNH_2$)등으로 변형될 수 있다. 또한 본 발명의 펩타이드의 말단 또는 아미노산의 R-잔기(R-group)에 당쇄(oligosaccharides chains), 모든 나노입자(골드입자, 리포솜, 헤파린, 하이드로젤 등), 아미노산, 담체 단백질(carrier proteins) 등을 결합할 수 있다. 상술한 아미노산의 변형은 본 발명의 펩타이드의 역가(potency)와 안정성을 개선하는 작용을 한다.

[131] 본 발명에서, "장질환"은 단장증후군, 과민성 장질환, 염증성 장질환, 크론씨병, 결장염, 대장염, 췌장염, 회장염, 점막염 또는 장 위축일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[132] 본 발명에서, "위질환"은 위경련, 위염, 위궤양, 십이지장염, 또는 십이지장궤양일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[133] 본 발명에서, "단장증후군"이란 소장이 짧아 영양소의 소화 흡수 기능이 저하됨으로써 발생하는 여러 가지 대사 이상을 의미하며, 발병 유형에 따라 선천성과 후천성으로 구분된다. 선천성은 태아가 짧은 소장을 갖고 태어나는 것을 의미하고, 후천성은 다른 질병이나 외상으로 인해 잘라내고 남은 소장의 길이가 너무 짧아 장애를 일으키는 것을 의미한다.

[134] 후천성 단장증후군은 여러 가지 원인으로 인하여 장을 광범위하게 절제하여,

그 결과 장 흡수능력이 떨어져, 설사, 탈수 및 영양불량 등을 초래하는 상황을 의미한다. TPN 등을 포함한 내과적 치료로 치유되는 경우가 많으나, 어떤 경우에는 장길이를 길게 하는 수술(intestinal lengthening procedure) 혹은 장이식(intestinal transplantation)을 필요로 하기도 하는, 환자와 의료진 모두에게 장기간의 주의 깊은 복합적인 치료를 요하게 하는 질환이다.

[135] 본 발명은 또한, 상기 지방산-펩타이드 유도체의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.

[136] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[137] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[138] 본 발명의 조성물 내의 지방산-펩타이드 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[139] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[140] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정,

경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[141] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[142] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[143] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated

vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[144] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[145] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[146] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[147] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[148] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨($NaHSO_3$) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($Na_2S_2O_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제;

벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[149] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제(TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[150] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[151] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[152] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성이 우수하므로, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다.

[153] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수

있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[154] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[155] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[156] 또한, 본 발명은 상기 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환 예방, 치료, 또는 개선 방법을 제공한다.

[157] 또한, 본 발명은 상기 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방, 치료, 또는 개선 용도를 제공한다.

[158] 또한, 본 발명은 상기 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 치료용 약제를 제조하기 위한 용도를 제공한다.

[159] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[160] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[161] 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[162]

[163] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기

실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[164]

[165] **실험예 1. 지속형 GLP-1/GLP-2 이중 작용제의 합성 및 정제**

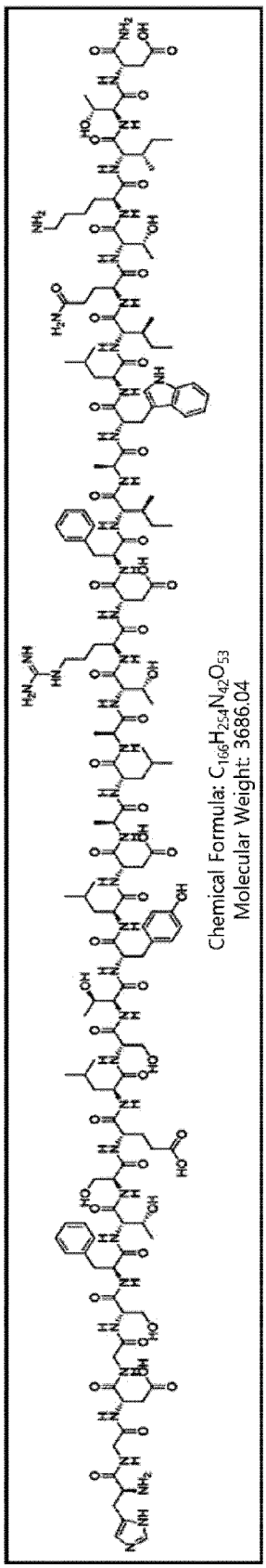
[166] **1-1. HU003 펩타이드의 합성**

[167] 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc) SPPS(고정상 펩타이드 합성)를 위한 펩티딜 레진을 준비하였다. 먼저, Rink Amide MBHA 레진을 DMF용매에 60분간 레진스웰링(Resin swell)하였다. 그리고, Fmoc-아미노산을 커플링 시약(Coupling regent)과 함께 고체상 합성에 의해 레진에 순서대로 결합하였다. 이후 레진은 DMF로 3번 세척하였다. Fmoc-Gln(Trt)-Thr(Psi,Me,Me,Pro)-OH는 아미노산 5번과 6번에 사용되었다. Fmoc의 탈보호는 20 % Piperidine/DMF을 사용하여 레진에 진행하였고, 이후 DMF를 이용하여 5번 세척하였다. 이후, 완전히 보호된 상태로 모든 아미노산을 펩티딜 레진에 결합하였다. 이후 완전히 보호된 펩티딜 레진을 E solution(TFA:Thioanisole:EDT:Phenol:H_2O=87.5:5:2.5:2.5:2.5)을 이용하여 3시간동안 분리시킨 후 여과시켰다. 이후 여과액을 차가운 에터를 이용해 침전시키고, 진공 하에 건조시켜 조(crude) 펩타이드를 얻었다. 조 펩타이드는 Hanbon 장비로 luna C18 5 μm 컬럼, 시료 분취기(fraction collector)를 이용해 분취량 역상 HPLC(Reverse Phase Preparative HPLC)를 진행해 70 %까지 정제한 후, 그래디언트(gradient) 조건 하에 A 버퍼(4 g/L 암모늄 아세테이트, aq.)와 B 버퍼(4 g/L 암모늄 아세테이트, 70 % ACN, aq.)를 이용하여 정제를 진행했다. 이후 얻은 시료는 HPLC와 MS를 이용하여 분석 및 동결건조 시켰다. 얻은 물질(13.7 mg)은 95 %의 순도를 얻기 위해 HPLC, MS를 이용해 그래디언트(gradient) 조건 하에 A 버퍼(0.1 % TFA, aq.), B 버퍼(0.1 % TFA, 80 % ACN, aq.)를 이용해 2번째 정제를 하였고, 최종적으로 10.8 mg의 HU003 펩타이드 시료를 수득하였다.

[168] HU003(서열번호 1):
His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Tyr-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Thr-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp

[169] [화학식 1]

[170] 서열번호 1의 펩타이드

[171] 

[172] **1-2. HU003 펩타이드와 팔미트산(Palmitic acid)의 접합(Conjugation)**

[173] 팔미트산을 접합하기 위하여, Boc 및/또는 Fmoc에 의해 보호된

아미노산(Fmoc-Lys(Palm-Glu-OtBu)-OH , Fmoc-Lys(Trt)-OH)을 추가로 사용하여 합성하였다. 팔미트산은 펩타이드 결합을 통해 라이신에 접합됐으며, Fmoc-Lys(Pal-Glu-OtBu)-OH는 합성된 화학물질 상태로 Polypeptide사에서 구매해 합성을 진행하였다(Cas no. 1491158-62-3, PPL item no: 500495). HU003 펩타이드에 대한 라이신-팔미트산의 결합은 상기 실험예 1-1의 방법과 동일하게 진행되었다.

[174] 제작된 라이신(K) 및 펩타이드의 서열은 하기 표 1에 나타내었다. 붉은색으로 표시된 K는 지방산이 접합된 부위를 나타낸다.

[175] 본 명세서에서는, 하기 각각의 펩타이드 서열에 지방산을 붙인 경우, 이를 HU003K2FA, HU003K3FA, HU003K5FA, HU003K7FA, 및 HU003K9FA로 표시하였다.

[176] [표1]

Peptides/ Sequence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
HU003	H	G	D	G	S	F	T	S	E	L	S	T	Y	L	D	A	L	A	T	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D									
HU003K2	H	G	D	G	S	F	T	S	E	L	S	T	Y	L	D	A	L	A	T	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	K	K							
HU003K3	H	G	D	G	S	F	T	S	E	L	S	T	Y	L	D	A	L	A	T	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	K	K	K						
HU003K5	H	G	D	G	S	F	T	S	E	L	S	T	Y	L	D	A	L	A	T	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	K	K	K	K	K				
HU003K7	H	G	D	G	S	F	T	S	E	L	S	T	Y	L	D	A	L	A	T	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	K	K	K	K	K	K	K		
HU003K9	H	G	D	G	S	F	T	S	E	L	S	T	Y	L	D	A	L	A	T	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	K	K	K	K	K	K	K	K	K

[177] HU003K2(서열번호 2):
His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Tyr-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Thr-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys

[178] HU003K3(서열번호 3):
His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Tyr-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Thr-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys

[179] HU003K5(서열번호 4):
His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Tyr-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Thr-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys

[180] HU003K7(서열번호 5):
His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Tyr-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Thr-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys

[181] HU003K9(서열번호 6):
His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Tyr-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Thr-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys

[182]

[183] **실험예 2. cAMP assay(GLP-1 및 GLP-2 수용체 효능 분석)**

[184] **2-1. 인간 GLP-1, GLP-2 수용체를 발현하는 세포주**

[185] 신규 GLP-1/GLP-2 펩타이드 활성 검증을 위하여 cell based assay 시험을 수행하였다. 사용된 세포주는 GLP-1R/CHO, GLP-2/CHO 세포이며, 세포에 대한 정보는 하기 표 2에 나타낸 바와 같다.

[186] [표2]

세포	제조 번호 (Code)	제조사
GLP-1R/CHO	95-0062C2	DiscoverX
GLP-2R/CHO	95-0112C2	DiscoverX

[187]

[188] **2-2. 인간 GLP-1/GLP-2 생물학적 활성 검정**

[189] 합성 펩타이드를 GLP-1R/CHO, GLP-2R/CHO 세포에 각각 처리하여 세포 내 cAMP 농도를 확인하였다. cAMP 농도는 cAMP assay kit(Discover X, 90-0075-LM10)를 사용하여 측정하였다. GLP-1은 exendin-4(DiscoverX, 92-1115)를, GLP-2는 GLP-2(DiscoverX, 92-1079)를 표준품으로 사용하여 EC50을 비교하였다. 표준품에 대한 정보는 하기 표 3에 나타난 바와 같다.

[190] [표3]

	GLP-1 활성측정	**GLP-2 활성측정**
물질 명	Exendin-4	GLP-2 (합성)
제조사	Discover X	Discover X
순도	> 95%	> 95%

[191]

[192] **실험예 3. 세포 증식 평가(Cell proliferation assay)**

[193] CCD-18co 세포는 대장 유래 장막 세포(Fibroblast)로 GLP-2 수용체가 존재하며, GLP-2 아고니스트와 결합할 때 세포성장인자인 IGF-1, VEGF, FGF 등을 발현한다. 증가된 세포성장인자는 대장암 유래 세포주 Caco-2 세포의 증식을 유도한다. 본 시험은 자사에서 개발한 지속형 GLP-1/GLP-2 펩타이드와 양성 대조군인 GLP-2 제제 테드글루티드(teduglutide)와 GLP-1 제제인 리라글루티드(liraglutide) 두 제제를 혼합하여 증가된 세포성장인자에 의해 Caco-2 세포의 증식 효과를 확인하였다. CCD-18co 및 Caco-2 세포를 이용한 평가 스킴은 도 1에 나타내었다.

[194] 먼저, 75T 플라스크에 배양한 CCD-18co 세포를 6 웰 플레이트에 $2x10^5$ cells/well 농도로 계대배양 하였다. CCD-18co 세포가 최대밀도로 성장하면 10 % FBS/DMEM 배지에서 FBS를 0.1 % FBS로 농도를 감소시켜 serum starvation 조건을 만들어 4 ℃에서 24시간 동안 추가배양 하였다. 이어서, 100 nM, 250 nM,

또는 1000 nM의 GLP-1 및 GLP-2 작용제(Liraglutide, Teduglutide), 또는 합성 펩타이드(HU003K5FA, HU003K7FA)를 0.1 % FBS/DMEM 배지에 희석하여 CCD-18co 세포에 처리하였다. 처리된 세포는 24시간 동안 37 ℃에서 배양하였다. 합성 펩타이드를 처리한 CCD-18co 세포 배지(conditioned medium, CM)의 상등액을 얻은 후 원심분리를 700 x g 조건으로 3분 실시한 후 0.22 μm 필터로 부유물질을 제거하였다.

[195] 한편, 5T 플라스크에서 배양한 Caco-2 세포는 96 웰 플레이트에 $0.5x10^4$ cells/well 농도로 계대배양 하였다. Caco-2 세포를 신선한 10 % FBS/MEM 배지로 100 μl씩 갈아준 뒤 CCD-18co CM을 FBS/MEM 배지와 1:1이 되도록 처리하였다. CCD-18co CM의 처리 후 3일간 37 ℃에서 인큐베이션하였다. Caco-2 세포는 신선한 10 % FBS/MEM 배지로 100 μl씩 갈아준 뒤 EZ-cytox assay 용액을 배지의 10 %가 되도록 10 μl씩 첨가하였다. EZ-cytox assay 용액을 첨가한 후 한 시간 마다 총 4시간 동안 분광광도계(Spectrophotometer)를 이용하여 450 nM 파장에서 흡광도를 측정하여 세포증식을 확인하였다.

[196]

[197] **실험예 4. 약물동태시험**

[198] 시험 동물은 SD 랫드(rat)(Male, 투여 시 7주령, ㈜코아텍)를 사용하였으며, 디자인된 시험군은 하기 표 4에 나타내었다.

[199] [표4]

Group	**투여물질**	**투여량**	**투여경로/ 채혈 시간 (hr)**
1	Teduglutide	1 mg/kg	- 투여 경로: I.V 투여(꼬리정맥투여) - 채혈 시간: 10m, 20m, 30m, 45m, 1h, 2h, 4h, 6h 8h 채혈 방법: 경정맥 또는 꼬리정맥채혈
2	HU003K2FA		
3	HU003K7FA		

[200]

[201] 각 시험군의 모든 개체에 대하여 투여 후 일정시간 간격으로 일회용 주사기(1 mL, 26G, 한국백신) 및 헤파린 튜브를 이용하여 경정맥 또는 꼬리정맥에서 약 300 μL의 혈액을 취득하였다. 채혈한 혈액은 즉시 항응고제가 담긴 혈장 튜브에 담아 채혈 후 30 분 이내에 13,000 rpm 에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 각 혈장은 최대 200 μL를 1개의 튜브에 분주하여 초저온 냉동고에 넣어 보관하였으며, 모든 채혈이 종료된 후에 전달되었다. 채혈로부터 얻은 혈장을 이용해 항체를 이용한 ELISA 분석을 수행함으로써 혈중 내 펩타이드 농도를 측정하였다. 혈중 약물의 약물동태시험은 모델비의존형 방법(Non-compartmental analysis)을 사용하였으며, 약물동태학적 파라미터인 혈중최고농도(C_{max}), 최고혈중농도 도달시간(T_{max}), 혈중약물농도-시간곡선하

면적(AUClast) 및 소실 반감기($T_{1/2}$)등 분석은 Phoenix Winnonlin을 사용하였다.

[202]

[203] **실험예 5. 정상 마우스의 장 증식에 미치는 약효 평가**

[204] 시험 동물은 SD 랫드(Male, 투여 시 7주령, ㈜ 오리엔트바이오)를 사용하였다. 시험물질 및 양성대조물질(Liraglutide, Teduglutide)은 체중을 근거로 개체별 투여량을 각각 환산하였으며, 체중 kg당 5 ㎖의 투여량으로 피하(Subcutaneous, s.c.) 투여하였다. 디자인된 시험군은 하기 표 5에 나타내었다.

[205] [표5]

매일(daily) 투여를 통한 시험군

Group	Control / Test article		Dose (mg/kg)	Total dose for 1 week (mg/kg)	Number of rats (n)
G1	Vehicle control	PBS	—	—	10
G2	Positive control	Teduglutide	3	21	10
G3			10	70	10
G4	Positive control	Liraglutide	3	21	10
G5			10	70	10
G6	Test article 1	HU003K5FA	1	7	10
G7			3	21	10
G8			10	70	10
G9	Test article 2	HU003K7FA	1	7	10
G10			3	21	10
G11			10	70	10
Total					110

[206] [표6]

기간별 투여를 통한 시험군(2차 시험)

Group	Control / Test article		Injection Interval	Dose (mg/kg)	Total dose for 1 week (mg/kg)	Number of rats
G1	Vehicle control	PBS	Daily	—	—	10
G2	Positive control	Teduglutide	Daily	10	70	10
G3		Teduglutide + Liraglutide	Daily	3	21+21	10
G4			Daily	10	70+70	10
G5	Test article	HU003K7FA	Once a week (Day 1)	70	70	10
G6				21	21	10
G7			2 times a week (Day 1, 4)	35	70	10
G8				10.5	21	10
G9			3 times a week (Day 1, 3, 5)	23.3	70	10
G10				7.0	21	10
	Total					100

[207] [표7]

최종 후보 선정을 위한 시험군(3차 시험)

Group	Control / Test article		Injection Interval	Dose (mg/kg)	Total dose for 1 week (mg/kg)	Number of rats (n)
G1	Vehicle control	PBS	Daily	—	—	10
G2	Positive control	Teduglutide	Daily	10	70	9
G3		Teduglutide + Liraglutide	Daily	10	70+70	9
G4	Test article	HU003K5FA	Once a week (Day 1)	21	21	8
G5				10.5	10.5	8
G6			2 times a week (Day 1, 4)	10.5	21	8
G7		HU003K7FA	Once a week (Day 1)	21	21	8
	Total					60

[208] 입수 시, 군 분리 시, 시험물질 투여 기간 1 일 1 회로 개체 별 체중을 측정하였다. 매 측정 시 오차를 최소화하기 위하여 동일한 저울을 사용하여 측정하였다.

[209] 또한, 시험 종료 후, 동물은 마취하고 개복하여 방혈한 다음 개체 별로 장

조직(위부터 대장까지)을 적출하였다. 적출한 장 조직은 사진 촬영을 실시하였으며, 사진 촬영을 마친 장 조직은 소장(십이지장부터 맹장 전까지) 부분만 절개하여 면봉으로 내용물을 깨끗이 제거한 뒤 무게를 측정하였다.

[210] 실험결과는 NCEED(인하대학교 소화기질환유효성평가지원센터)에서 보유하고 있는 상용통계처리 프로그램(IBM SPSS statistics version 25.0)을 사용하였다. Mann-Whitney 분석을 통해 데이터를 통계 분석하였다.

[211]

[212] **실험예 6. 단장증후군(Short bowel syndrome, SBS) 랫드 모델에서 약효 평가**

[213] **6-1. 단장증후군 모델의 제작**

[214] 시험 동물은 SD 랫드(Male, 투여 시 7주령, ㈜ 오리엔트바이오)를 사용하였다. 랫드는 수술 전 16 시간 동안 절식시키고, 케타민과 자일렌(3:2)을 복강 내로 주입하여 마취한 후 중앙 복부를 따라 절개하였다. 핀셋과 소독 면봉으로 소장, 맹장, 및 대장을 들어내었다. 트레이츠 인대(Ligament of Treitz)로부터 40 cm 거리 위치의 공장(Jejunum) 부분에서부터 맹장(Cecum)으로부터 1 cm 거리 위치의 Proximal colon까지(60 % 소장, 맹장 포함) 절제한 후, 공장과 결장에 대해 End-to-end 문합을 시행하였다. 소장을 제자리에 위치시키고 체액 소생을 위해 복강 내에 멸균 식염수 5 ㎖을 넣고 2-0 Silk 봉합사로 봉합하였다. 또한, 수술 후 감염 예방을 위해 200 mg/kg 앰피실린을 피하에 주사하였다.

[215]

[216] **6-2. 투여 방법**

[217] 시험물질 및 양성대조물질(Liraglutide, Teduglutide)은 체중을 근거로 개체별 투여량을 각각 환산하였으며, 체중 kg당 1 ㎖의 투여량으로 피하(Subcutaneous, s.c.) 투여하였다. 디자인된 시험군은 하기 표 8에 나타내었다.

[218] [표8]

Group	Intestinal injury model	Control / Test article		Injection Interval	Dose (mg/kg)	Total dose for 2 week (mg/kg)	Number of rats
G1	Sham	Negative control	PBS	Daily	—	—	8
G2	SBS	Vehicle Control	PBS	Daily	—	—	8
G3		Positive control	Teduglutide	Daily	1	14	8
G4			Teduglutide +Liraglutide	Daily	1+1	14+14	8
G5		Test article	HU003K7FA	Once a week (Day 2, 9)	3.5	7	8
G6				Once a week (Day 2, 9)	7	14	8
G7				2 times a week (Day 2, 5, 9, 12)	3.5	14	8
	Total						56

[219] **6-3. 조직병리학적 분석**

[220] 조직병리 및 H&E 염색(Hematoxylin & Eosin 염색)을 통해 융모 높이(Villus height), 움 깊이(Crypt depth), 및 점막 두께(Mucosal thickness)를 측정하였다. 먼저, 십이지장, 공장, 대장 조직을 10 % 중성완충포르말린용액(10 % buffered neutral formalin)에 고정하였다. 고정된 조직을 일정한 두께로 삭정한 다음, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4~5 ㎛의 조직절편을 제작하였다. 조직 절편에 대해서 H&E 염색을 실시하여 각 조직의 조직병리학적 소견을 관찰하고, 공장, 십이지장의 융모 높이, 움 깊이, 및 점막 두께, 및 대장의 움 깊이를 측정하였다.

[221] 융모 높이에 대한 계산 식은 다음과 같다: 융모 높이(μm) = 점막 두께 - 움 깊이

[222]

[223] **6-4. DNA 및 단백질 함량 측정**

[224] 십이지장과 공장 점막의 DNA 및 단백질 함량을 측정하였다. 장 점막 DNA는 냉동 조직으로부터 QIAZEN사의 Dneasy Blood & Tissue Kit를 이용하여 추출하고 측정하였다. 장 점막 단백질은 Thermo Scientific사의 Pierce BCA protein assay kit를 이용하여 추출하여 측정하였다. 각 방법은 제조사의 키트 사용법에 따라 수행되었다.

[225]

[226] **실시예 1. 팔미트산 결합 위치에 따른 지속형 GLP-1/GLP-2 펩타이드의 활성 분석**

[227] 상기 실험예 1-2의 방법에 의해 합성된 지속성 펩타이드를 GLP-1R/CHO

세포와 GLP-2R/CHO 세포에 각각 반응시켜 cAMP 증가를 유도하는지 확인하였다. cAMP의 증가가 유도된 세포를 파쇄하여 세포 내 cAMP 증가량을 ELISA 방법으로 정량하였다. 각 시험군 및 대조군에 대한 시험을 함께 수행하여 대비 활성을 확인하였다. 활성 결과의 정확성을 확보하기 위하여 각 펩타이드에 대하여 3회 이상 반복 시험을 수행하였다. 한편, 팔미트산이 결합 가능한 라이신은 최대 9개였는 바, 라이신을 9개까지 추가 및 합성함으로써 팔미트산이 결합된 지속형 GLP-1/GLP-2 펩타이드의 활성을 측정하였다.

[228] 표 9에 라이신 개수에 따른 활성 평가 결과, HU003 펩타이드에 라이신 7개를 추가하였을 때가 가장 높은 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

[229] 결과적으로, HU003K7FA가 GLP-1에서 GLP-1 활성이 약 20.4 %, GLP-2 활성이 90.3 %로 가장 높은 활성을 보였으며, HU003K5FA가 다음으로 높은 활성을 보였다. 이에, HU003K7FA 및 HU003K5FA의 양성 대조군과의 비교 결과를 도 6에 나타내었다.

[230] [표9]

Peptides	Relative GLP-1 (Exendin-4) % (n=5)	Relative GLP-2 % (n=5)
Exendin-4	100±17.4 %	-
GLP-2	-	100±42.3 %
HU003	12.8±4.4%	128.5±53.6%
HU003K2FA	5.5±1.4%	5.9±2.4%
HU003K3FA	6.3±2.0%	12.0±4.0%
HU003K5FA	11.0±4.1%	53.7±15.7%
HU003K7FA	20.4±10.4%	90.3±35.6%
HU003K9FA	8.9±0.9%	51.3±21.1%

[231]

[232] **실시예 2. 세포 증식 평가(Cell proliferation assay) 결과 확인**

[233] 지속형 GLP-1/GLP-2 펩타이드 후보물질 2종(HU003K5FA, HU003K7FA)과 양성 대조물질로서 GLP-2 제제인 Teduglutide, GLP-1 제제인 Liraglutide, 그리고 Teduglutide + Liraglutide를 CCD-18co 세포와 Caco-2 세포를 이용하여, 장 상피세포 증식 유도효과를 확인하였다. Caco-2 세포의 성장은 약물처리를 하지 않은 CM 처리 대조군의 세포성장을 100 %로 하여 약물처리군의 세포성장을 대조군 대비 세포가 증가한 정도로 계산하였다.

[234] 표 10 및 도 7에 나타난 바와 같이, 시험결과 약물 농도를 100 nM로 처리 했을 때, Liraglutide는 대조군 대비 99.9 ±7.6 %, Teduglutide는 대조군 대비 106.0 ±3.7

%, Teduglutide + Liraglutide를 병용 처리한 군은 대조군 대비 107.6 ±1.8 %였다. 본 발명의 지속형 펩타이드 HU003K5FA를 처리한 군은 103.6 ±5.4 %, HU003K7FA를 처리한 군은 113.0 ±1.0 %으로 확인되었다.

[235] 또한, 약물농도를 250 nM로 처리 했을 때, Liraglutide는 109.18 ±5.6 %, Teduglutide는 115.7 ±6.2 %, Teduglutide + Liraglutide를 병용 처리한 군은 112.4 ±3.6 %, HU003K5FA를 처리한 군은 122.2 ±9.9 %, HU003K7FA를 처리한 군은 125.1 ±11.7 %만큼 대조군 대비 세포 증식이 증가한 것을 확인하였다.

[236] 약물농도를 1000 nM로 처리 했을 때, Liraglutide는 109.5 ±6.4 %, Teduglutide는 120.9 ±3.8 %, Teduglutide + Liraglutide를 병용 처리한 군은 117.8 ±3.3 %, HU003K5FA를 처리한 군은 125.5 ±9.9 %, HU003K7FA를 처리한 군은 133.0 ±8.0 %만큼 대조군 대비 세포 증식이 증가한 것을 확인하였다.

[237] 따라서, 본 발명의 지속형 펩타이드 HU003K5FA 및 HU003K7FA의 장 상피세포 증식 유도효과가 100 nm에서는 양성 대조군과 비슷한 정도였으며, 250 nM 이상의 농도에서는 양성 대조군보다도 유의하게 증가된 효과를 나타낸 것을 확인하였으며, 특히 HU003K7FA의 장 상피 세포 증식 유도효과가 우수함을 확인하였다.

[238] [표10]

Peptide Conc. (Normalized to Control)	Control	Liraglutide (GLP1)	Teduglutide (GLP2)	Lira + Tedu (GLP1+GLP2)	HL Candidate 1	HL Candidate 2
100 nM	100±2.7 %	99.9±7.6	106.0±.3.7	107.7±1.8	103.6±5.4	113.0±1.0
250 nM		109.2±5.6	115.7±6.2	112.4±3.6	122.2±9.9	125.1±11.7
1000 nM		109.5±6.4	120.9±3.8	117.8±3.3	125.5±9.9	133.0±8.0

* FCM (-) : 78.7±1.4 %
* 3회 반복 실험 하였음

[239] **실시예 3. HU003K2FA, HU003K7FA의 약물동태시험 결과 확인**

[240] Gattex(teduglutide) 또는 후보물질 HU003K2FA, HU003K7FA를 정상 랫드에 단회 정맥투여하여 혈중 지속 능력을 측정하였다.

[241] 그 결과, 도 8 및 표 11에 나타난 바와 같이, 양성대조군 teduglutide와 비교하여 혈중반감기($T_{1/2}$)가 HU003K2FA 투여군에서 10.6배, HU003K7FA 투여군에서 2.7배 증가하였으며, 혈중 평균 체류시간(MRT) 또한 HU003K2FA 투여군에서 12.6배, HU003K7FA 투여군에서 2.8배 증가하였다.

[242] [표11]

PK Parameter	$T_{1/2}$	T_{max}	C_{max}	C_0	AUC_{last}	MRT(min)	CL (mL/min/kg)
	min	min	ng/mL	ng/mL	ng/mL*min	min	mL/min/kg
Teduglutide	13.8	5	7797	12014	175037	16.2	5.7
HU003K2FA	145.9	10	9190	10875	1563897	203.6	0.5
HU003K7FA	37.7	10	10642	11994	677550	46.0	1.5

[243]

[244] **실시예 4. 정상 마우스에 미치는 효과 확인 : 1차 시험**

[245] **4-1. 체중 확인**

[246] 도 9 및 도 10에 나타난 바와 같이, 체중은 G4, 및 G5인 Liraglutide 투여군에서 가장 크게 감소했으며, HU003K5FA, HU003K7FA 투여군에서도 비슷하게 감소하는 경향을 보였다. 이는 GLP-1/GLP-2 이중작용제의 GLP-1수용체 활성화 효과에 기인한 것으로 예측하였다.

[247]

[248] **4-2. 소장 무게 확인**

[249] 본 발명의 지속형 펩타이드가 정상 마우스의 소장 무게를 증가시킴으로써, 소장 기능을 개선할 수 있는지 확인하였다.

[250] 도 11에 나타난 바와 같이, HU003K5FA, 또는 HU003K7FA 투여군 모두 vehicle 대비 소장의 무게가 증가함을 확인하였다.

[251] 도 12에 나타난 바와 같이, HU003K5FA, 또는 HU003K7FA 1 mg/kg 투여군은 teduglutide 10 mg/kg 대비 체중대비 장 무게 증가가 유의적으로 증가했으며, 이는 혈중 지속능력이 높기 때문으로 판단된다. liraglutide 투여군은 체중감소로 인해 장 무게의 증가 비율이 teduglutide와 유사하게 측정되었다.

[252] 실시예 4의 결과에 따라, 주 1~2회 투여에 적합한 제형에 부합하는 시험군을 디자인하여 실시예 5의 2차 시험을 진행하였다.

[253]

[254] **실시예 5. 정상 마우스에 미치는 효과 확인 : 2차 시험**

[255] 상기 실시예 4의 결과에 따라, 본 발명의 지속형 펩타이드를 매일 투여하지 않고 주 1회 내지 3회 투여하는 것만으로도 소장 기능을 개선할 수 있는지 확인하였다.

[256]

[257] **5-1. 체중 확인**

[258] 도 13 및 도 14에 나타난 바와 같이, Teduglutide + Liraglutide 및 HU003K7FA 투여군은 최초 투여 시에 체중이 감소 했지만, 이후 회복하여 희생 전 8일차에서는 Vehicle 대비 Teduglutide + Liraglutide 군과 HU003K7FA의 고농도 투여군에서만 체중이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 GLP-1/GLP-2 이중작용제의 GLP-1 수용체 활성화 효과에 의해 체중이 감소하는 것으로 예측되었다.

[259]

[260] **5-2. 소장 무게 확인**

[261] 도 15 및 도 16에 나타난 바와 같이, 소장 무게는 Vehicle 대비 모든 투여군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인 했으며, 특히 HU003K7FA는 용량 의존적인 차이를 나타내었다. Liraglutide의 경우 몸무게가 감소함에 따라 체중 대비 소장 무게가 더 증가한 것으로 측정되었다.

[262] HU003K7FA를 투여기간 동안 총 21 mg/kg 투여한, G6, G8, G10의 결과에서는 Tedulgutide 10 mg/kg(daily, 총 70 mg/kg 투여) 대비 소장 무게 증가 효과가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.

[263]

[264] **실시예 6. 정상 마우스에 미치는 효과 확인 : 3차 시험**

[265] 상기 실시예 5의 결과에 따라, 본 발명의 지속형 펩타이드를 Teduglutide의 1/3 용량만으로 주 1회 또는 2회 투여하는 것만으로도 소장 기능을 개선할 수 있는지 확인하였다.

[266]

[267] **6-1. 체중 확인**

[268] 도 17 및 도 18에 나타난 바와 같이, Teduglutide + Liraglutide 및 HU003K7FA 투여군은 최초 투여 시에 체중이 감소했지만, 이후 회복하여 희생 전 8일차에서는 Vehicle 대비 Teduglutide + Liraglutide 투여군에서만 체중이 감소하는 것을 확인하였다.

[269]

[270] **6-2. 소장 무게 확인**

[271] 도 19에 나타난 바와 같이, 소장 무게는 Vehicle 대비 모든 투여군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인했으며, 특히 HU003K5FA, 또는 HU003K7FA의 투여 시 용량에 의존적인 효과 차이를 확인할 수 있었다.

[272] 도 20에 나타난 바와 같이, 체중 대비 소장 무게의 경우 주 2회 HU003K5FA를 투여하는 G7과 HU003K7FA를 주 1회 투여하는 G8의 결과에서 높은 효과가 나타나는 것으로 확인되었다. 소장 무게 변화의 경우, 동일 용량 대비 HU003K5FA보다 HU003K7FA가 12 % 정도 높은 효능을 보임을 확인하였다.

[273] 상기 결과를 토대로, 효과가 가장 우수한 HU003K7FA를 단장증후군 치료 후보물질로 최종 선정하였으며, 단장증후군 모델에서의 효력 시험을

진행하였다.

[274]

[275] **실시예 7. 단장증후군 모델에 대한 치료 효과 확인**

[276] **7-1. 체중 확인**

[277] 본 발명의 지속형 펩타이드 투여에 따른 단장증후군 모델의 체중 변화를 평가하였다.

[278] 도 21 및 도 22에 나타난 바와 같이, 단장증후군 모델(G2)은 소장의 십이지장을 50-60 % 제거하고, 그리고 회장과 맹장 전체를 제거하기 때문에 전체적으로 체중이 감소하였다. 이에 반해, 본 발명명의 지속형 펩타이드 HU003K7FA를 2주간 투여한 G5 내지 G7은 기존 약물인 Teduglutide 또는 Teduglutide + Liraglutide 투여군 대비 몸무게가 월등히 증가하는 것을 확인하였다.

[279]

[280] **7-2. 소장 무게 확인**

[281] 상기 지속형 펩타이드 투여에 따른 몸무게의 증가가 소장 무게의 증가에 의한 것임을 확인하였다.

[282] 도 23 및 도 24에 나타난 바와 같이, Teduglutide를 투여한 군에서는 소장 무게에 큰 변화가 없었다. 이에 반해, 본 발명의 지속형 펩타이드인 HU003K7FA를 주 1회 투여한 경우, Vehicle 대비 소장 무게가 14.6 %, 또는 28.0 % 증가했으며, 주 2회 투여 시, 33.9 % 증가하였다.

[283]

[284] **7-3. 소장 길이 변화 확인**

[285] 본 발명의 지속형 펩타이드 투여에 따른 소장의 길이 변화를 측정하였다.

[286] 표 12 및 도 25에 나타난 바와 같이, Teduglutide 투여군(G3)에서는 소장의 길이 및 무게가 거의 증가하지 않았지만, HU003K7FA 투여군(G5 내지 G7)에서는 Vehicle 대비 소장 길이가 약 10 % 정도 유의미하게 증가하는 경향을 보였다. 한편, Teduglutide + Liraglutide 투여군(G4)은 소장 길이는 증가시키지만, 소장 무게는 오히려 감소시켜 단장 증후군의 치료에 적합하지 않음을 확인하였다.

[287] [표12]

Group	Control / Test article		Injection Interval	Total dose (mg/week)	Intestine length (cm)	Intestine Weight (g)	Vehicle 대비 소장 무게 증가율
G1	Negative control	PBS	Daily	-	106.0±6.4	14.8±1.5	-
G2	Vehicle Control	PBS	Daily	-	58.4±4.5	15.1±1.9	-
G3	Positive control	Teduglutide	Daily	14	59.6±7.3	15.2±1.4	0.5 %
G4		Teduglutide +Liraglutide	Daily	14+14	63.9±4.5	14.2±1.3	- 6.2 %
G5	Test article	HU003K7FA	Once a week	7	62.2±5.0	17.3±4.3	14.6 %
G6			Once a week	14	65.6±5.1	19.3±2.3	28.0 %
G7			2 times a week	14	64.6±6.4	20.2±3.7	33.9 %

[288] **7-4. 소장에서의 단백질 및 DNA 함량 비교 결과 확인**

[289] 본 발명의 지속형 펩타이드 투여에 따른 소장의 DNA 및 단백질 함량 증가를 평가하였다.

[290] 도 26 및 도 27에 나타난 바와 같이, Duodenum(십이지장)의 경우 Vehicle 대비 HU003K7FA를 3.5 mg/kg 주 2회 투여한 군에서 DNA 및 Protein량이 증가하는 것을 확인하였다.

[291] 한편, Jejunum(공장)의 경우 Vehicle 대비 Teduglutide를 투여한 군에서는 단백질 및 DNA가 오히려 감소했지만, HU003K7FA를 투여한 군에서 Vehicle 투여군 대비 DNA 및 Protein량이 월등히 증가하는 것을 확인하였다.

[292]

[293] **7-5. 소장의 조직병리학적 분석 결과 확인**

[294] 본 발명의 지속형 펩타이드 투여에 따른 장 조직 형성 효과를 확인하기 위하여, 소장의 조직병리학적 변화를 평가하였다.

[295] 먼저, 도 28에 나타난 바와 같이, H&E 염색을 통해 십이지장, 공장 및 대장을 포함하는 조직을 염색하였다. 도 28의 결과를 바탕으로 도 29 및 도 30의 조직병리학적 분석을 수행하였다.

[296] 도 29에 나타난 바와 같이, Duodenum(십이지장)의 경우 융모 높이(villus height)가 Vehicle 대비 Teduglutide는 6.2 % 가량 증가했으며, HU003K7FA의 총 용량을 14 mg/week로 투여했을 때, 주 2회 제형(G7)은 16.1 %, 1회 제형(G6)은 14.5 % 증가하였다.

[297] 도 30에 나타난 바와 같이, Jejunum(공장)의 경우 융모 높이가 Vehicle 대비 Teduglutide는 18.3 % 가량 증가했으며, HU003K7FA의 총 용량을 14 mg/week로 투여했을 때, 주 2회 제형(G7)은 31.4 %, 1회 제형(G6)은 42.6 %만큼 크게 증가하였다.

[298] 이는 본 발명의 HU003K7FA가 양성 대조군 대비 강력한 장 조직 형성 촉진

효과를 가짐을 나타내는 결과이다.

[299]

[300] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[301]

산업상 이용가능성

[302] 본 발명의 지방산-펩타이드 유도체는 기존 약물 대비 생체 내 우수한 효력 지속 효과를 가지고, 단장증후군 동물 모델에서 우수한 치료 효과를 나타내는바, 장질환, 장손상, 및 위질환의 예방, 개선 및 치료에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

청구범위

[청구항 1] 하기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드에 지방산이 결합된 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드는 N 말단, C 말단, 또는 그 중간 사슬에 지방산이 결합된 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[일반식]

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열-Kn

(상기 일반식에서, K는 라이신(Lysine)이며, n은 1 내지 10의 정수이다.)

[청구항 2] 제1항에 있어서,

상기 지방산은 C12 내지 C22의 포화 지방산 또는 불포화 지방산인 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 3] 제1항에 있어서,

상기 n은 2 내지 9의 정수인 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 4] 제1항에 있어서,

상기 지방산은 C 말단에 결합되는 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 5] 제1항에 있어서,

상기 일반식으로 표시되는 폴리펩타이드는 서열번호 2 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 6] 제1항에 있어서,

상기 지방산-펩타이드 유도체는 생체 내 반감기($t_{1/2}$)가 2시간 이상인 것을 특징으로 하는, 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 7] 제1항의 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서,

상기 장질환은 단장증후군, 과민성 장질환, 염증성 장질환, 크론씨병, 결장염, 대장염, 췌장염, 회장염, 점막염 및 장 위축으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 9] 제8항에 있어서,

상기 장질환은 단장증후군인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 10] 제7항에 있어서,

상기 위질환은 위경련, 위염, 위궤양, 십이지장염, 및 십이지장궤양으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 지방산-펩타이드 유도체는 주 당 0.1 내지 200 mg/kg 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 12] 제7항에 있어서,
상기 지방산-펩타이드 유도체는 소장 무게 또는 길이를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

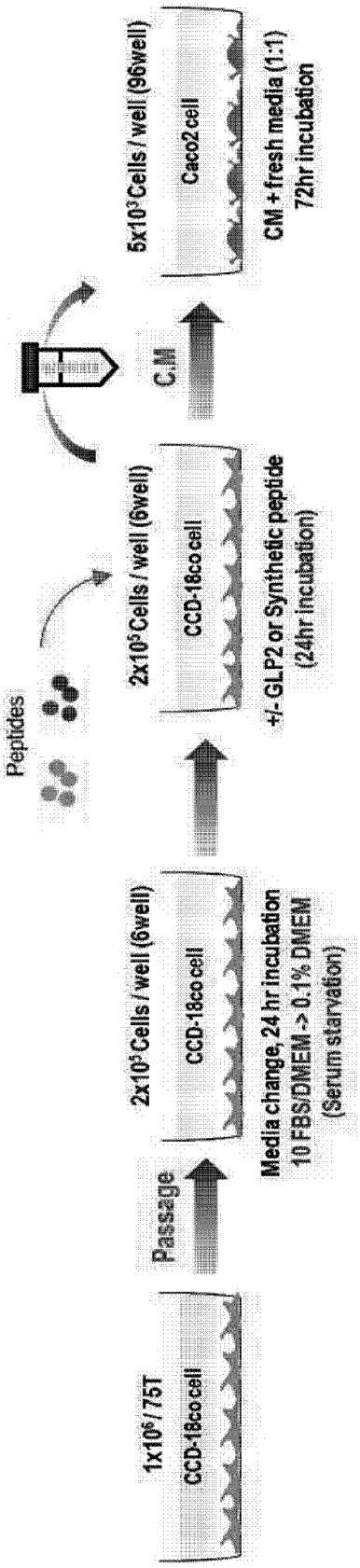
[청구항 13] 제7항에 있어서,
상기 지방산-펩타이드 유도체는 융모 높이를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 14] 제1항의 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환 예방, 치료, 또는 개선 방법.

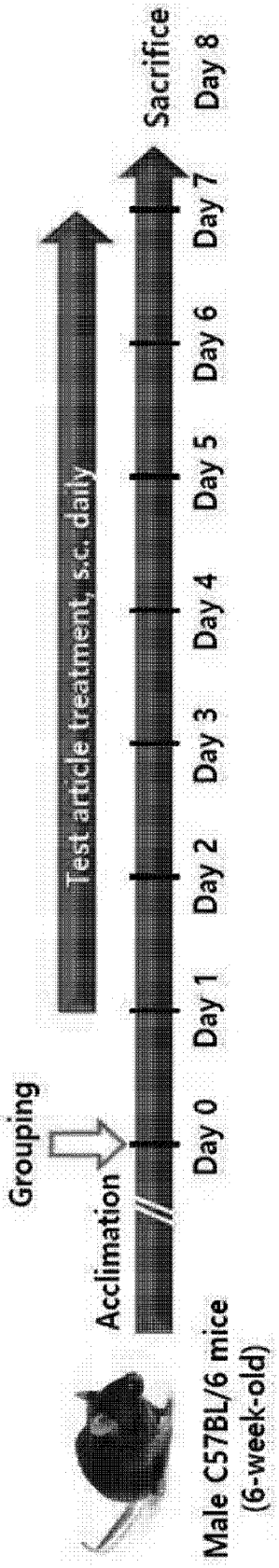
[청구항 15] 제1항의 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 예방, 치료, 또는 개선 용도.

[청구항 16] 제1항의 지방산-펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 장질환, 장손상, 및 위질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환의 치료용 약제를 제조하기 위한 용도.

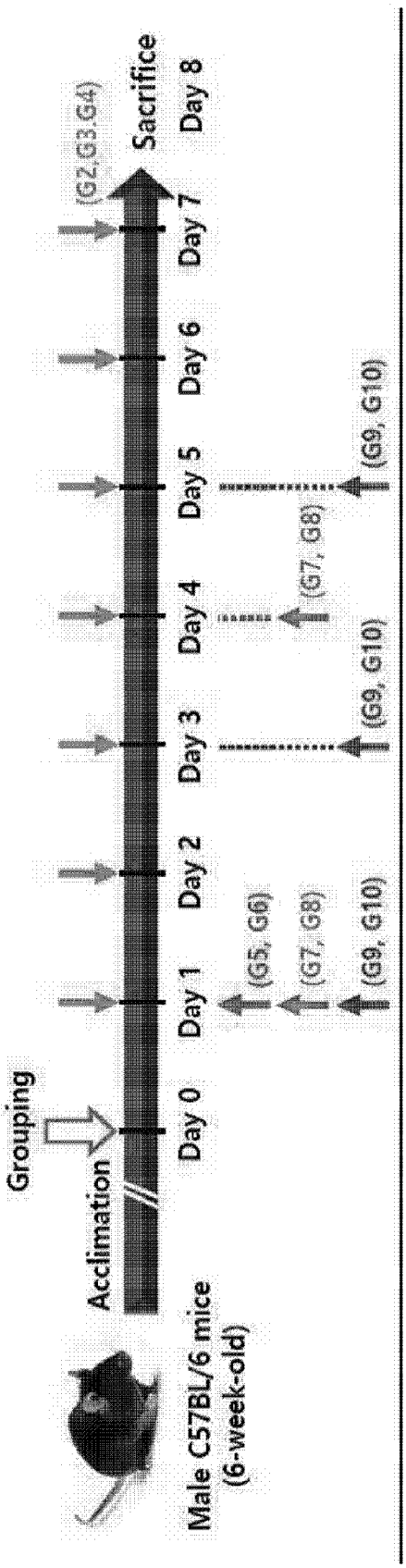
[도1]


1x10⁶ / 75T
CCD-18co cell
Passage
2x10⁵ Cells / well (6well)
CCD-18co cell
Media change, 24 hr incubation
10 FBS/DMEM -> 0.1% DMEM
(Serum starvation)
Peptides
2x10⁵ Cells / well (6well)
CCD-18co cell
+/- GLP2 or Synthetic peptide
(24hr incubation)
C.M
5x10⁵ Cells / well (96well)
Caco2 cell
CM + fresh media (1:1)
72hr incubation

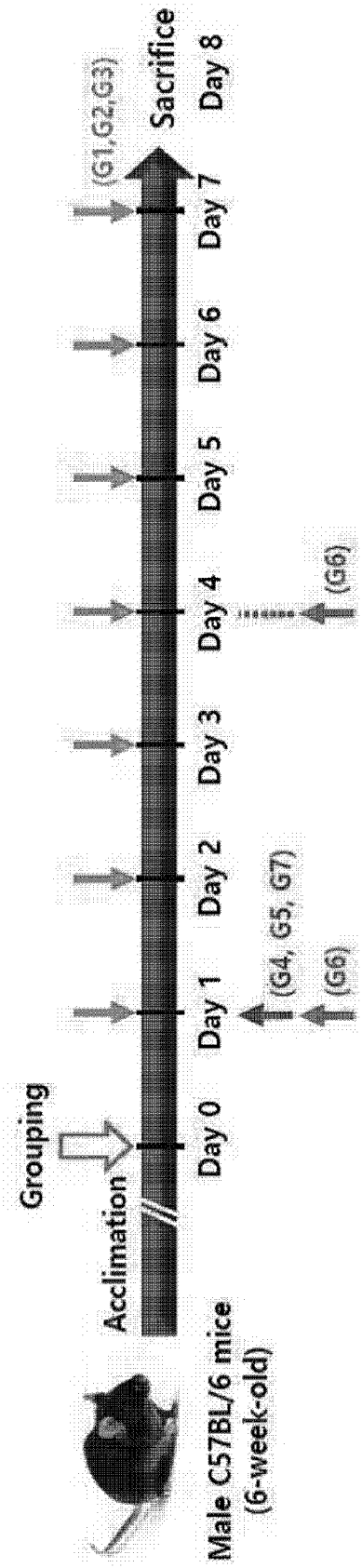
[도2]


Male C57BL/6 mice
(6-week-old)
Acclimation
Grouping
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day 8
Test article treatment, s.c. daily
Sacrifice

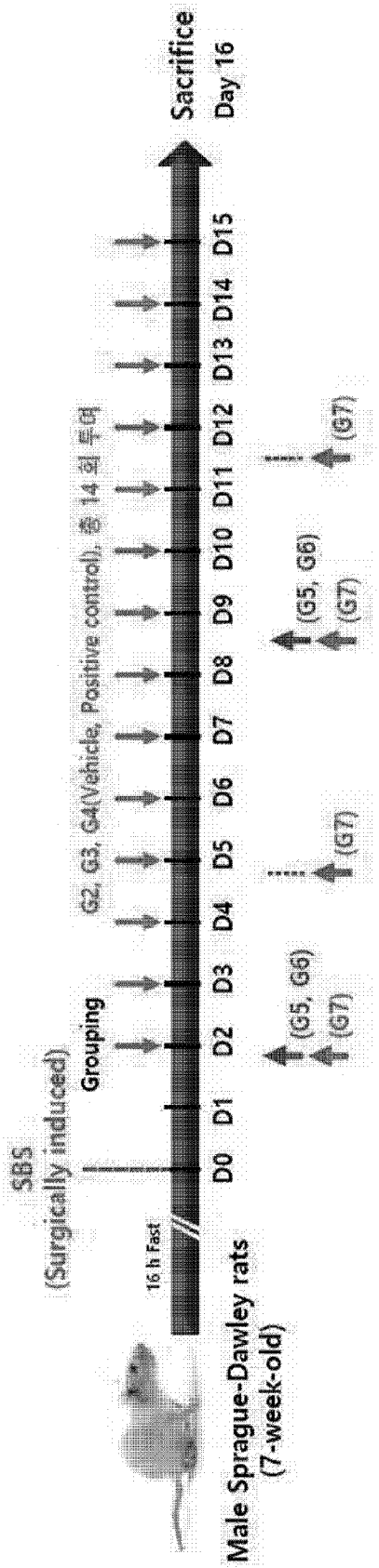
[도3]


Male C57BL/6 mice
(6-week-old)
Acclimation
Grouping
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day 8
Sacrifice
(G2,G3,G4)
(G5, G6)
(G7, G8)
(G9, G10)
(G9, G10)
(G7, G8)
(G9, G10)

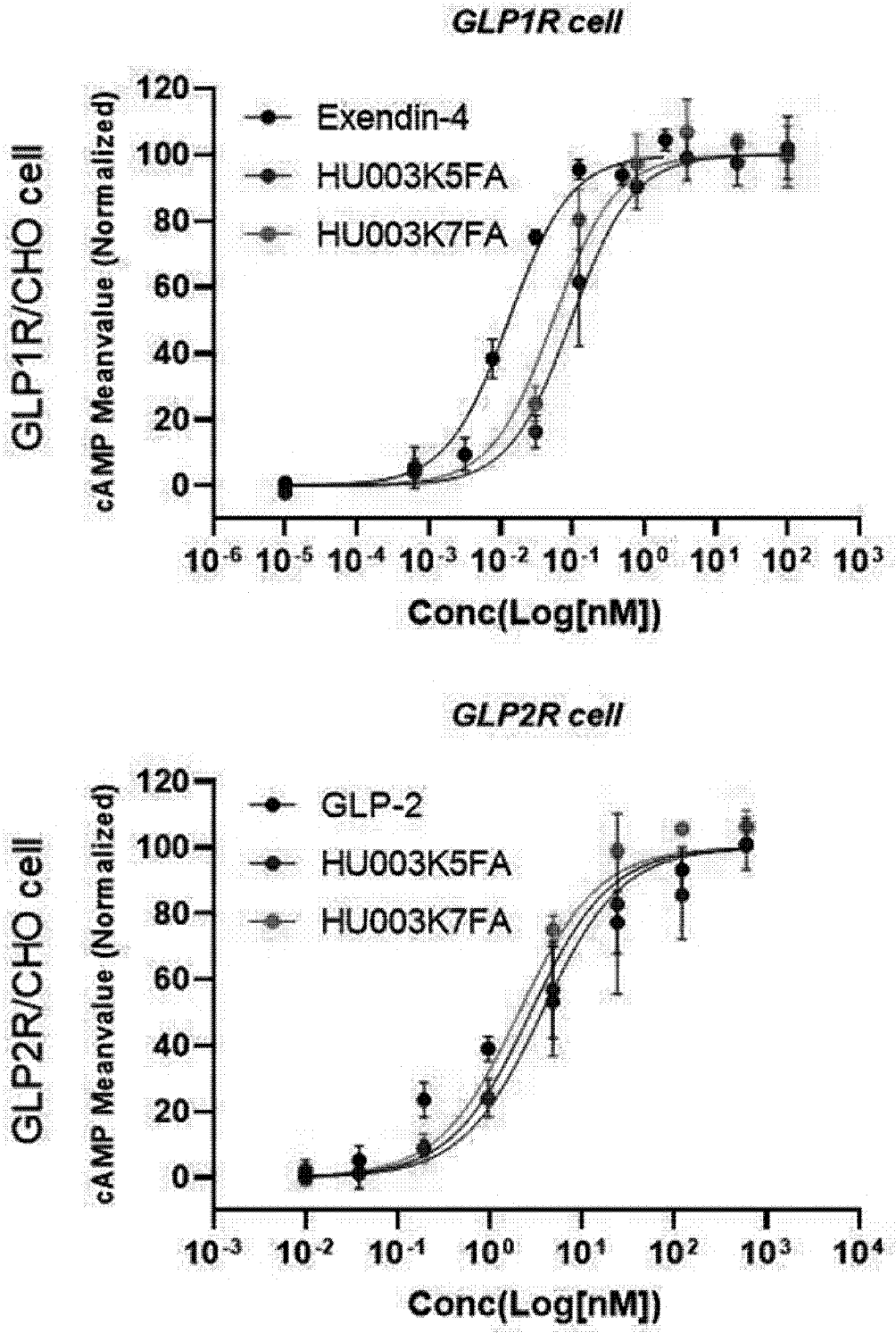
[도4]


Male C57BL/6 mice
(6-week-old)
Acclimation
Grouping
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
Day 8
Sacrifice
(G1,G2,G3)
(G4, G5, G7)
(G6)
(G6)

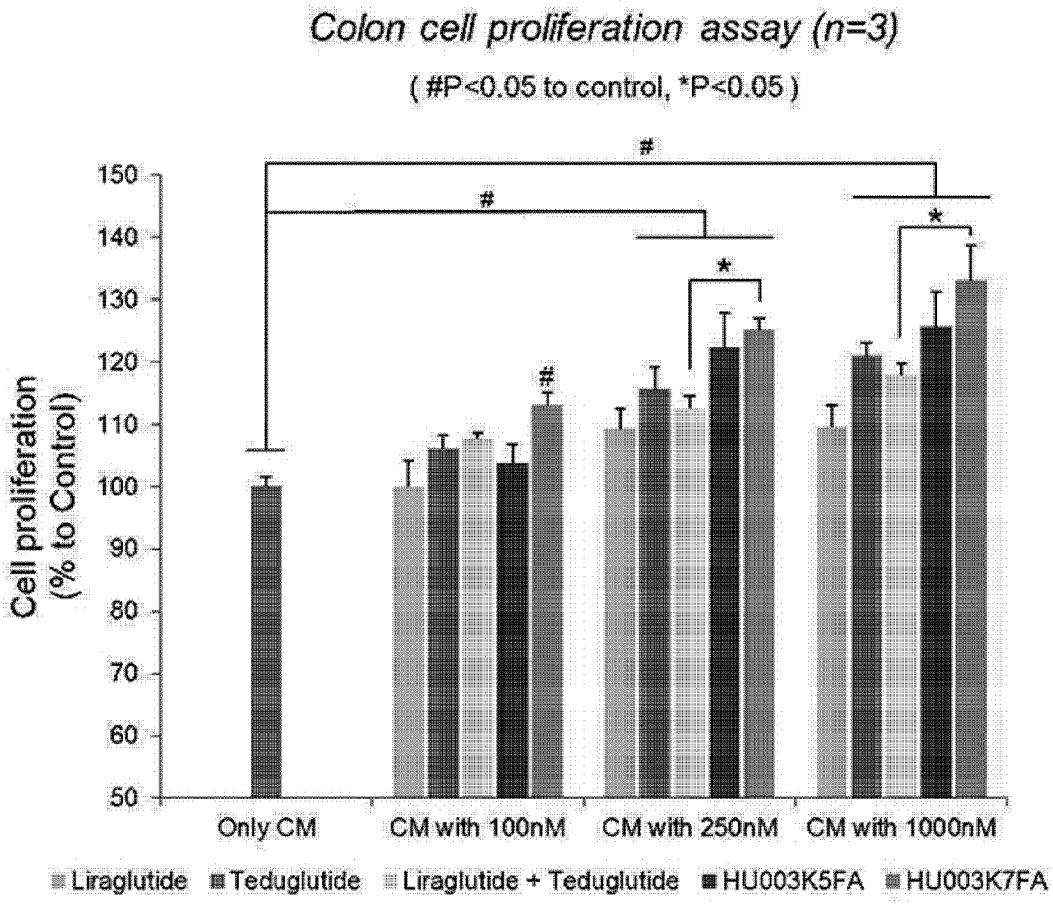
[도5]


Male Sprague-Dawley rats
(7-week-old)
16 h Fast
SBS
(Surgically induced)
Grouping
G2, G3, G4(Vehicle, Positive control), 총 14 회 투여
Sacrifice
Day 16
D0 D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10 D11 D12 D13 D14 D15
(G5, G6)
(G7)

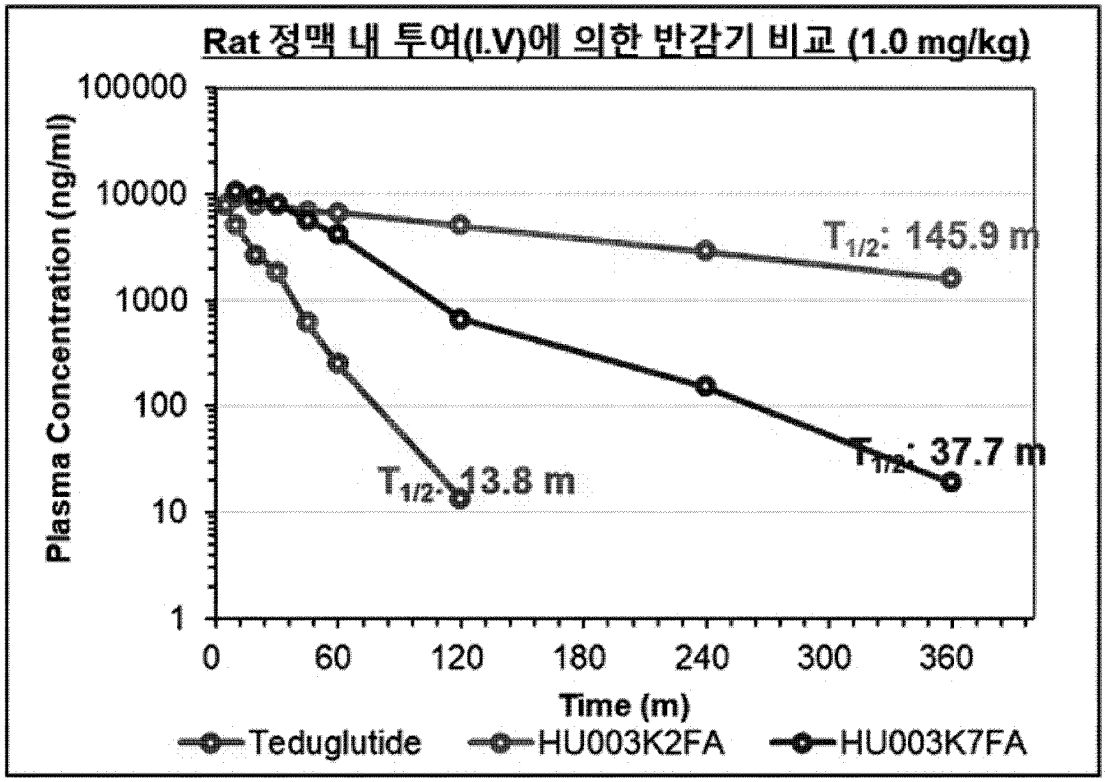
[도6]


GLP1R cell
GLP1R/CHO cell
cAMP Meanvalue (Normalized)
Exendin-4
HU003K5FA
HU003K7FA
120
100
80
60
40
20
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103
Conc(Log[nM])
GLP2R cell
GLP2R/CHO cell
cAMP Meanvalue (Normalized)
GLP-2
HU003K5FA
HU003K7FA
120
100
80
60
40
20
0
10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
Conc(Log[nM])

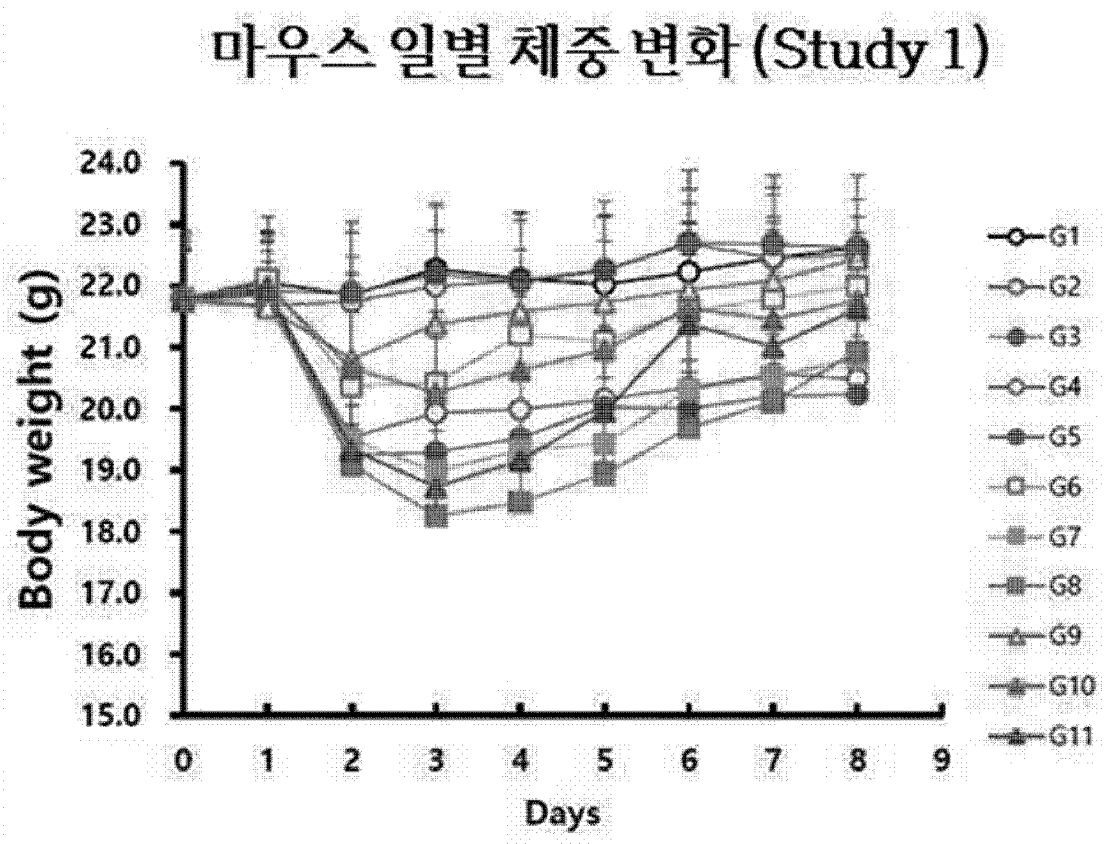
[도7]


Colon cell proliferation assay (n=3)
(#P<0.05 to control, *P<0.05)
Cell proliferation (% to Control)
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
#
#
*
*
#
Only CM
CM with 100nM
CM with 250nM
CM with 1000nM
Liraglutide
Teduglutide
Liraglutide + Teduglutide
HU003K5FA
HU003K7FA

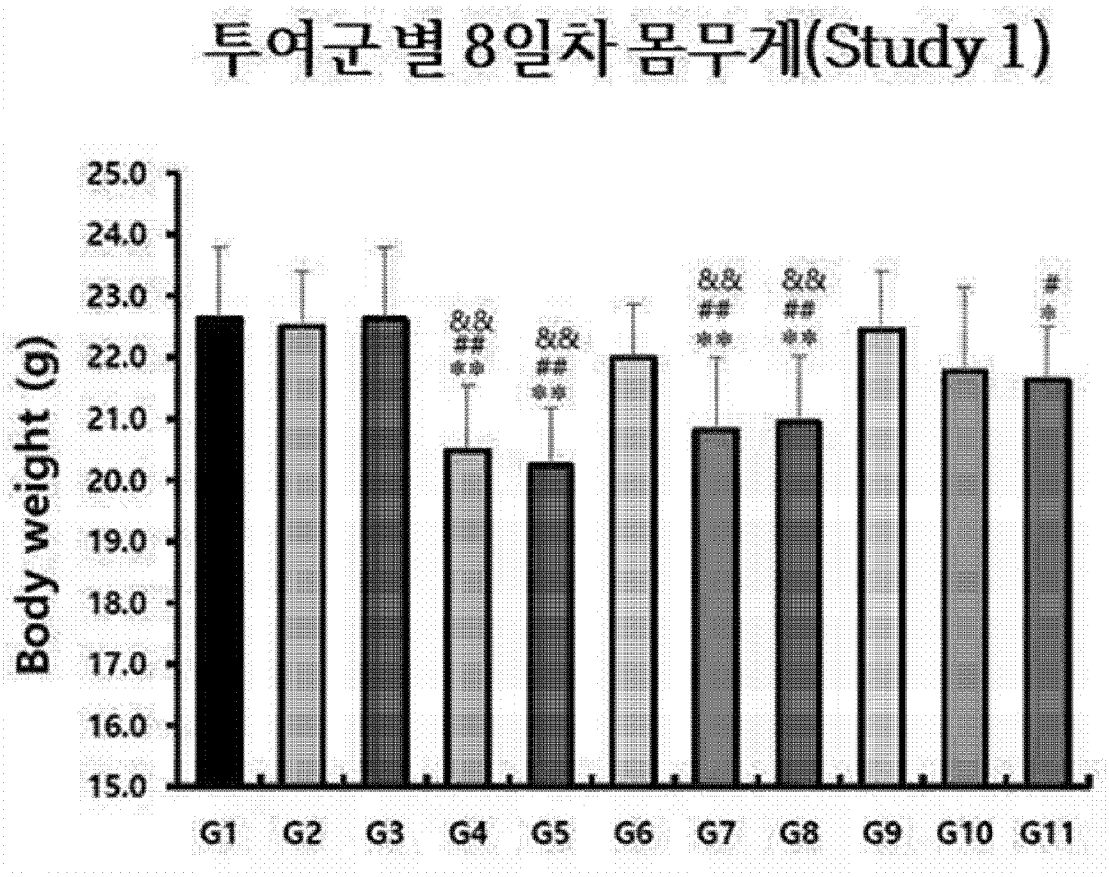
[도8]


Rat 정맥 내 투여(I.V)에 의한 반감기 비교 (1.0 mg/kg)
Plasma Concentration (ng/ml)
100000
10000
1000
100
10
1
0
60
120
180
240
300
360
Time (m)
T1/2: 145.9 m
T1/2: 37.7 m
T1/2: 13.8 m
Teduglutide
HU003K2FA
HU003K7FA

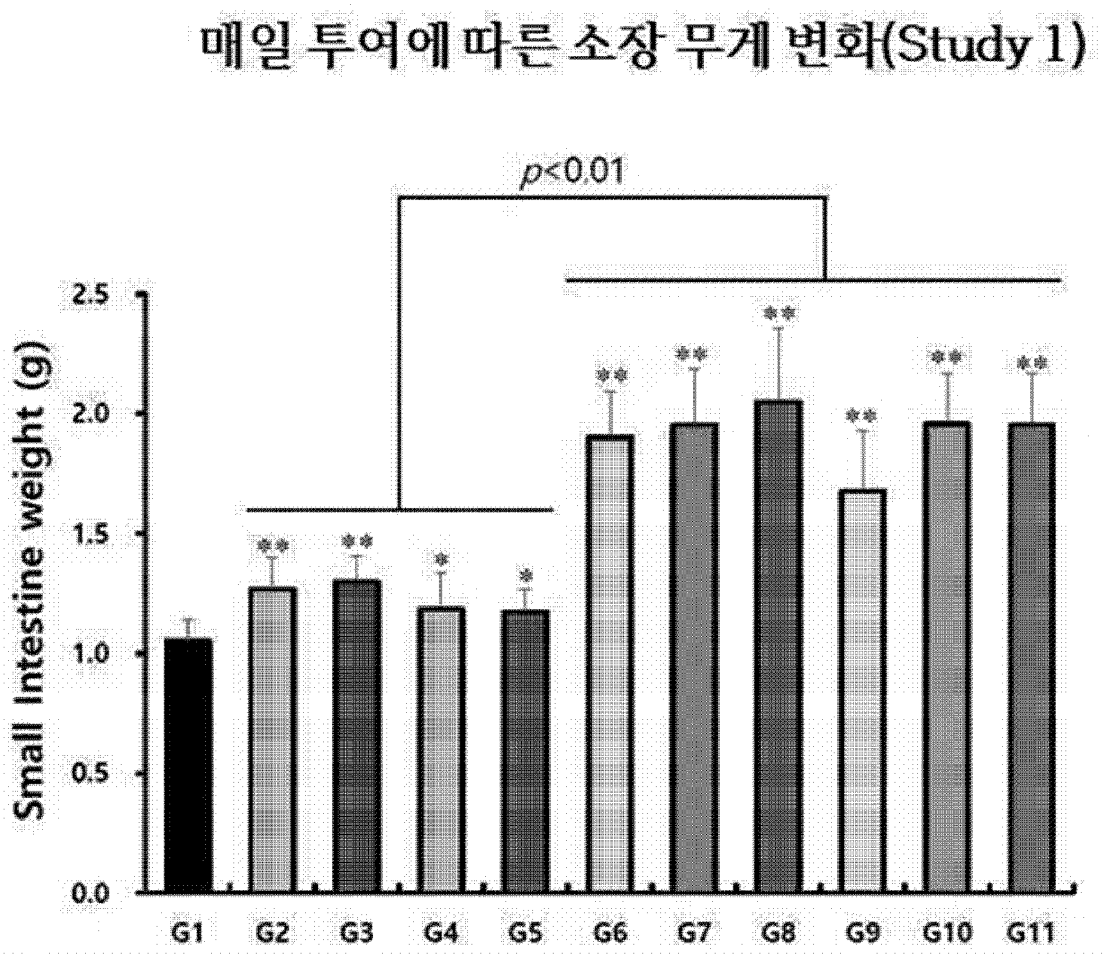
[도9]


마우스 일별 체중 변화 (Study 1)
Body weight (g)
24.0
23.0
22.0
21.0
20.0
19.0
18.0
17.0
16.0
15.0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Days
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10
G11

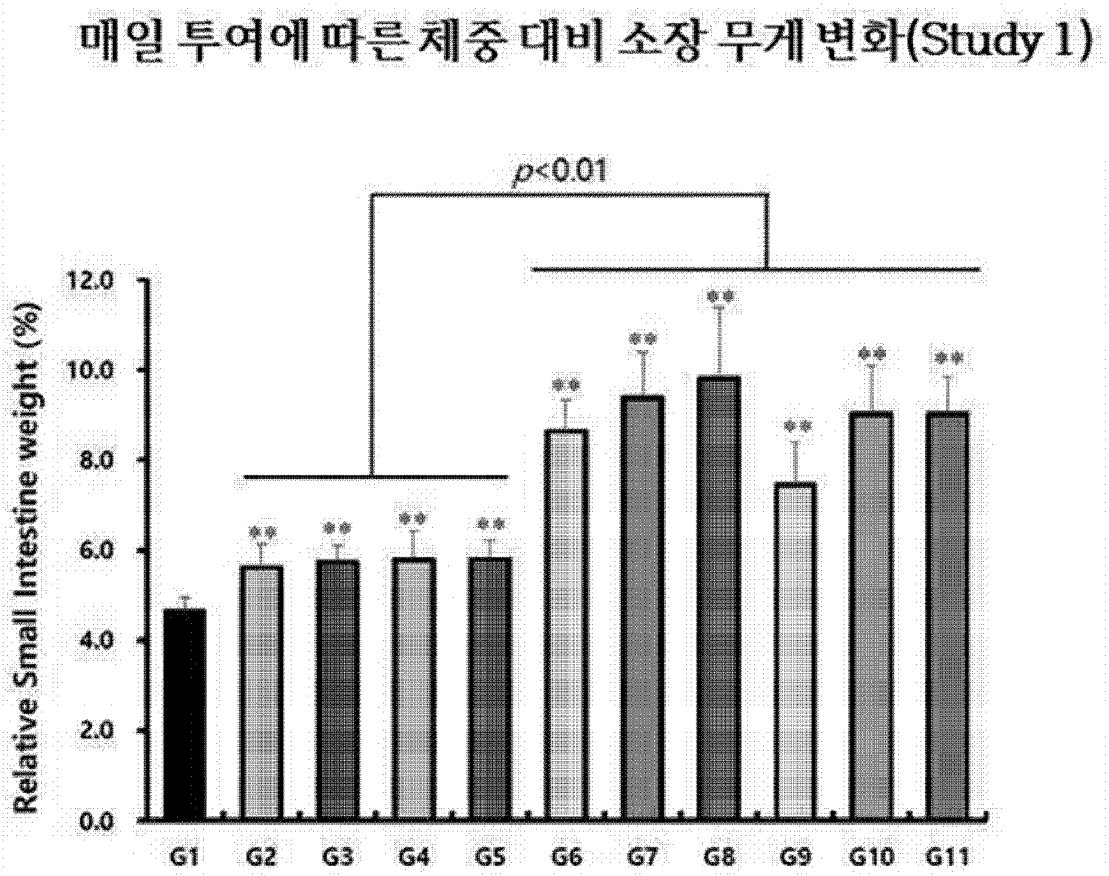
[도10]


투여군별 8일차 몸무게(Study 1)
Body weight (g)
25.0
24.0
23.0
22.0
21.0
20.0
19.0
18.0
17.0
16.0
15.0
&&
##
**
&&
##
**
&&
##
**
&&
##
**
#
*
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10
G11

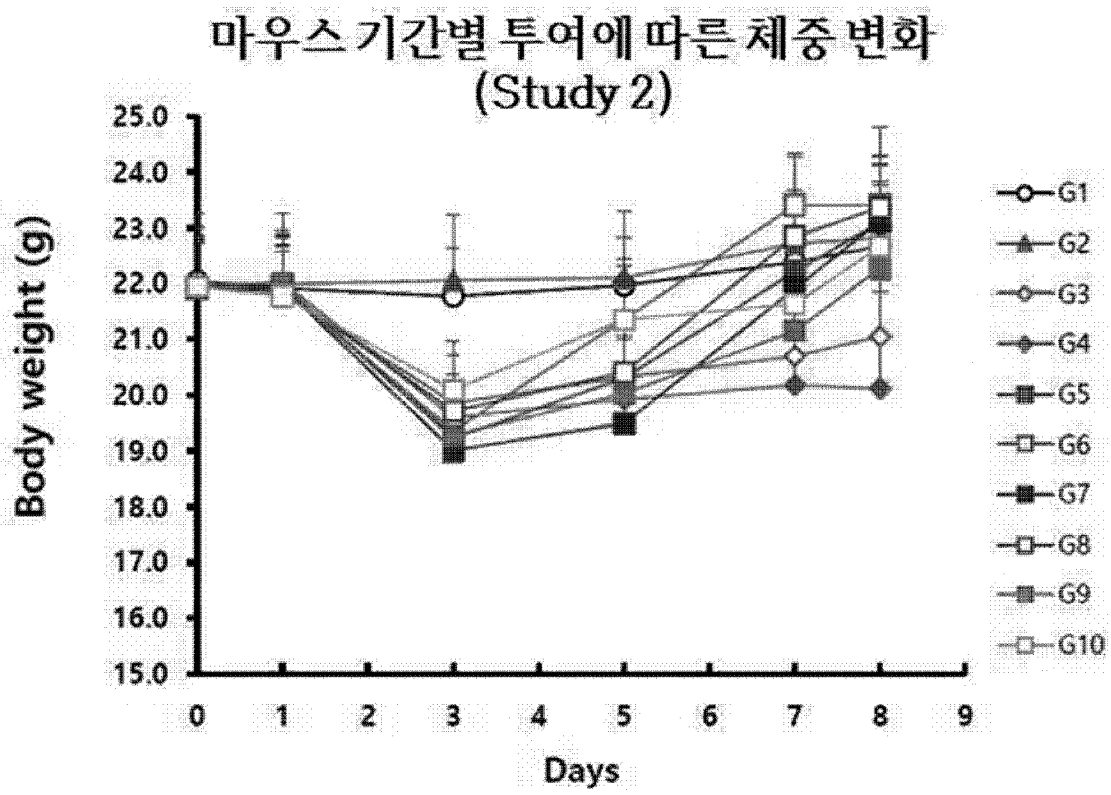
[도11]


매일 투여에 따른 소장 무게 변화(Study 1)
p<0.01
Small Intestine weight (g)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10
G11

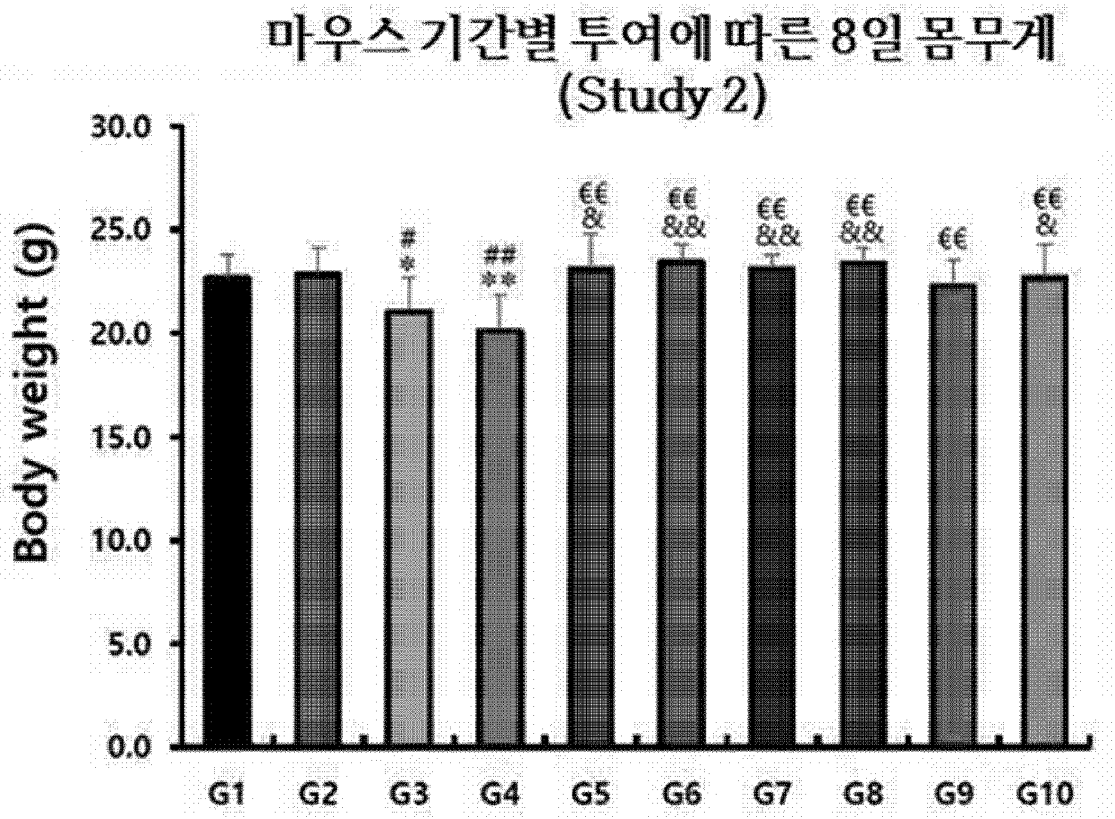
[도12]


매일 투여에 따른 체중 대비 소장 무게 변화(Study 1)
p<0.01
Relative Small Intestine weight (%)
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10
G11

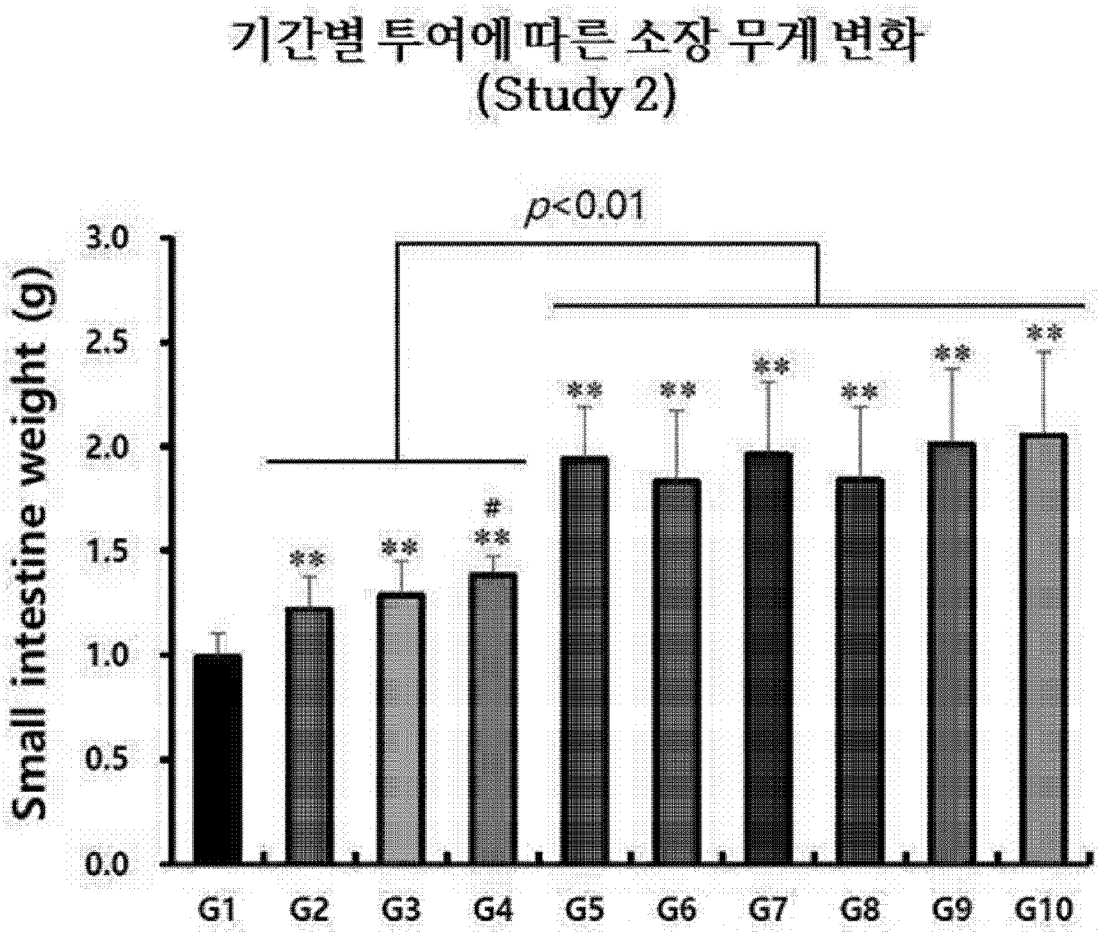
[도13]


마우스 기간별 투여에 따른 체중 변화
(Study 2)
Body weight (g)
25.0
24.0
23.0
22.0
21.0
20.0
19.0
18.0
17.0
16.0
15.0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Days
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10

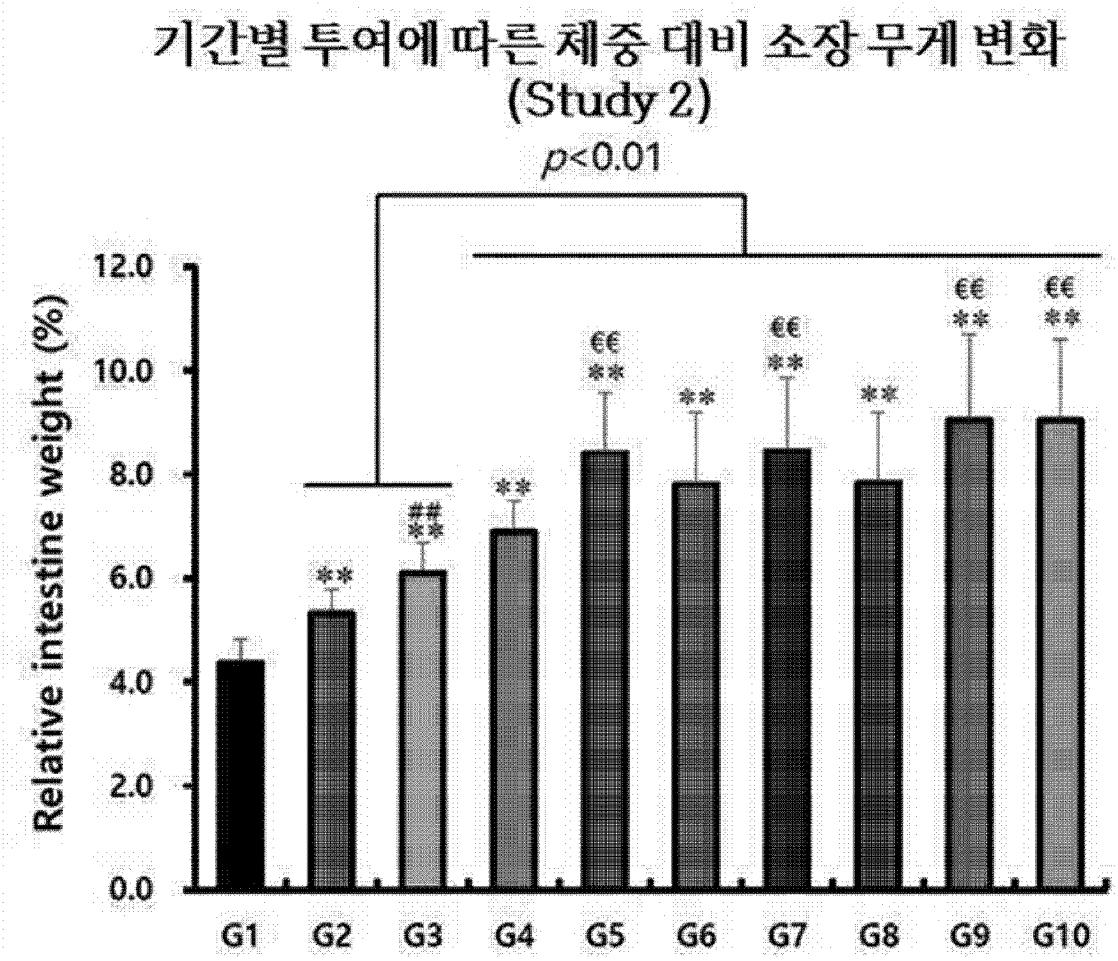
[도14]


마우스 기간별 투여에 따른 8일 몸무게
(Study 2)
Body weight (g)
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10

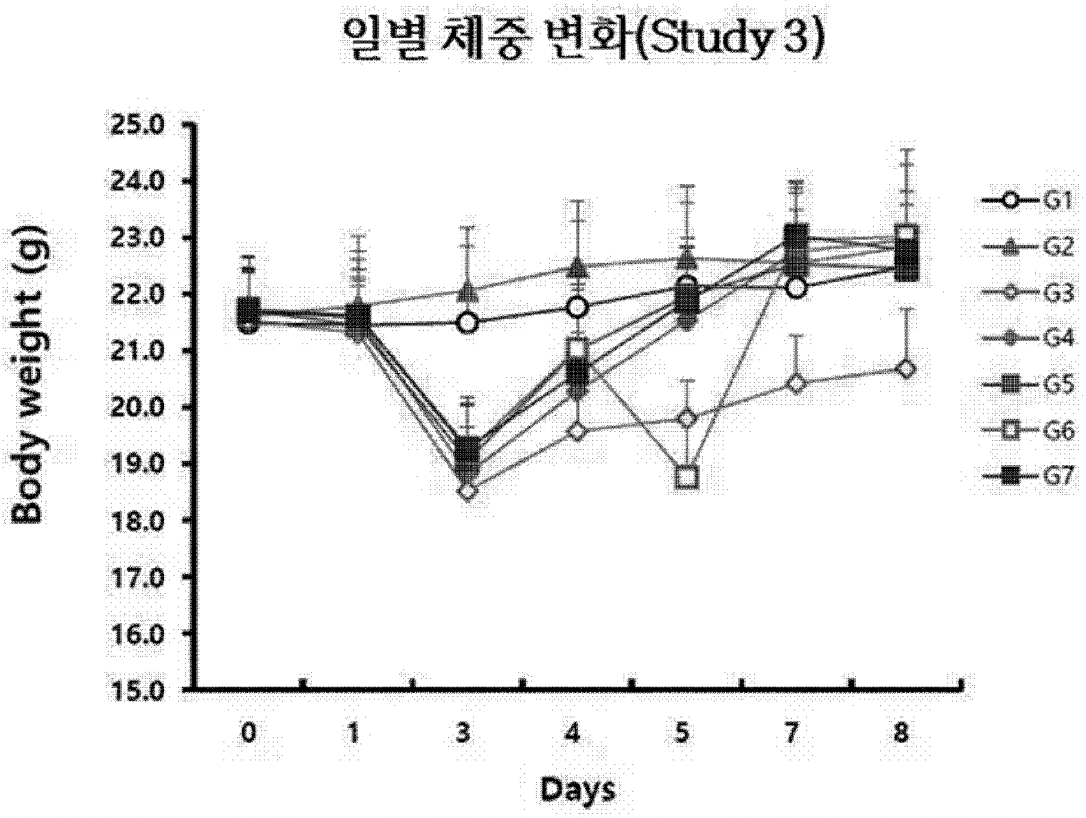
[도15]


기간별 투여에 따른 소장 무게 변화
(Study 2)
p<0.01
Small intestine weight (g)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
#
**
**
**
**
**
**
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10

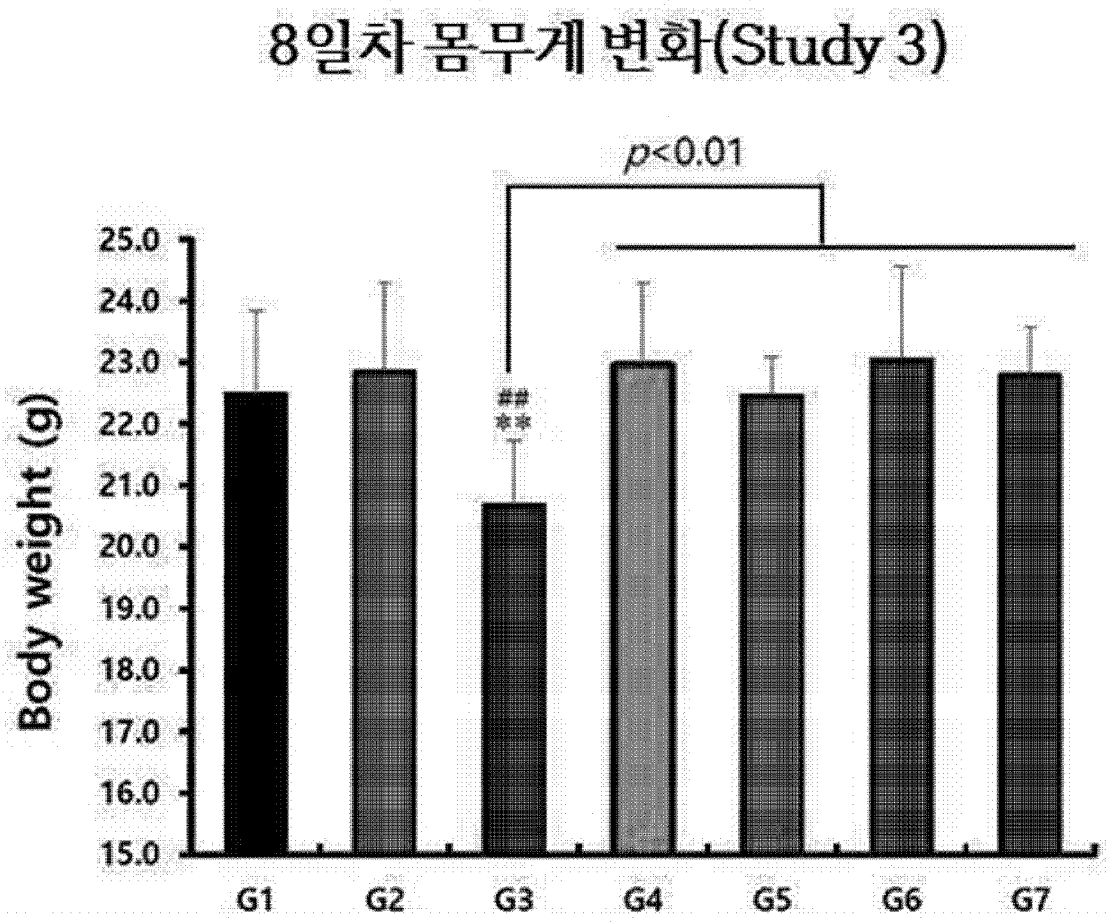
[도16]


기간별 투여에 따른 체중 대비 소장 무게 변화
(Study 2)
p<0.01
Relative intestine weight (%)
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10

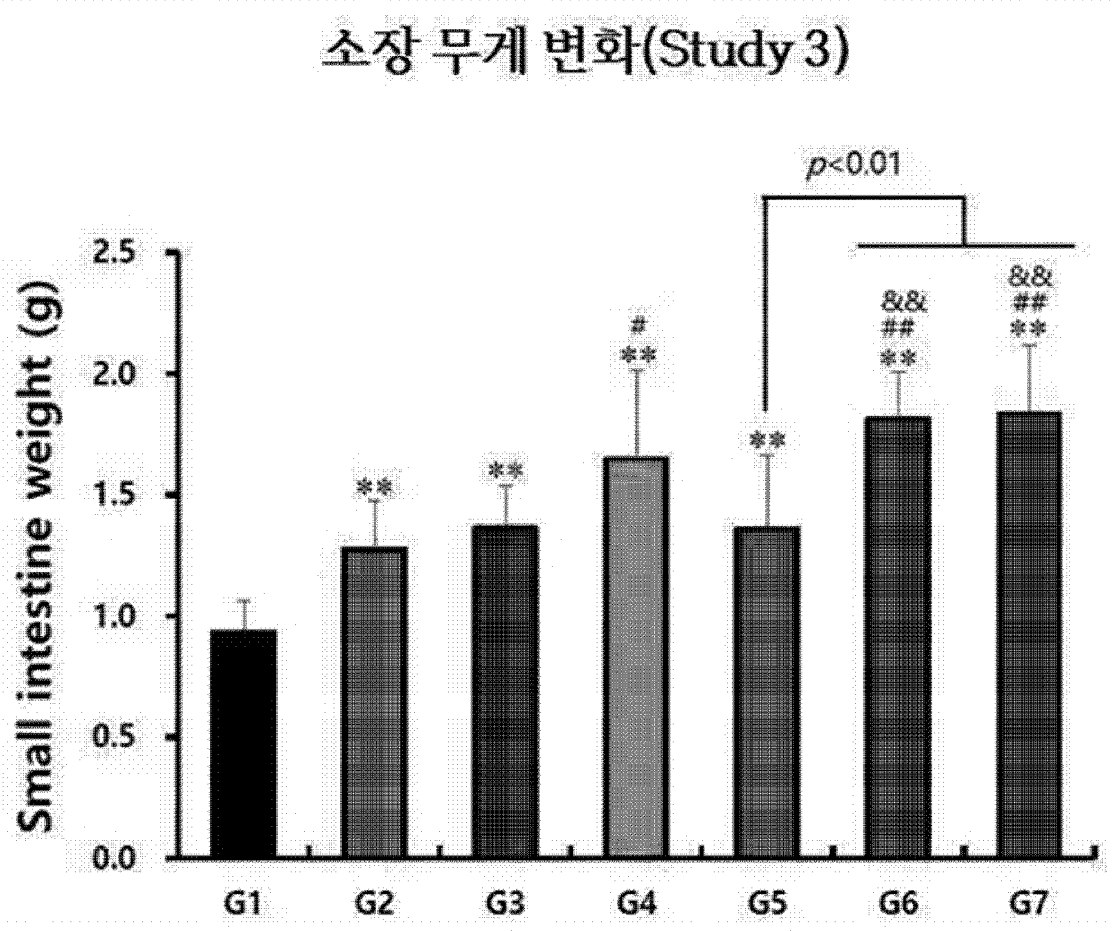
[도17]


일별 체중 변화(Study 3)
Body weight (g)
25.0
24.0
23.0
22.0
21.0
20.0
19.0
18.0
17.0
16.0
15.0
0
1
3
4
5
7
8
Days
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

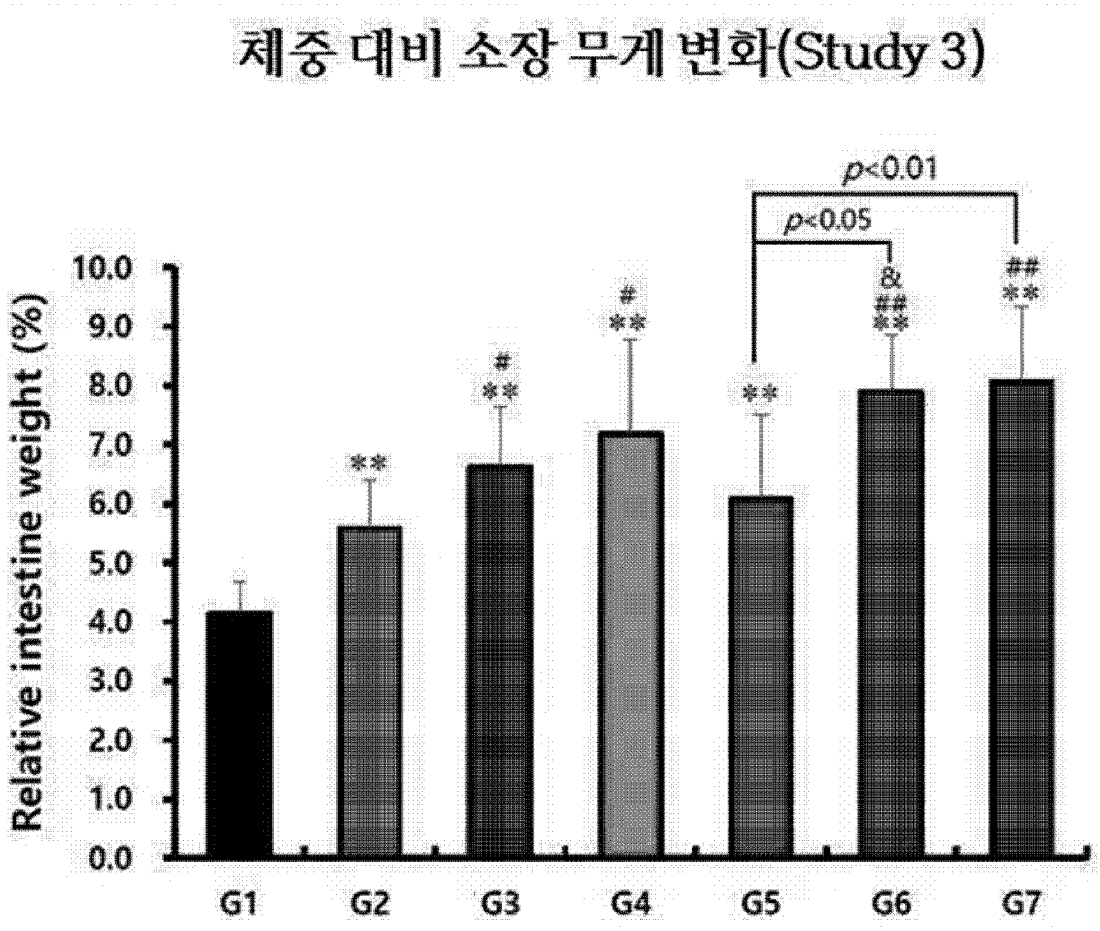
[도18]


8일차 몸무게 변화(Study 3)
p<0.01
Body weight (g)
25.0
24.0
23.0
22.0
21.0
20.0
19.0
18.0
17.0
16.0
15.0
##
**
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

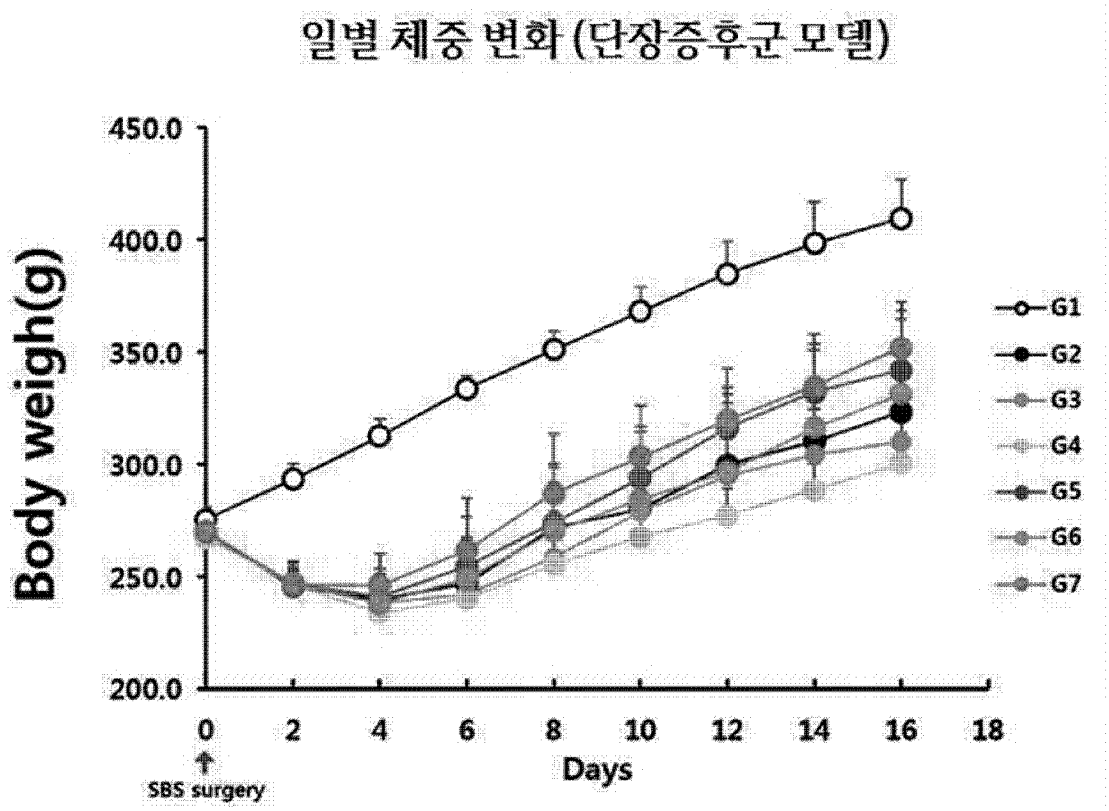
[도19]


소장 무게 변화(Study 3)
p<0.01
Small intestine weight (g)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
#
**
**
&&
##
**
&&
##
**
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

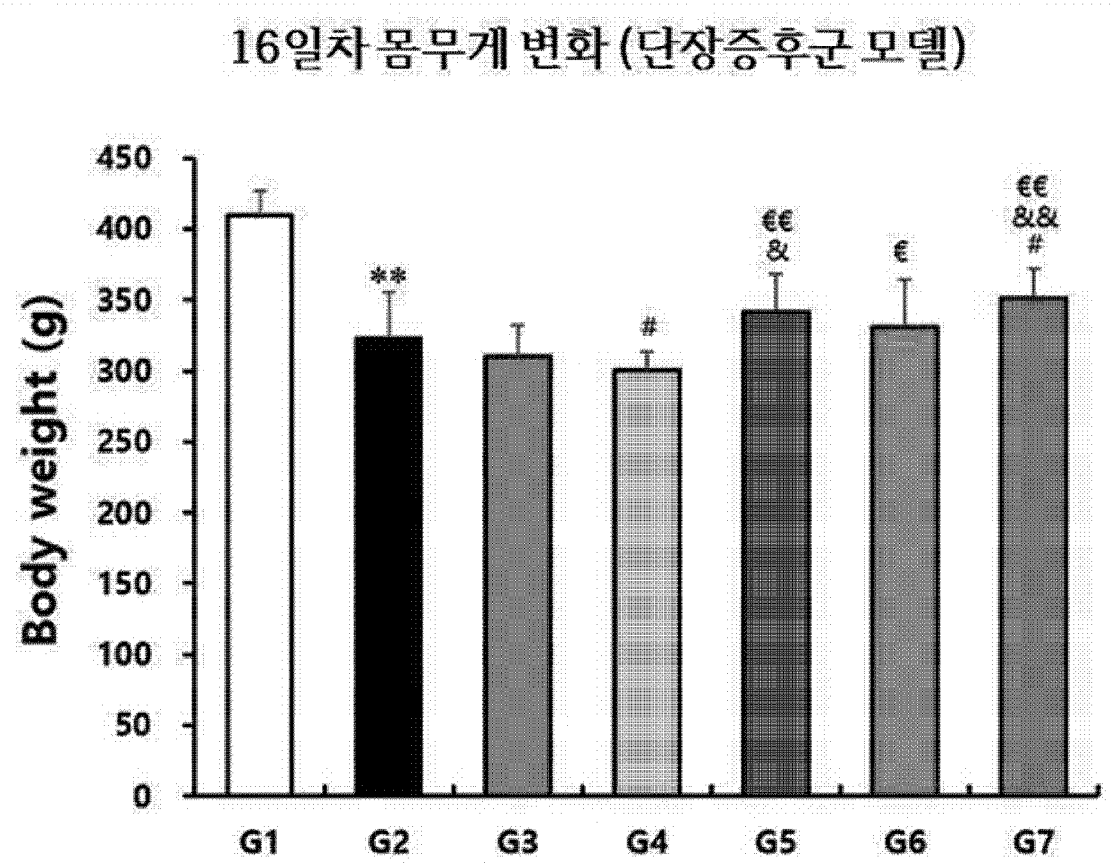
[도20]


체중 대비 소장 무게 변화(Study 3)
p<0.01
p<0.05
Relative intestine weight (%)
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
**
#
**
#
**
**
&
##
**
##
**
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

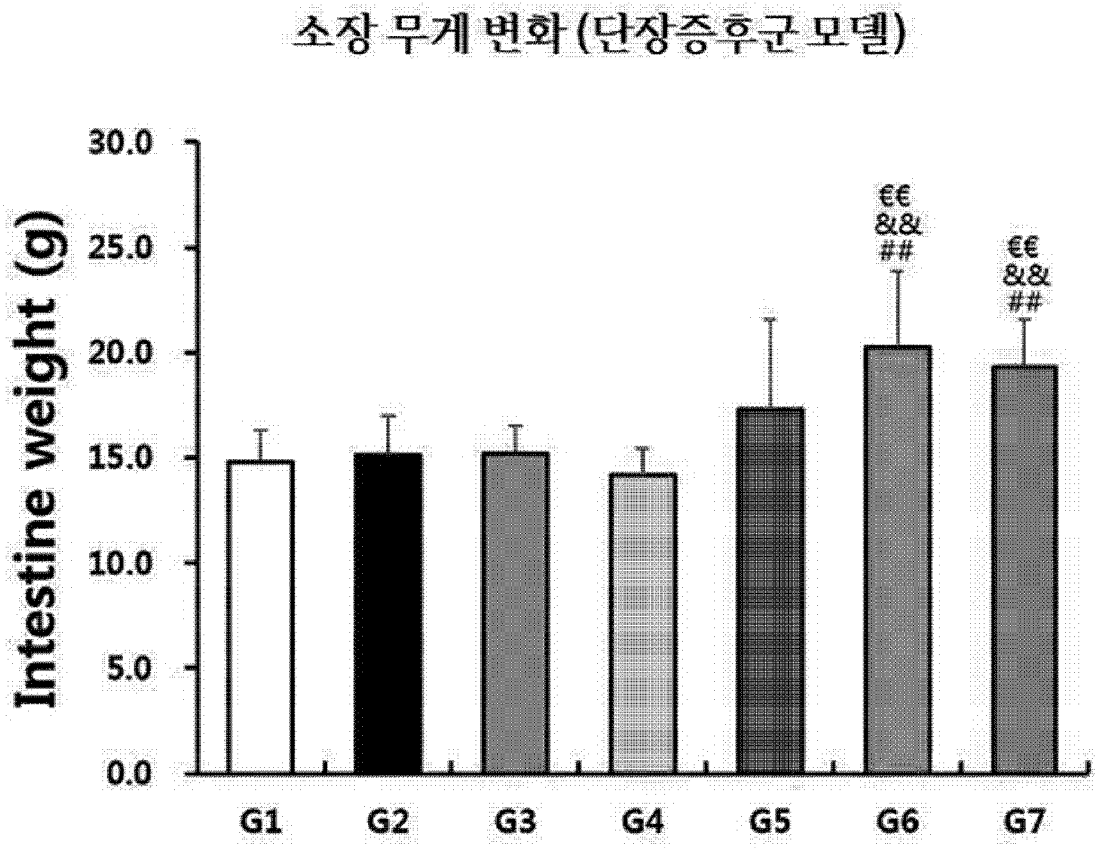
[도21]


일별 체중 변화 (단장증후군 모델)
Body weigh(g)
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Days
SBS surgery
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

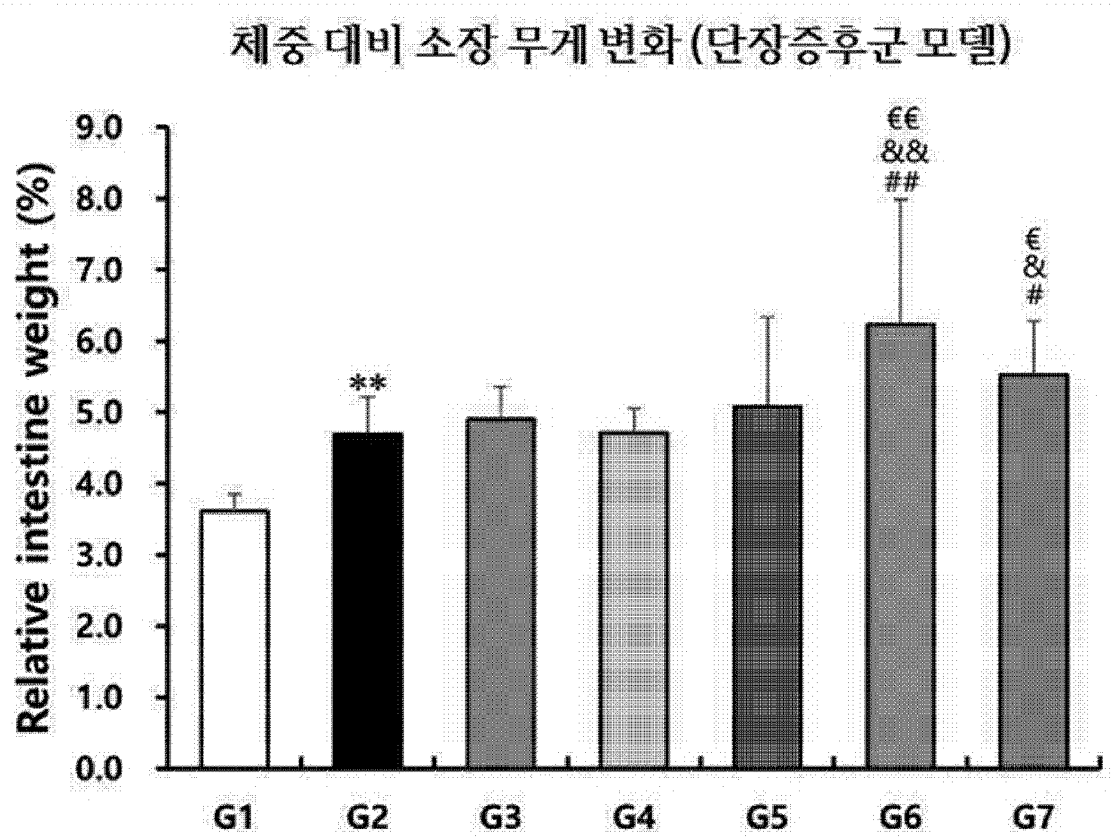
[도22]


16일차 몸무게 변화 (단장증후군 모델)
Body weight (g)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
**
#
€€
&
€
€€
&&
#
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

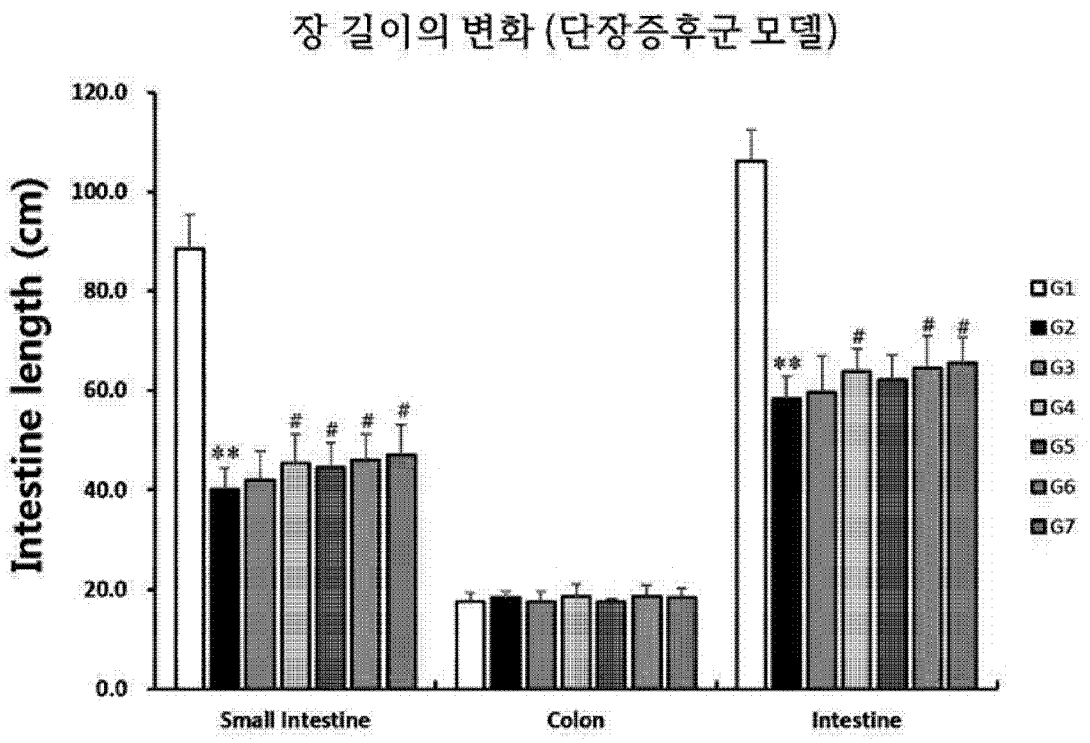
[도23]


소장 무게 변화 (단장증후군 모델)
Intestine weight (g)
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
€€
&&
##
€€
&&
##

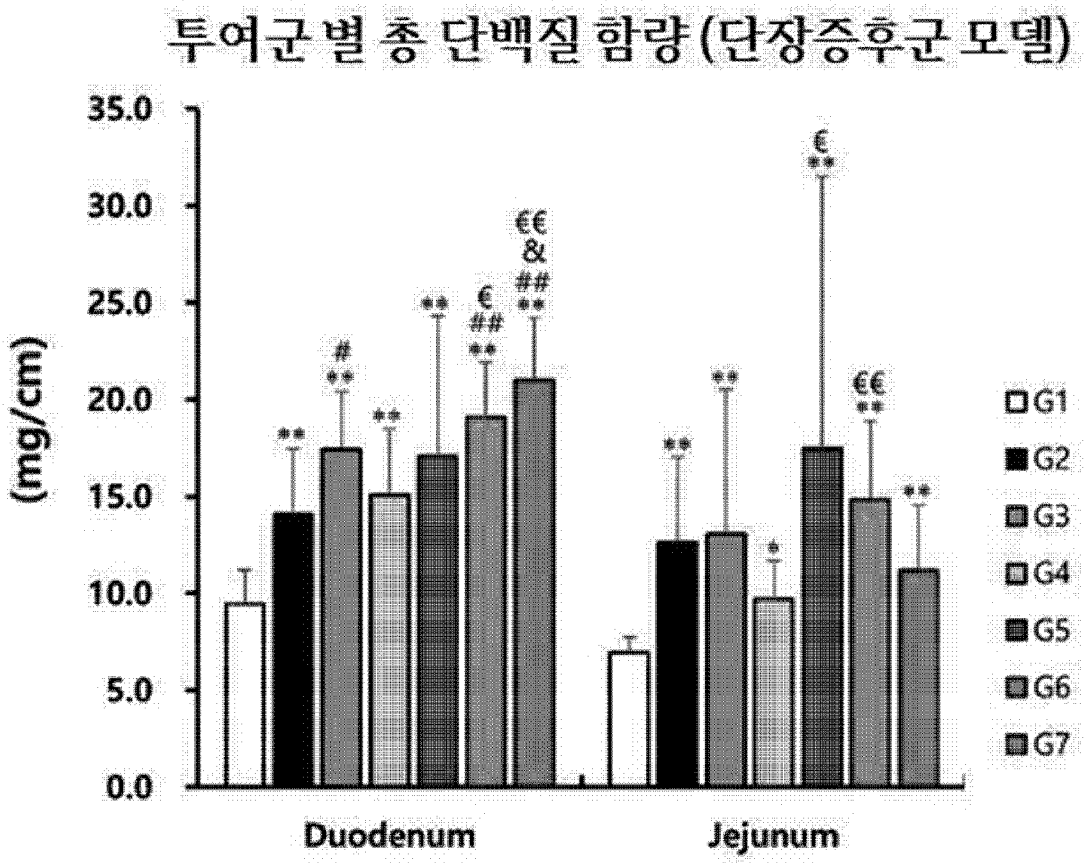
[도24]


체중 대비 소장 무게 변화 (단장증후군 모델)
Relative intestine weight (%)
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
**
€€
&&
##
€
&
#
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

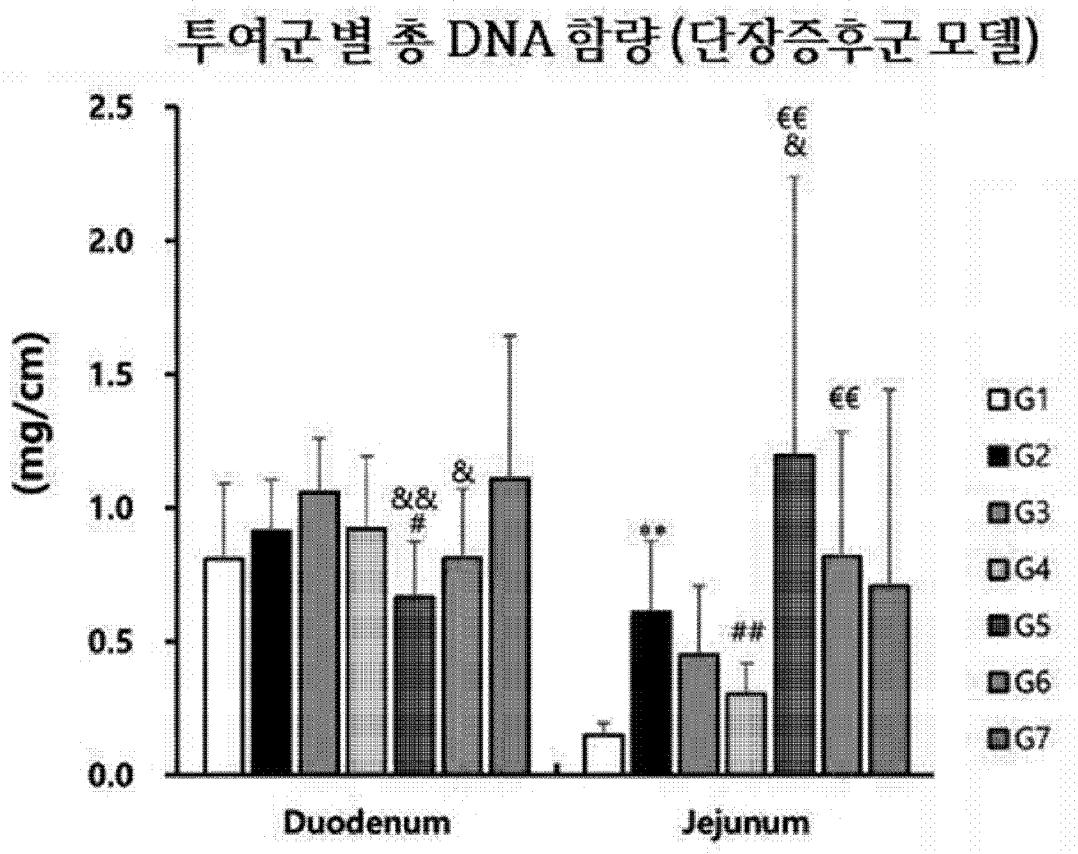
[도25]


장 길이의 변화 (단장증후군 모델)
Intestine length (cm)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
**
#
Small Intestine
Colon
Intestine
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

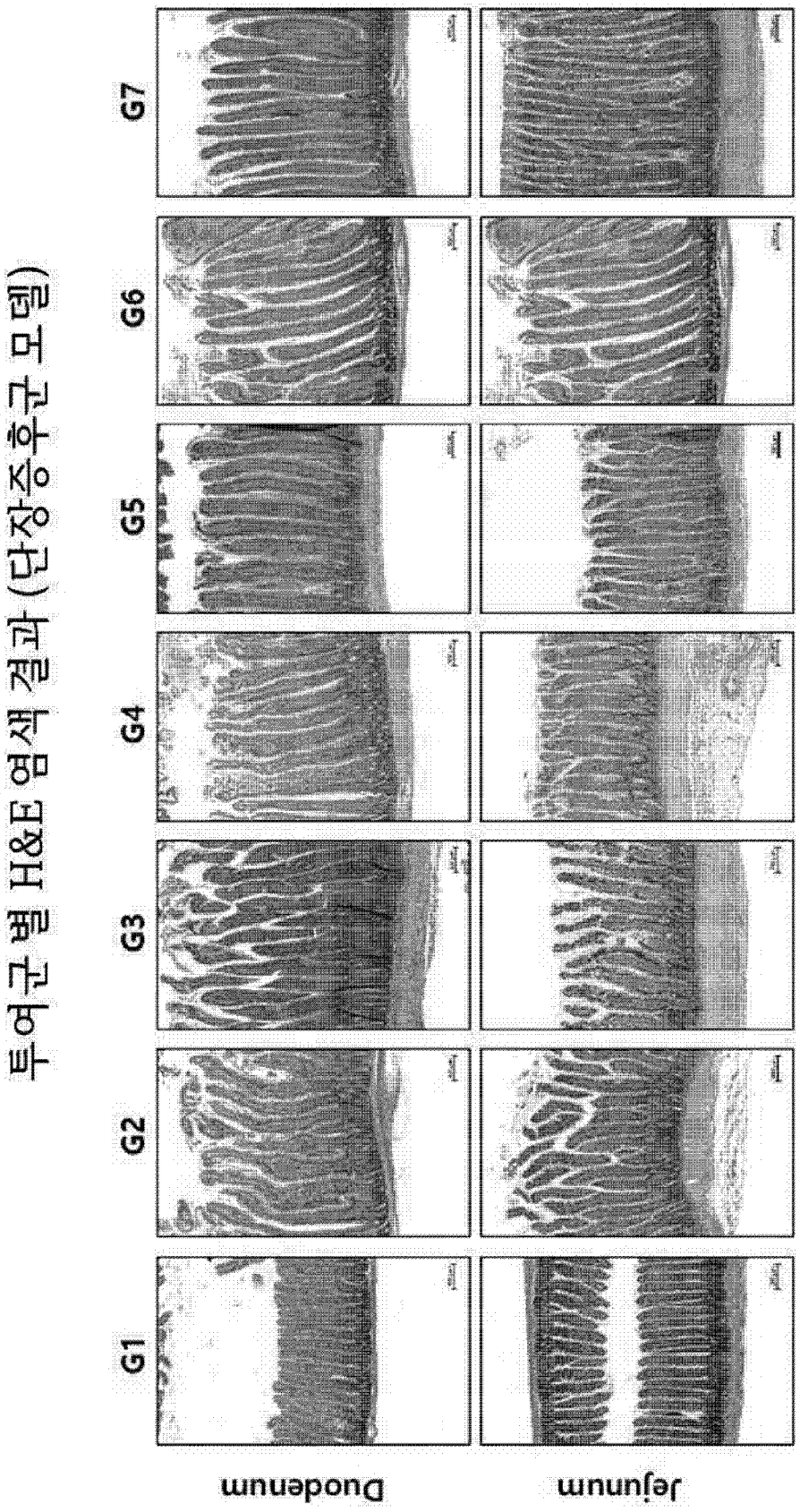
[도26]


투여군별 총 단백질 함량 (단장증후군 모델)
(mg/cm)
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Duodenum
Jejunum
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

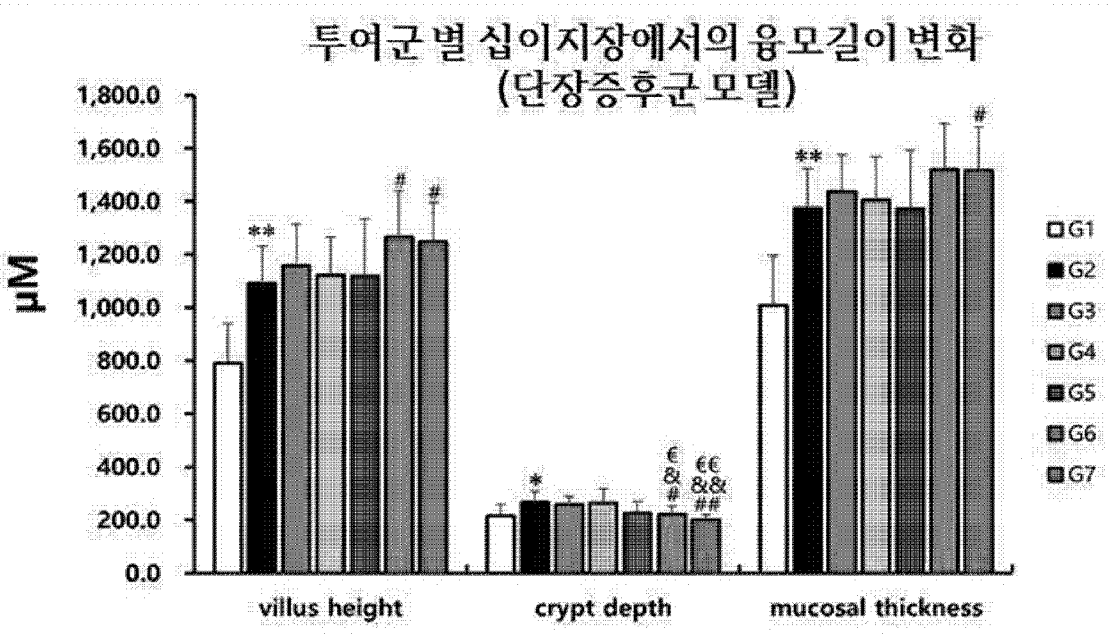
[도27]


투여군별 총 DNA 함량 (단장증후군 모델)
(mg/cm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
&&
#
&
**
##
€€
&
€€
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
Duodenum
Jejunum

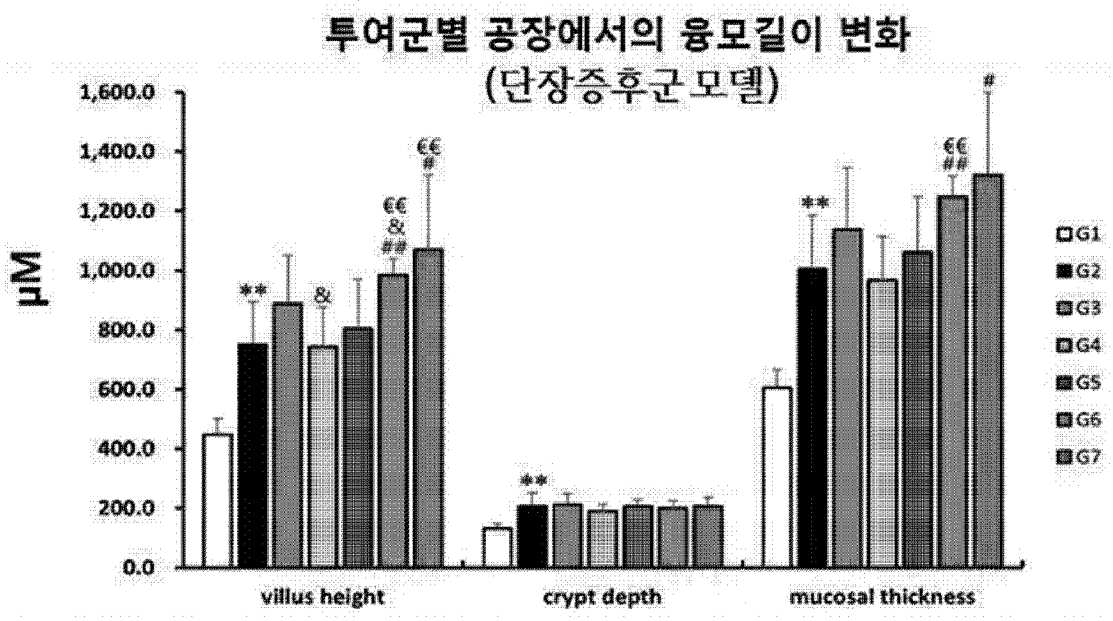
[도28]



[도29]


투여군별 십이지장에서의 융모길이 변화
(단장증후군 모델)
μM
1,800.0
1,600.0
1,400.0
1,200.0
1,000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
villus height
crypt depth
mucosal thickness
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

[도30]


투여군별 공장에서의 융모길이 변화
(단장증후군모델)
μM
1,600.0
1,400.0
1,200.0
1,000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
villus height
crypt depth
mucosal thickness
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/000110

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00(2006.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i; **A61P 1/14**(2006.01)i; **A61P 1/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/00(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/26(2006.01); A61K 47/54(2017.01); A61K 47/56(2017.01); A61P 1/00(2006.01); C07K 14/605(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: GLP-1(Glucagon-like peptide-1, 글루카곤-유사 펩타이드), GLP-2(Glucagon-like peptide-2), 지방산(fatty acid), 팔미트산(palmitic acid), 아실화(acylation), 단장증후군(short bowel syndrome)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018-229252 A1 (ZEALAND PHARMA A/S) 20 December 2018 (2018-12-20) See claims 34 and 38; and page 8, line 25, page 17, line 34, page 18, line 5 and page 28, line 1.	1-13,15,16
Y	LI, Y. et al. Variant fatty acid-like molecules Conjugation, novel approaches for extending the stability of therapeutic peptides. Scientific Reports. 2015, vol. 5, Article number 18039, inner pp. 1-9. See abstract, and inner pages 1, 2, 4 and 7.	1-13,15,16
A	KR 10-2017-0078668 A (GUBRA APS) 07 July 2017 (2017-07-07) See claim 19; and paragraphs [0097], [0102]-[0105], [0132], [0148], [0154], [0192] and [0235].	1-13,15,16
A	KR 10-2019-0091335 A (ZEALAND PHARMA A/S) 05 August 2019 (2019-08-05) See paragraphs [0191], [0219], [0316], [0317] and [0705].	1-13,15,16
A	CHAE, S. Y. et al. The fatty acid conjugated exendin-4 analogs for type 2 antidiabetic therapeutics. Journal of Controlled Release. 2010, vol. 144, no. 1, pp. 10-16. See abstract, and page 10.	1-13,15,16

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 April 2023	**12 April 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/000110

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0038460 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 08 April 2019 (2019-04-08) See paragraphs [0047], [0067] and [0099]-[0102].	1-13,15,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/000110

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/000110

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 14 pertains to a method for treatment of the human body by using a composition (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/000110

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2018-229252 A1	20 December 2018	AR 112109 A1	18 September 2019
		AU 2018-285580 A1	30 January 2020
		AU 2018-285580 A1	20 December 2018
		BR 112019026711 A2	30 June 2020
		CA 3066523 A1	20 December 2018
		CL 2019003660 A1	04 May 2020
		CN 111032072 A	17 April 2020
		CO 2019014028 A2	01 April 2020
		DK 3638291 T3	18 October 2021
		EP 3638291 A1	22 April 2020
		EP 3881861 A1	22 September 2021
		ES 2894629 T3	15 February 2022
		GB 201709643 D0	02 August 2017
		GB 201714203 D0	18 October 2017
		GB 201800873 D0	07 March 2018
		IL 271245 A	30 January 2020
		IL 271245 D0	30 January 2020
		JP 2020-523420 A	06 August 2020
		KR 10-2020-0020817 A	26 February 2020
		KR 10-2023-0035677 A	14 March 2023
		MX 2019015054 A	13 February 2020
		PE 20200678 A1	11 June 2020
		RU 2019142586 A	16 July 2021
		SG 11201912161 A	30 January 2020
		TW 201904607 A	01 February 2019
		US 2020-0000883 A1	02 January 2020
KR 10-2017-0078668 A	07 July 2017	CA 2965560 A1	06 May 2016
		EP 3212217 A1	06 September 2017
		JP 2017-537894 A	21 December 2017
		US 2018-0280480 A1	04 October 2018
		WO 2016-066818 A1	06 May 2016
KR 10-2019-0091335 A	05 August 2019	AU 2017-371516 A1	14 June 2018
		BR 112019010624 A2	22 October 2019
		CA 3043151 A1	14 June 2018
		CL 2019001552 A1	03 January 2020
		CN 110088125 A	02 August 2019
		CO 2019005924 A2	30 August 2019
		EP 3551651 A1	16 October 2019
		IL 266219 A	30 June 2019
		IL 266219 D0	30 June 2019
		JP 2019-214583 A	19 December 2019
		JP 2019-525890 A	12 September 2019
		MX 2019006486 A	01 August 2019
		PE 20191083 A1	20 August 2019
		RU 2019121253 A	12 January 2021
		RU 2019121253 A3	21 January 2021
		RU 2753193 C2	12 August 2021
		SG 10201911851 A	27 February 2020
		SG 11201903938 A	30 May 2019
		US 2019-0142904 A1	16 May 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/000110

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 2019-0365865 A1	05 December 2019
		US 2020-0297818 A1	24 September 2020
		US 2021-0244798 A9	12 August 2021
		US 2023-0000951 A1	05 January 2023
		WO 2018-104561 A1	14 June 2018
KR 10-2019-0038460 A	08 April 2019	CN 111164128 A	15 May 2020
		EP 3689942 A1	05 August 2020
		JP 2020-535264 A	03 December 2020
		US 11357861 B2	14 June 2022
		US 2020-0276317 A1	03 September 2020
		US 2022-0257779 A1	18 August 2022
		WO 2019-066609 A1	04 April 2019

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/000110

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/00(2006.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i; **A61P 1/14**(2006.01)i; **A61P 1/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/00(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/26(2006.01); A61K 47/54(2017.01); A61K 47/56(2017.01); A61P 1/00(2006.01); C07K 14/605(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: GLP-1(Glucagon-like peptide-1, 글루카곤-유사 펩타이드), GLP-2(Glucagon-like peptide-2), 지방산(fatty acid), 팔미트산(palmitic acid), 아실화(acylation), 단장증후군(short bowel syndrome)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WO 2018-229252 A1 (ZEALAND PHARMA A/S) 2018.12.20 청구항 34 38; 및 페이지 8, 라인 25, 페이지 17, 라인 34, 페이지 18, 라인 5, 페이지 28, 라인 1	1-13,15,16
Y	Li, Y. 등, Variant fatty acid-like molecules Conjugation, novel approaches for extending the stability of therapeutic peptides, Scientific Reports, 2015년, 5권, Article number 18039, 내부페이지 1-9 abstract, 내부페이지 1, 2, 4, 7	1-13,15,16
A	KR 10-2017-0078668 A (구브라 에이피에스) 2017.07.07 청구항 19; 및 단락 [0097], [0102]-[0105], [0132], [0148], [0154], [0192], [0235]	1-13,15,16
A	KR 10-2019-0091335 A (질랜드 파마 에이/에스) 2019.08.05 단락 [0191], [0219], [0316], [0317], [0705]	1-13,15,16
A	CHAE, S. Y. 등, The fatty acid conjugated exendin-4 analogs for type 2 antidiabetic therapeutics, Journal of Controlled Release, 2010년, 144권, 1호, 페이지 10-16 abstract, 페이지 10	1-13,15,16

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년04월10일(10.04.2023)	**2023년04월12일(12.04.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/000110

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0038460 A (한미약품 주식회사) 2019.04.08 단락 [0047], [0067], [0099]-[0102]	1-13,15,16

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/000110

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/000110

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **14**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 14는 조성물에 의한 사람의 치료방법에 관한 것입니다(PCT 제 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/000110

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2018-229252 A1	2018/12/20	AR 112109 A1	2019/09/18
		AU 2018-285580 A1	2020/01/30
		AU 2018-285580 A1	2018/12/20
		BR 112019026711 A2	2020/06/30
		CA 3066523 A1	2018/12/20
		CL 2019003660 A1	2020/05/04
		CN 111032072 A	2020/04/17
		CO 2019014028 A2	2020/04/01
		DK 3638291 T3	2021/10/18
		EP 3638291 A1	2020/04/22
		EP 3881861 A1	2021/09/22
		ES 2894629 T3	2022/02/15
		GB 201709643 D0	2017/08/02
		GB 201714203 D0	2017/10/18
		GB 201800873 D0	2018/03/07
		IL 271245 A	2020/01/30
		IL 271245 D0	2020/01/30
		JP 2020-523420 A	2020/08/06
		KR 10-2020-0020817 A	2020/02/26
		KR 10-2023-0035677 A	2023/03/14
		MX 2019015054 A	2020/02/13
		PE 20200678 A1	2020/06/11
		RU 2019142586 A	2021/07/16
		SG 11201912161 A	2020/01/30
		TW 201904607 A	2019/02/01
		US 2020-0000883 A1	2020/01/02
KR 10-2017-0078668 A	2017/07/07	CA 2965560 A1	2016/05/06
		EP 3212217 A1	2017/09/06
		JP 2017-537894 A	2017/12/21
		US 2018-0280480 A1	2018/10/04
		WO 2016-066818 A1	2016/05/06
KR 10-2019-0091335 A	2019/08/05	AU 2017-371516 A1	2018/06/14
		BR 112019010624 A2	2019/10/22
		CA 3043151 A1	2018/06/14
		CL 2019001552 A1	2020/01/03
		CN 110088125 A	2019/08/02
		CO 2019005924 A2	2019/08/30
		EP 3551651 A1	2019/10/16
		IL 266219 A	2019/06/30
		IL 266219 D0	2019/06/30
		JP 2019-214583 A	2019/12/19
		JP 2019-525890 A	2019/09/12
		MX 2019006486 A	2019/08/01
		PE 20191083 A1	2019/08/20
		RU 2019121253 A	2021/01/12
		RU 2019121253 A3	2021/01/21
		RU 2753193 C2	2021/08/12
		SG 10201911851 A	2020/02/27
		SG 11201903938 A	2019/05/30
		US 2019-0142904 A1	2019/05/16

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/000110

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2019-0365865 A1	2019/12/05
		US 2020-0297818 A1	2020/09/24
		US 2021-0244798 A9	2021/08/12
		US 2023-0000951 A1	2023/01/05
		WO 2018-104561 A1	2018/06/14
KR 10-2019-0038460 A	2019/04/08	CN 111164128 A	2020/05/15
		EP 3689942 A1	2020/08/05
		JP 2020-535264 A	2020/12/03
		US 11357861 B2	2022/06/14
		US 2020-0276317 A1	2020/09/03
		US 2022-0257779 A1	2022/08/18
		WO 2019-066609 A1	2019/04/04