

보안과제(), 일반과제(○) / 공개(○), 비공개()

최종평가 면제 신청여부(○, X)

첨단의료기술개발사업 제2차년도 최종보고서

HI14C0995

**(비임상) 획기적 체중 감소 효과를
가지는 First in class 당뇨병 치료제
HD -2356개발**

최종보고서

2017. 2. 15.

주관연구기관 / 현대약품(주)

세부연구기관 /

보 건 복 지 부

(전문기관)

한국보건산업진흥원

제 출 문

보건복지부 장관 귀하

본 보고서를 “(비임상) 획기적 체중 감소 효과를 가지는 *First in class* 당뇨병 치료제 HD -2356 개발” (총연구개발기간 : 2014.6.1 ~ 2017.5.31) 과제의 최종보고서로 제출합니다

2017 . 2 . 15 .

주관연구기관명 : 현대약품(주) (대표자) 김영학 (인)

세부연구기관명 : (대표자) (인)

참여기업명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 이재걸

세부연구책임자 :

참여기업책임자 :

제 출 문

보건복지부 장관 귀하

본 보고서를 “(비임상) 획기적 체중 감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발” (총연구개발기간: 2014.6.1 ~ 2017.5.31)파제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 2. 15.

주관연구기관명 : 현대약품(주) (대표자) 김 영 학
세부연구기관명 : (대표자) (인)
참여기업명 : (대표자) (인)



주관연구책임자 : 이재걸
세부연구책임자 :
참여기업책임자 :

보고서 요약서

과제번호	<i>HI14C0995</i>	해당 단계 연구 기간	2015.6.1 ~2017.5.31	단계 구분	0단계 / 2년차		
연구 사업명	종사업명	<i>보건의료기술연구개발사업</i>					
	세부 사업명	<i>첨단의료기술개발</i>					
연구 과제명	대과제명	<i>(비임상) 획기적 체중 감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD -2356개발</i>					
	세부 과제명						
연구책임자	이재걸	해당단계 참여 연구원 수	총: 33명 내부: 33명 외부: 명	해당단계 연구 개발비	정부: 500,000천원 민간: 340,000천원 계: 840,000천원		
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 62명 내부: 62명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 989,000천원 민간: 680,000천원 계: 1,669,000천원		
연구기관명 및 소속 부서명	<i>현대약품(주)</i>			참여기업명			
국제공동연구	<i>상대국명:</i>			상대국 연구기관명:			
위탁 연구	<i>연구기관명:</i>			연구책임자:			
요약	<p>① DS 합성공정 최적화 ② PK 및 대사체 연구 ③ 약효 확인(DIO mouse 4주 반복) ④ 항비만 효과 기전 연구 ⑤ 비임상 GLPToxicity 시료 합성 (3kg) ⑥ 유연물질 확인 ⑦ 임상1상을 위한 합성 공정 최적화 연구 ⑧ 특허 11개 외국 개별국 번역문 제출 ⑨ 유전독성 예비실험 ⑩ 2주 반복 GLP-DRF 실험 독성 실험 (Rat, Monkey) ⑪ 기전 재현 및 확인시험 (ex-vivo PPAR gamma Serine273의 phosphorylation Inhibition assay) ⑫ 기전 확장 시험(AMPK & PPAR alpha activation)</p>						
	보고서 면수 122쪽						

< 요약문 >

연구의 목적 및 내용	<p>Datamonitor(2011년)에서는 기존 당뇨치료제 시장에서의 Unmet Need는 강한 Potency 와 부작용 없는 약물이 요구되고 있다 고 기술하고 있다. 현재 시판되고 있는 당뇨병 치료제 중 인슐린 저항성을 개선하는 TZD계열 약물인 rosiglitazone, pioglitazone 약물은 제2형 당뇨병 치료제에 사용되는 경구용 혈당강하제로 인슐린저항성을 개선시켜 혈당강하 및 대사증후군에 대해서도 좋은 효과를 나타내지만 체중증가, 부종/체액저류, 심혈관 부작용이 보고되고 있으며, 사용이 제한되고 있다. 이러한 부작용은 PPAR-gamma transcription activity에서 기인한다는 논문(<i>Nature</i>2011; 477(7365):477)에 근거하여 HD-2356은 transcription activity free인 non-agonist PPAR-gamma ligand로서 PPAR-gamma Serine²⁷³의 phosphorylation(CDK5 mediated)을 억제하는 기전으로 혈당 및 fasting insulin 수치 감소 효과와 유의적인 체중감소 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 예비 연구 결과 Enzyme, HEK 293 cell, ex-vivo에서 억제 효과가 확인되어 과제를 제안하고, 비임상 시험 완료 후 IND 승인을 목적으로 연구를 진행하고자 하였다.</p>
연구개발성과	<p>1차 년도에 ① DS의 합성공정 최적화 ② 대사체 연구(<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>) ③ 대사체 구조 Identification 시도 ④ 약효(D10 mouse) ⑤ 항비만 효과 기전 연구-(1) ⑥ 항비만 효과 기전 연구-(2) ⑦ stability 연구용 DS 합성을 수행하였다.</p> <p>2차 년도는 ① 비임상 GLP Toxicity 시료 합성(3kg)완료 ② 유연물질 Identification ③ 임상1상을 위한 DS 합성 공정 optimization 연구 ④ PK 연구 ⑤ 특히 11개 외국 개별국 번역문 제출 ⑥ 유전독성 예비시험 ⑦ 2주 반복 GLP-DRF 독성시험(Rat, Monkey) 그리고 기전 확인시험으로 ⑧ D10 mouse에서 ex-vivo(PPAR-gamma Serine²⁷³의 phosphorylation Inhibition) 연구를 진행하였으나 제안당시와 달리 ex-vivo에서 PPAR-gamma Serine²⁷³의 phosphorylation이 억제되는 것을 확인하지 못하였다. 그래서 <i>in vivo</i> 약효(glucose lowering effect, insulin 저항성 개선)를 설명할 수 있는 약효기전연구를 시도한 결과, 약효 dose부근(3~10mg/kg dosing) ex-vivo결과 AMPK가 활성화 된다는 것을 발견하였다 (Report Number UNIST-02). 후속 연구로 ① AMPK upstream signal study(LKB1, CaKKK) ② Direct AMPK activation study ③ 비설치류(monkey)에서의 AMPK activation study(<i>ex-vivo</i>) ④ Human primary hepatocytes, adipose에서 AMPK activation study 결과, HD-2356에 의한 AMPK 활성화가 약효의 근거란 증거를 찾지 못하였다. 그러나 HD-2356은 여러번 반복실험을 통해 mouse species에서(D10, 1~3 mg/kg dose) 일관되게 약효 및 체중감소 효과가 있는 것을 확인하였다.</p> <p>현 단계에서는 깊이 있게 증명하지 못하였지만 HD-2356약물의 약효가 독성과 상관관계가 있는 것으로 추측된다. 실제로 지나친 oxidative stress 혹은 cachexia 상태에서 AMPK가 활성화 된다는 논문이 있다.(Am.J.Physiol.Endocrinol Metab304,E1042-E1052,2013, Biomedical Pharmacology v 86,200-209,2013.)</p> <p>하지만 HD-2356의 후속 기전 예비연구결과 PPAR-alpha agonism 효과 또한 보이는 것을 확인하였다.(EC₅₀ 0.4uM~1.5uM for HD-2356 vs 35uM for clofibrate)</p>
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>비록 HD-2356은 transcription activity free인 non-agonist PPAR-gamma ligand로서 PPAR-gamma Serine²⁷³의 phosphorylation(CDK5 mediated)을 억제하는 효과가 ex-vivo 실험에서 재현되지 못하였지만 PPAR-alpha agonism 효과가 있음을 확인하였다. PPAR-alpha agonist가 현재까지 허가된 약물이 존재하지 않는 질환인 NASH (비알콜성 지방간)의 기전이 될 수 있다고 여러 논문에서 주장하고 있다.</p> <p>(J.Hepatol.v 62,720-733,2015, World J.Hepatology.v7,1012-1019,2015, Elafibranor, 현재,임상 3상)</p> <p>HD-2356의 Rat, Monkey 2주 반복투여 DRF 시험은 완료된 상태이다.</p>
중심어 (5개 이내)	Cdk5-mediated PPAR-gamma 인산화 억제제 HD-2356 전임상 독성연구 PPAR-alpha Peroxisome Proliferation

〈 SUMMARY 〉

Purpose& Contents	<p>The Datamonitor(2011) says that unmet needs for antidiabetic drug area are high potency and low adverse effects. TZD class drugs suffer edema and CV-related adverse effects. The recent article(<i>Nature</i>2011; 477(7365):477) mentioned that already known TZD drug's efficacy originate from CDK5 mediated PPAR-gamma 273 serine phosphorylation inhibition rather than PPAR-gamma agonism itself. They speculate those adverse effects may be due to drug's PPAR-gamma agonism. HD-2356 showed CDK5 mediated PPAR-gamma 273 serine phosphorylation(<i>in vitro</i>, HeK293 cell, <i>ex-vivo</i>) with no PPAR-gamma agonism. IND approval for phase 1 study is the goal of this project.</p>				
Results	<p>During the first year, we have conducted the following studies ① Optimization of DS synthetic process ② Metabolite study(<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>) ③ Attempted structure identification of metabolites ④ <i>in vivo</i> efficacy(D10 mouse) ⑤ Mechanism study for anti obesity-(1) ⑥ Mechanism study for anti obesity-(2) ⑦ DS synthesis for stability test.</p> <p>Further studies(for 2nd year) includes ① Synthesis of DS for GLP Toxicity(3kg) ② Impurity Identification ③ Optimization of synthetic process for clinical batch ④ PK study ⑤ Patent application for 11 foreign countries ⑥ Preliminary study for Geno-Toxicity ⑦ 2 weeks repeated dosing DRF toxicity Exp(Rat, Monkey) ⑧ Mechanism study: <i>ex-vivo</i> in D10 mouse tissues(PPAR-gamma 273 serine phosphorylation inhibition)</p> <p>Unfortunately we failed to repeat the <i>ex-vivo</i> assay for PPAR-gamma Serine²⁷³ phosphorylation Inhibition, In the course of mechanism studies to explain the <i>in vivo</i> efficacy, we have found HD-2356 activates AMPK(<i>ex-vivo</i>). However further studies; ① AMPK upstream signal study(LKB1, CaKKK) ② Direct AMPK activation study ③ AMPK activation in Non rodent and ④ <i>in Human primary hepatocytes and adipose</i>, gave no firm evidence for HD-2356 being AMPK activator. At this stage, we have not conducted deep and wide mechanistic studies to explain the AMPK activation by HD-2356 in mouse. we speculate that AMPK activation may be due to drug's toxicity. A couple of literatures (Am.J.Physiol.Endocrinol Metab 304,E1042-E1052,2013, Biochemical Pharmacology v 86,200-209,2013) mentioned that AMPK becomes active from excessive oxidative stress(or cachexia)</p> <p>However, during mechanistic studies, we have found HD-2356 works as PPAR-alpha agonist(EC₅₀ 0.4uM~1.5uM for HD-2356 vs 35uM for clofibrate, not reported).</p>				
Expected Contribution	<p>The recent articles (J.Hepatol. v 62,720-733,2015, World J.Hepatology. v7,1012-1019,2015) suggests that PPAR-alpha agonist may be a target for NASH (Non-alcoholic Steatohepatitis) and Elafibranor is reported to be in phase 3 (www.medpagetoday.com/clinical-context/pbcnash/54735).</p>				
Keywords	Cdk5-mediated PPAR-gamma-phosphorylation inhibition	HD-2356	GLP-Toxicity	PPAR-alpha	Peroxisome Proliferation

〈 목 차 〉

1.	연구개발과제의개요	6
1.1.	연구개발 목적	
1.2.	연구개발의 필요성	
1.3.	연구개발 범위	
2.	국내외 기술개발 현황	11
2.1.	당뇨병 질환의 성장성	
2.2.	당뇨병 시장 개발 현황	
3.	연구수행 내용 및 결과	21
3.1.	연구개발 추진체계	
3.2.	연구개발 추진일정	
3.3.	연구개발 내용	
3.3.1.	HD-2356 DS 합성/생산위한 중간체 합성연구	
3.3.2.	HD-2356 합성 연구	
3.3.2.	HD-2356 유연물질 규명 연구	
3.3.3.	HD-2356 대량생산	
3.3.4.	표준물질 합성	
3.3.5.	DS (원료)의 가속 및 장기 안정성 연구	
3.3.6.	HD-2356 PK 연구	
3.3.7.	약효 및 작용기전 연구	
3.3.8.	독성 연구	
3.3.9.	HD-2356 formulation 연구	
3.3.10.	HD-2356 후속물질 연구	
4.	목표달성을 및 관련분야에의 기여도	94
5.	연구결과의 활용계획 등	97
6.	연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	98
7.	연구개발성과의 보안등급	99
8.	국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황	100
9.	연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	101
10.	연구개발과제의 대표적 연구실적	102
11.	기타사항	103
12.	참고문헌	104

<별첨1> 자체평가의견서

<별첨4> 실적 증빙자료

1. 연구개발과제의 개요

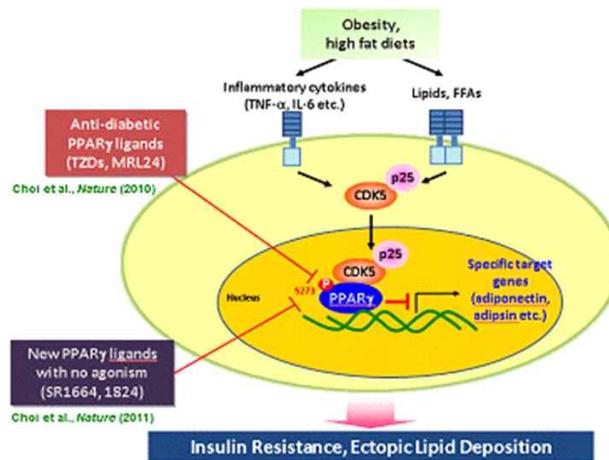
1.1. 연구개발 목적

1.1.1. 최종목표

CDK5 mediated phosphorylation(on PPAR γ)을 억제하는 first in class 후보물질 HD-2356 화합물의 비임상 진행 및 IND 승인.

1.1.2. 연구 배경

PPAR γ 의 인산화를 막음으로써 항당뇨 효과를 내는 약물인 SR-1664가 Scripps 연구소와 하버드 대학의 Dana-Farber 암센터의 합동 연구팀에 의하여 보고되었는데, 이 물질은 기존 TZD 약물의 부작용은 없으면서도 충분한 항 당뇨 효과를 나타내었다. 이들은 인슐린 저항성이 PPAR γ 의 273번 세린기가 Cyclin-dependent kinase 5(CDK5)에 의해 인산화 되어 유발이 되는 것으로 보고하였고, SR-1664 약물은 기존 TZD 제제처럼 PPAR γ 에 결합하여 지방세포 분화나 각종 유전자 발현을 조절하는 것이 아니라, CDK5에 의한 PPAR γ 의 인산화를 억제하여 항당뇨 효과가 발생되는 것으로 보고하였다. 또한 쥐를 대상으로 한 실험에서 체액저류(fluid retention)나 뼈 형성 방해 등과 같은 기존 TZD 약물의 부작용도 나타나지 않았다.



< Schematic model of PPAR γ and anti-diabetic PPAR γ ligands >

따라서 적은 부작용과 높은 효과 때문에 앞으로 SR1664처럼 CDK5 매개 PPAR γ 인산화를 특이적으로 차단하는 기작의 약물들이 개발될 것으로 보인다.

본 연구에서는 부작용이 개선된 새로운 CDK5에 의한 PPAR γ 에 인산화를 억제하는 물질을 개발하는데 있어 1) PPAR γ 에 높은 affinity를 가지며(high affinity for PPAR γ), 2) PPAR γ agonist의 활성이 없는(lacking PPAR γ agonist), 3) CDK5 자체는 영향을 미치지 않고, 선택적으로 CDK5에 의한 인산화 억제 효과를 가지는(Blocking the CDK5 mediated PPAR phosphorylation) 전략을 가지고 HD-2356 물질을 개발하였다.

1.2. 연구개발의 필요성

1.2.1. 당뇨병 치료제 약물동향과 당뇨병 치료제의 unmet needs

최초로 개발된 당뇨병 치료제는 Biguanide 계열약물인 메포민으로 간에서 AMPK의 조절에 의한 당대사 조절로 혈당을 낮추는 것으로 알려져 있으나, 아직까지 명확한 작용기전에 대해서는 알려져 있지 않다. 이 Biguanide 계열 약물은 비교적 안전하고 효과가 좋기 때문에 당뇨병 치료제의 1차 약으로 사용되고 있으나, 위장관 부작용으로 인하여 제한된 환자에만 사용되고 있다. 인슐린 요법의 경우 뛰어난 효과로 인하여 현재 당뇨치료제 시장의 절반을 차지하고 있다. 그러나 주사제로 사용상의 불편함과 함께 저혈당, 체중증가의 부작용이 발생한다. 강력한 혈당강하 작용이 우수한 sulfonylurea 계열 약물은 인슐린 분비 기능을 효과적으로 향상시키지만, 부작용으로 저혈당과 체중증가가 발생되어 사용 시 주의를 해야 한다. 이 후 전분의 흡수를 억제하는 α -glycosidase 억제제가 개발되었으나, 하루에 3회 투여를 해야 하는 불편함과 고창증 및 설사 부작용의 문제점이 나타났다. 당뇨병의 근본적 원인인 인슐린 저항성을 개선한 약물인 TZD계열 약물은 혈당강하 및 대사성증후군에 대한 우수한 약리작용을 나타내어 심혈관계 질환 및 만성적 당뇨합병증에 대한 치료제로 기대를 모았으나, 부종, 울혈성심부전, 체중증가, 골다공증의 부작용을 동반하였다. 최근에 개발된 incretin 계열의 GLP-1 agonist와 DPP-4 저해제는 기존 약물의 가장 큰 단점인 체중증가와 저혈당을 유발하지 않는 약제로 가장 큰 성장률을 나타내고 있다. 그러나 GLP-1유사체의 경우 우수한 혈당 및 체중감소 효과를 보이고 있으나, 웹타이드 제제 약물특성상 주사제로 사용을 해야 하는 불편함이 있고, 장기간 투여 시 본 약물에 대한 항체가 생성되는 등의 부작용이 보고 되었으며, 이를 극복하기 위해 내분비성 GLP-1의 분해 효소인 DPP-IV를 억제하는 약물이 개발되었으나, 이 약물은 부작용이 적은 반면 혈당과 당화혈색소 강하의 효능은 미약한 것으로 보고 되고 있다.

언급한 바와 같이 현재 사용 중인 당뇨병 치료제는 우수한 혈당강하 및 인슐린 저항성 개선 효과를 가지고 있지만, 모두 단점 또는 부작용을 가지고 있다. 인슐린은 대표적인 당뇨병 치료제 이지만, 주사제로만 사용되고 있으며, 저혈당을 유발하는 부작용을 가지고 있다. 그 외 경구용 당뇨병 치료제 또한 위장장애, 저혈당 유발, 간 독성, 심장독성 등의 부작용이 있어 부작용이 적은 새로운 당뇨병 치료제의 개발이 필요하다. 따라서 기존 당뇨병 치료제의 부작용을 개선하면서, 우수한 혈당강하 효능을 가지는 새로운 약물을 개발할 경우 세계적인 신약으로의 개발될 수 있을 것으로 생각되며, 현재 당뇨병 치료제의 unmet needs는 1) 부작용을 줄일 수 있거나, 2) 기존 치료제 보다 우수한 약효를 나타내거나, 3) 당뇨와 비만을 동시에 치료할 수 있거나, 4) 베타세포의 기능을 향상시킬 수 있는 새로운 치료제의 개발이다.

< 시판 당뇨병 치료제와 부작용 >

특징 (작용기전)	종 류	대표 약물	부작용
인슐린 저항성 개선 (Insulin sensitizers)	biguanide	Metformin	위장장애, 젖산과다증
	TZD	Rosiglitazone Pioglitazone	체중증가, 부종, 심혈관부작용
인슐린	인슐린 제제	Insulin	저혈당, 주사제로 사용
인슐린 분비 촉진	Sulfonylurea	Glimepiride Glipizide Gliquidone	저혈당, 인슐린 분비기능 상실
	Meglitinide	Nateglinide Repaglinide	저혈당, 두통, 관절통
	GLP-1 유사체	Exenatide Liraglutide	위장장애, 메스꺼움
	DPP-4 저해제	Sitagliptin Vidagliptin	신장이상 환자에 사용제한 낮은 혈당강하 효과
	α -glucosidase 저해제	Acarbose Voglibose	고창증, 설사
인슐린 무관	Amylin 유사체	Pramlintide	저혈당, 위통증

1.2.2. 인슐린 저항성 개선에 근거한 당뇨병 치료제의 요구

제 2형 당뇨병 환자의 치료가 이루어지는 임상에서의 처방에서 큰 비중으로 사용되고 있는 metformin이나 sulfonylurea, rosiglitazone 등은 설사나 복통, 저혈당의 유발, 체중증가, 심혈관 장애 등의 각기 다른 부작용을 동반한다는 단점을 가지고 있다. 특히, 우수한 혈당 강하효과로 오랜 기간 사용되어온 TZD 계열 약물들은 (glitazone 약물류) 그 우수한 효능에도 불구하고 체중 증가, 심혈관질환의 악화, 몇몇 부작용으로 인하여 시장에서 서서히 퇴출되고 있는 양상이다. 이에 대해 glitazone 류의 약물들과 같이 PPAR γ 의 transcription activity를 동반한 약물 보다 PPAR γ 의 transcription activity 없는 약물의 개발이 요구된다. (Balakumar P. 2012., Kung J. 2012., CV Rizos. 2009.)

1.3. 연구개발 범위

1.3.1. 주요 연구개발 내용

- HD-2356 물질에 대한 공정연구 및 생산
 - 최종물질을 의약품 제조 및 순도 기준 등에 근거하여 적절한 규격을 설정하고 이에 따르는 재현성 있는 시료의 제조공정을 확립함.
 - 궁극적인 최종 목표가 제품화에 있으므로 제품화시 경제적이고 상용화가 가능한 제조공정을 확립함.
 - 비임상 독성 연구용 원료(1차년도) 6Kg과 임상진행용 원료(2차년도) 3Kg 생산 진행.
- HD-2356 물질에 대한 제제화 연구
 - 경구투여가 용이한 제형을 선정하여 물성등을 고려하여 임상연구에 필요한 제제를 설계하고 제제의 기준을 설정함.
 - 임상 1상 연구에서의 예상 임상용량을 설정하여 안정성 연구에 필요로 하는 규격에 적합한 제제를 생산함.
- HD-2356 물질의 안정성 연구
 1. 원료의 가속 및 장기 안정성 연구
 - 원료에 대한 표준품 및 기준을 설정하고 이에 따라 가속, 가속, 및 장기 안정성을 평가함.
 - 선행 연구를 통해 원료에 대한 표준품 및 기준을 설정하여 이에 따라 가속시험을 진행하며, 가속 및 장기 안정성을 측수하여 본 과제를 통해 완료 예정임.
 2. 제제의 가속 및 장기 안정성 연구
 - 제제에 대한 기준 및 기준시험법을 설정함.
 - 제제의 기준에 따라 가속, 가속, 및 장기 안정성을 평가함.
- HD-2356 물질의 약효 및 작용기전 연구
 - 선행 연구를 통해 확보된 비임상 유효성 결과를 IND를 위해 정리하여 자료화 함.
 - 추가적인 약효의 차별화 및 효능 확장 연구수행.
- HD-2356의 비임상 독성 연구 (안전성 평가연구소, KITOX)
 - IND에 필요한 비임상 독성연구를 글로벌 수준의 다국적 CRO업체에 Full package로 진행하고, 평가 완료시, 결과에 대한 검토를 통해 다른 필요 항목이 발생시 이에 대한 추가적 평가 수행.

1.3.2. 연구과제의 기술적 위험요소 분석 및 대책

○ 추가적인 신 물질 합성을 통한 Back-up 물질 확보

- HD-2356 물질의 비임상 연구를 진행하면서, 예상치 못한 독성이 발견되어 진행이 어려울 경우를 대비하여, SAR 분석을 통한 신 물질을 추가적으로 진행하여 Back-up 화합물 확보를 위한 연구 수행.

○ 외부 전문가 활용

- 신약과제는 진행상 예기치 못한 기술적 어려움에 직면하게 되며, 특히 본 과제 진행 중 수행하게 되는 대사연구(ADME) 및 비임상 연구 중 발생되는 문제들을 해외 전문 CRO 업체나 국내외 독성 전문가들로부터 다각적인 자문을 받아 진행.

○ 비임상 원료의 신속한 확보

- 비임상 독성을 진행하기 위해서는 먼저, 확립된 기시법에 맞는 원료의 확보가 중요하다. 그러나 대량 생산을 진행시 불순물 제거에 어려움을 직면하게 되며, 2년의 연구기간 중 많은 시간을 소비 하게 되며 전체 일정에 차질이 발생될 수 있다. 이를 극복하기 위한 방안으로 전문화된 custom synthesis 업체와 연계하여 대량의 중간체를 확보하고, BGMP 업체와 연계하여 생산 진행.

○ 우수 연구 인력의 확보

- 연구 업무의 집중으로 과제 진행의 지연을 방지하기 위해 수시로 우수 인력을 확보하여 연구력 향상과 과제의 집중도를 향상시킨다.

2. 국내외 기술개발 현황

2.1. 당뇨병 질환의 성장성

2.1.1. 당뇨병 환자 수 및 발병율

전 세계는 당뇨병이 유행병처럼 변지고 있다고 해도 과언이 아니다. 세계 당뇨병 재단 (International Diabetes Federation, IDF)에서 발표한 통계에 따르면, 전체 당뇨 환자의 90%를 차지하며 성인에게 나타나는 제 2형 당뇨병의 환자 수는 1985년 3천만 명에서 2010년에는 2억 8500만 명으로 증가하였고, 2015년 세계 성인인구의 8.8%인 약 4억1500만 명이 당뇨병 진단을 받았으며, 3억1800만 명은 당뇨병 발병 위험이 높은 것으로 나타났다. 이와 함께 2040년에는 10명 중 1명, 10.4%인 6억4200만 명으로 폭발적인 증가를 보일 것으로 예측하고 있다. 또한 2015년 500만 명의 환자가 당뇨병으로 사망하였으며 이는 매 6초당 한 명의 사망자를 나타내며 전체 사망인구에 14.5%를 차지하는 비율이다. 이로 인한 의료비용도 천문학적인 수준으로 2015년 약 6730억 달러 (한화 약 778조), 2040년에는 이보다 더 많은 8020억 달러로 내다 봤으며 이는 전 세계 의료관련비용의 약 11.6%, 주요 국가에서는 5~20%에 해당하는 높은 비중을 차지하는 것이다.(table 1.)

	2015	2040
Total world population	7.3 billion	9.0 billion
Adult population (20-79 years)	4.72 billion	6.16 billion
Diabetes (20-79 years)		
Global prevalence	8.8%	10.4%
Number of people with diabetes	415 million	642 million
Number of deaths due to diabetes	5.0 million	-
Health expenditure due to diabetes (20-79 years)		
Total health expenditure, 2015 USD	673 billion	802 billion

[Table 1.] IDF Diabetes Atlas global estimates, 2015 and 2040

한국도 현재의 추세라면 2010년 351만 명 (통계청 추계 전 인구의 7.08%), 2020년 455만 명 (8.97%), 2030년 545만 명 (10.85%)으로 급격히 증가할 것으로 예상하고 있다 (대한당뇨병학회 기초통계연구팀과 건강보험심사평가원의 공동보고서).

2.1.2. 당뇨병 치료제 시장 규모

- (세계 시장) 2008년 250억 달러에서 연평균 10% 성장하여 2014년 530억 달러에 이룸
 - 2014년 이후 연평균 13% 성장하여 2020년 1,120억 달러 전망

[Table 2.] 당뇨병 치료제 세계 시장 현황

년도	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	연평균성장률(%)
규모(억 달러)	530	600	680	770	875	990	1,120	13

(출처: Datamonitor 2008 sales data 재가공, Datamonitor, 2009)

- 2014년 기준, 전체 시장 중 미국이 57%, 유럽이 25%, 일본이 9% 점유(대사질환치료제 신약후보물질 발굴 기획연구, 교육부, 2011)
- 당뇨병 환자 수는 2012년 3억 7100만 명에서 2035년 5억 9200만 명으로 60% 증가할 것으로 전망되며, 이에 따라 당뇨병 치료제의 수요는 지속적으로 증가할 것임
(Diabetes atlas, International diabetes federation, 2013)
- 당뇨병 치료제는 Sulphonylureas 계열, Biguanides 계열, Thiazolidinedione 계열, DPP-IV 억제제 계열로 구분되며, 2014년 기준 DPP-IV 억제제 계열이 전체 시장의 40% 점유(당뇨병과 치료제 개발, 생명공학연구센터, 2013)

- (국내 시장) 2008년 3,400억 원에서 연평균 12% 성장하여 2014년 7,176억 원에 이룸
 - 2014년 이후 연평균 13% 성장하여 2020년 14,939억 원 전망

[Table 3.] 당뇨병 치료제 국내 시장 현황

년도	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	연평균성장률(%)
규모(억 원)	7,176	8,109	9,163	10,354	11,700	13,221	14,939	13

(출처: Datamonitor 2008 sales data 재가공, Datamonitor, 2009)

- 국내 시장의 50%를 점유하고 있는 DPP-IV 억제제 계열의 수요 증가와 함께 SGLT-2 억제제 계열의 신제품 출시로 인해 높은 시장 성장 예상

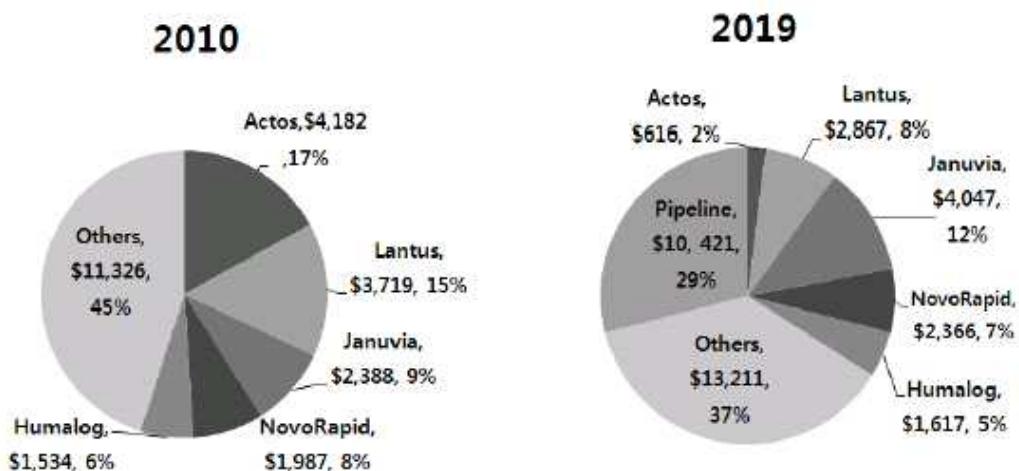
[Table 4.] 주요 당뇨병 치료제(DPP-IV 억제제) 시장 점유 현황

제품명	기업명	2013	2014
Januvia	MSD	21%	21%
Tragretta	Boehringer Ingelheim	112%	16%
Galvus	Novartis	7%	7%
Zemiglo	LG Life Sciences	1%	2%
Onglyza	BMS	1%	2%

- DPP-IV 억제제는 Metformin 복합제와 병용 처방이 가능한 장점을 가지고 있어 다른 치료제 보다 높은 시장 점유율을 보임

○ 치료제별 시장 규모

- 2010년 기준, TOP 5 의약품(Actos, Lantus, Januvia, Novorapid, Humalog)이 전체 시장 55%를 점유하였으나, 2019년 33%로 감소하고 현재 개발 중인 신규제품이 29%를 점유할 것으로 전망
- 당뇨병 치료제에서 17%의 비율을 점유하는 Actos(Takeda)는 2011년 특허가 만료되며 시장 비율이 2%로 감소 전망



[Fig 1.] 주요 당뇨병 치료제의 세계 시장 현황(2009~2019)

(출처: New Approaches to Pharma R&D, Datamonitor, 2009)

- 2014년 기준, 당뇨병 치료제의 세계 시장에서 비 인슐린 제제는 63%, 인슐린 제제는 37%를 점유하고 있으며, 향후 인슐린 제제의 사용에 대한 부작용(저혈당 유발)과 불편함(투약) 등으로 비인슐린 제제의 시장점유율이 더 높아질 것으로 전망
- Janumet(MSD), Juvisync(Merck), Onglyza(AstraZeneca), Kombiglyze(BMS), Nesina(Takeda)와 같은 DPP-IV 억제제 및 복합제 시장 규모는 2014년 22억 달러에서 2020년에 54억 달러에 이를 것으로 전망
- 2011년 11억 달러의 매출을 올린 GLP-1 agonist Exenatide(Byetta), Liraglutide(Victoza), Exenatide LAR(Bydureon), Albiglutide(Syncria) 등이 포함되며 2020년 40억 달러 이상의 시장 규모 예상

2.2. 당뇨병 시장 개발 현황

2.2.1. 당뇨병 치료제의 글로벌 신약 개발 현황

당뇨병 치료제의 세계 주요 10대 글로벌 제약회사의 파이프라인과, 최근 FDA 승인을 받은 약물 중 인슐린 제제를 제외하면 모두 Alogliptin (2013, DPP-4 inhibitor), Invokana (2013, SGLT-2 inhibitor), Farxiga (2014, SGLT-2 inhibitor), Tanzeum (2014, GLP-1 receptor agonist), Jardiance (2014, SGLT2-inhibitor)등 세 계열 약물이다.(table 6) 이외 새로운 기전의 mode of action으로 개발 중인 치료제는 하기와 같다. (table 7, 8)

[Table. 6] 비인슐린 계열 주요 당뇨치료제의 매출 예측 출처

(Datamonitor Healthcare 2014)

약물계열	2014	2023
DPP-IV inhibitor	7.7 billion	9.5 billion
SGLT-2 inhibitor	1.0 billion	4.6 billion
GLP-1 agonist	4.1 billion	8.6 billion

[Table. 7] Additional Compounds with New Mechanisms of action

Compound	Mechanism of Action	Phase of Development
Diacylglycerol acyltransferase (DGAT)-1 inhibitors	DGAT-1(트리글리세라이드 합성의 마지막 단계 효소)의 억제 - 체중 감소, 인슐린 민감성 향상, 콜레스테롤과 트리글리세라이드 감소	DS-7250 Phase 2 P7435 Phase 1
Cannabinoids	췌장 베타 세포 보호, 인슐린 민감성 향상	GWP42003 Phase 2 GWP42004 Phase 2
Hepatic carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) inhibitors	CPT1은 지방산 대사에 연관된 효소로, CPT1 억제는 당신생성합성을 감소시킴	Teglicar Phase 2
Fibroblast growth factor (FGF)21 agonists	FGF21 수용체의 촉진 경과 지방세포에 의한 포도당 흡수 증가, 글루카곤 감소, 에너지 소비 증가, 체중 감소, 간지방증 감소	LY2405319 Phase 1
Heat Shock Protein (HSP) inducer	HSPs 와 산화질소 증가-마이토콘드리아 기능과 인슐린 민감성 향상	BGP-15 Phase 2
Tetrahydrotiazin containing oral antidiabetic - glimin	간에서 포도당 합성 감소, 근육에서 포도당 흡수 증가, 그리고 췌장세포기능 향상	Imiglimin Phase 2
Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors	PTP1B는 인슐린 저항성, 비만, 제2형 당뇨병과 관련되어 있음 ; 억제는 인슐린 민감성 증진 효과 가능성 있음	TTP814 Phase 1/2 ISIS-PTP1BRx Phase 2

[Table 8.] Insulin sensitizer products in clinical development : Datamonitor 2011

Phase	Product	Company	Mode of action
Phase III	balaglitazone	Dr Reddy's	PPAR gamma partial agonist
	lobeglitazone	Chong Kun Dang	PPAR-alpha/PPAR-gamma agonist
Phase II	VVP-808	Verva Pharmaceuticals	Non-TZD insulin sensitizer
	S-707106	Shionogi	Insulin sensitizer
	MSDC-0602	Metabolic Solutions	Insulin sensitizer
	BGP-15, N-Gene	N-Gene	HSP function restorer
	RG-4929	Hoffmann-La Roche	11 beta hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor
	Qnexa (phentermine + topiramate)	Vivus	GABA receptor agonist/glutamate antagonist
	RO-5093151	Hoffmann-La Roche	11 beta hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor
	bezafibrate + diflunisal	Zalicus	Bezafibrate+diflunisal
	mecasermin rinfabate	Insmed	Insulin-like growth factor 1 agonist
	AMG-131	Amgen	PPAR-gamma agonist
Phase I	GFT-505	Genfit	PPAR-alpha/PPAR-delta/PPAR-gamma agonist
	P-1736-05	Piramal	non-PPAR insulin sensitizer
	PN-2034	Wellstat	Protein kinase C epsilon inhibitor
	mitoglitazone	Metabolic Solutions	PPAR-gamma sparing
	11 beta-HSD1 inhibitors, Vitae	Vitae Pharmaceuticals	11 beta hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor
	AZD-8329	AstraZeneca	11 beta hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor
	vanadium + Aonyx, Medesis	Medesis	Vanadium
	PPAR-gamma partial agonists, Adamed	Adamed	PPAR gamma partial agonist
	ZYH2	Zydus Cadila	PPAR-alpha agonist/PPAR-gamma agonist
	DSP-8658	Dainippon Sumitomo Pharma	PPAR-alpha/PPAR-gamma agonist
	DB-959	Dara Biosciences	PPAR-delta/PPAR-gamma agonist

2.2.1. 당뇨병 치료제의 관련 유망 약물타겟에 대한 연구동향

인슐린 저항성을 극복하기 위해 PPAR γ 를 표적으로 하는 당뇨병 치료제 개발 연구는 PPAR γ 의 작용제(agonist) 역할과 부작용이 별개로 나타날 수 있음을 시사하는 신규 작용기전들이 소개됨에 따라 PPAR γ full agonist로부터 유래 될 수 있는 부작용은 개선하고, 치료효과는 유지될 수 있는 SPPARM (Selective PPAR Modulator) 개념의 PPAR γ parial agonist 및 PPAR α/γ dual 그리고 PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ pan agonist 개발이나, PPAR γ antagonist를 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행 되고 있다.

[Table 9.] Different PPAR ligands and their development status

(Molecular Endocrinology 28: 17561768, 2014)

Compound	Class	Chemical Structure	EC ₅₀ for PPAR- α , nM	EC ₅₀ for PPAR- γ , nM	EC ₅₀ for PPAR- δ , nM	Latest Development Stage	Current Status
Fenofibrate acid (128)	PPAR- α agonist		22400	1470 ^a	1060 ^a	Marketed	On the market
Troglitazone	PPAR- γ agonist					Phase IV, marketed	Withdrawn due to hepatotoxicity
Rosiglitazone (128)	PPAR- γ agonist		15000	245	8630	Phase IV, marketed	Withdrawn in EU, Restricted use in US due to risk of CV events
Pioglitazone (128)	PPAR- γ agonist		11600	1160	9210	Phase IV, marketed	On the market
Farglitazar (129)	Dual PPAR- α/γ agonist		250	0.2	NA	Phase III	Discontinued
Tesaglitazar (128)	Dual PPAR- α/γ agonist		4780	3420	51000	Phase IIb	Discontinued due to risk of renal dysfunction
Muraglitazar (128)	Dual PPAR- α/γ agonist		5680	243	16400	Phase III, approvability issued by FDA	Discontinued due to risk of CV events
INT-131 (129)	Selective partial PPAR- γ agonist		NA	4	NA	Phase II	Unknown
MK-0533 (121)	Partial PPAR- γ agonist		NA	2	NA	Phase II	Discontinued
Aleglitazar (128)	Dual PPAR- α/γ agonist		5	9	376	Phase III	Discontinued due to lack of efficacy in CV outcomes
GFT505 (130)	Dual PPAR- α/δ agonist		10–20	NA	100–150	Phase III	In development for NASH/NAFLD
Saroglitazar (125)	Dual PPAR- α/γ agonist		0.00065	3	NA	Marketed in India only	On the market in India only
Chiglitazar (120)	Dual-PPAR- α/γ agonist		1200	80	NA	Phase II	Not yet recruiting for Phase III

Abbreviations: EU, European Union; NA, not available; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease.

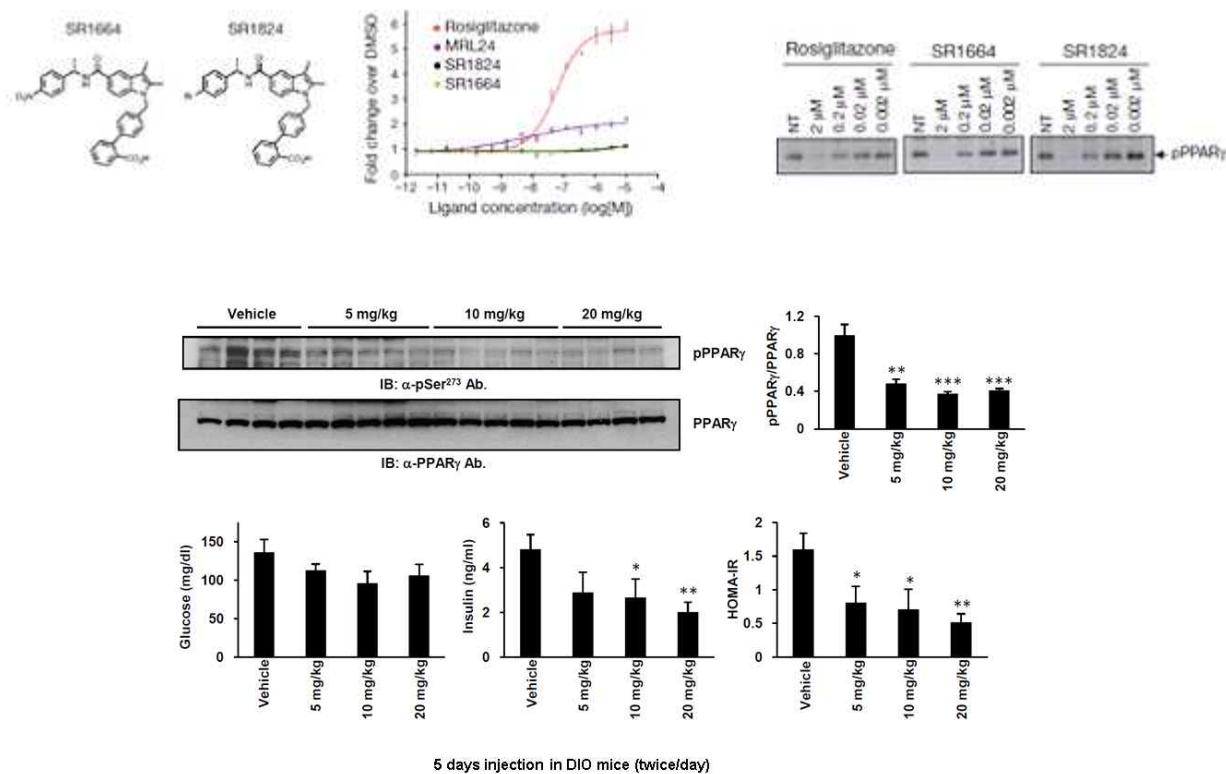
^a Value is inaccurate due to low maximal activation.

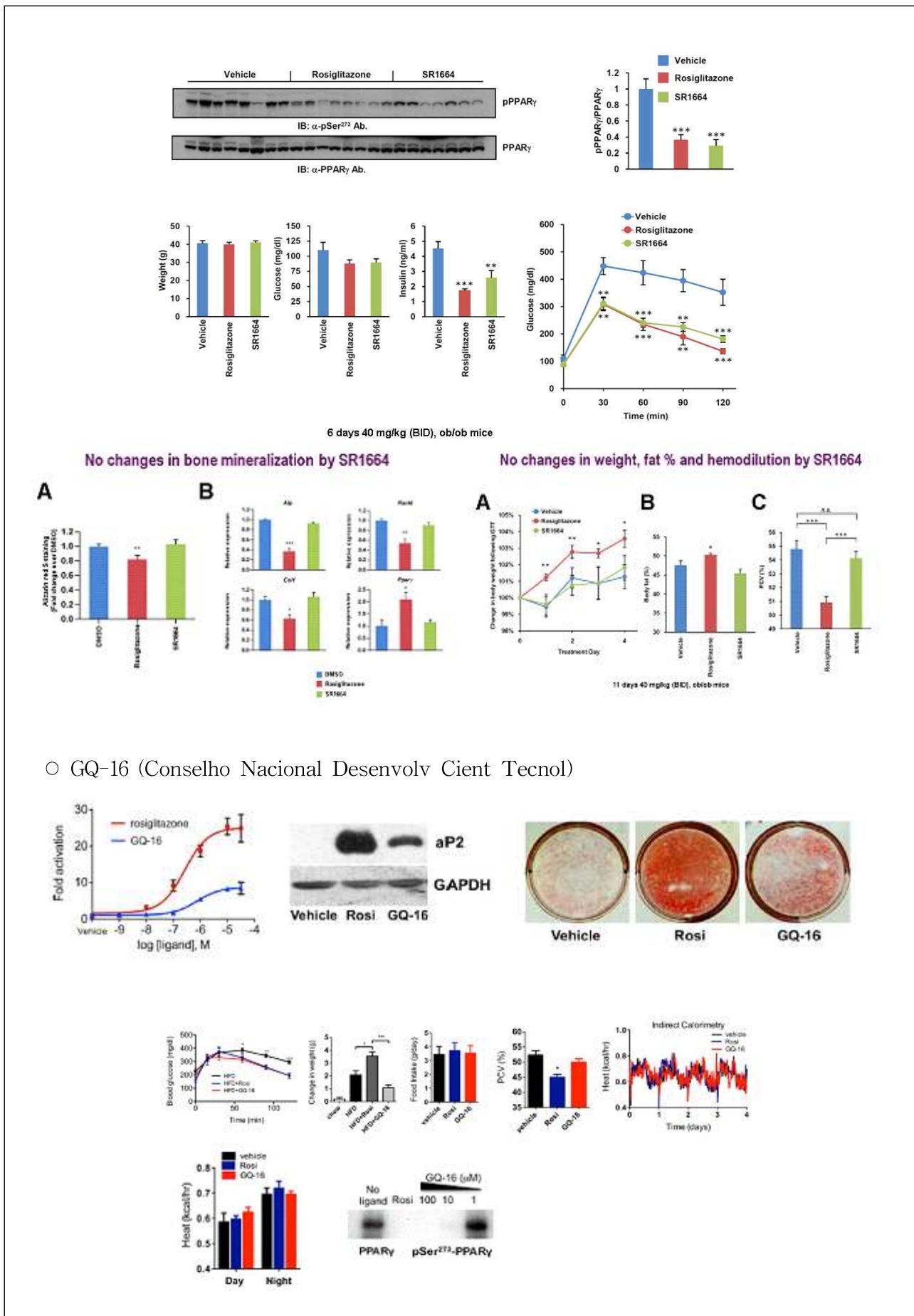
2.2.3. 동일 약물 타겟을 표적으로 하는 글로벌 신약개발 현황

- 약물개발 현황 : 현재 임상 진행 중인 약물은 없으며, 초기 discovery 단계임

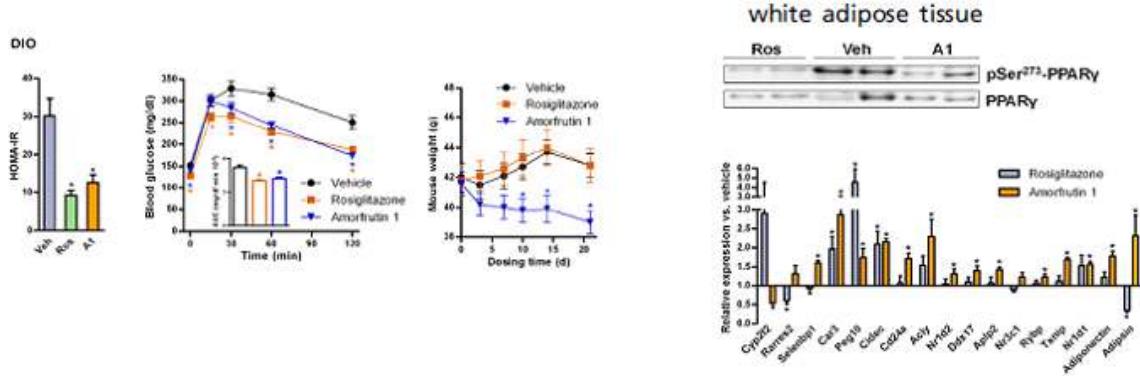
연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
The Scripps Research Institute	SR1664 도출 (전임상단계)	Ember Therapeutic이라는 벤처기업을 통해 후속 연구 진행 중
Conselho Nacional Desenvolv Cient Tecnol	GQ-16 (전임상단계)	Partial agonist로 개발 중
Max Planck Institute	Amorfrutins (정보 없음)	Natural product

- SR-1664 (The Scripps Research Institute & Embet Therapeutic)





○ Amorfrutins(Max Planck Institute)



2.3. 과제 성공시 치료제의 예상되는 시장지위

2.3.1 작용 기전 상 시장지위

당뇨병 예방 효과 및 조기 치료 : 당뇨병으로 진단될 당시에는 이미 당뇨병이 상당히 진행된 상태가 많으므로 대혈관 합병증 등과 같은 당뇨합병증이 동반된 경우가 많아 최근 미국당뇨병학회, 국제당뇨병연맹, 대한당뇨병학회에서는 단계적 치료보다는 조기에 적극적인 치료를 추천하며 대사증후군의 위험인자를 가진 환자에게도 초기부터 적극적인 관리를 권하고 있다. (table 10.) 인슐린 저항성 개선 약물인 Pioglitazone의 투여군이 위약군에 비해 당뇨병으로 이환된 비율이 72% 유의하게 낮은 것으로 확인되어 당뇨병 예방 효과를 입증 하였고, 이에 인슐린 저항성 개선 치료제는 예방 및 조기 당뇨병 치료 시장에서 적극 활용 될 수 있을 것으로 판단된다.

Intervention to delay or prevent T2DM development*

Intervention	Risk reduction (%)	Refs
Lifestyle (body weight reduction of 5–7%)	29–58	183–185
Metformin	26–31	184,185
Lifestyle and metformin	28	185
Acarbose (α -glucosidase inhibitor)	25	186
Voglibose (α -glucosidase inhibitor)	41	187
Troglitazone	55	188
Rosiglitazone	60	189
Pioglitazone	72	11

T2DM, type 2 diabetes mellitus. *In people with impaired glucose tolerance.

[Table. 10] Intervention to delay or prevent T2DM development

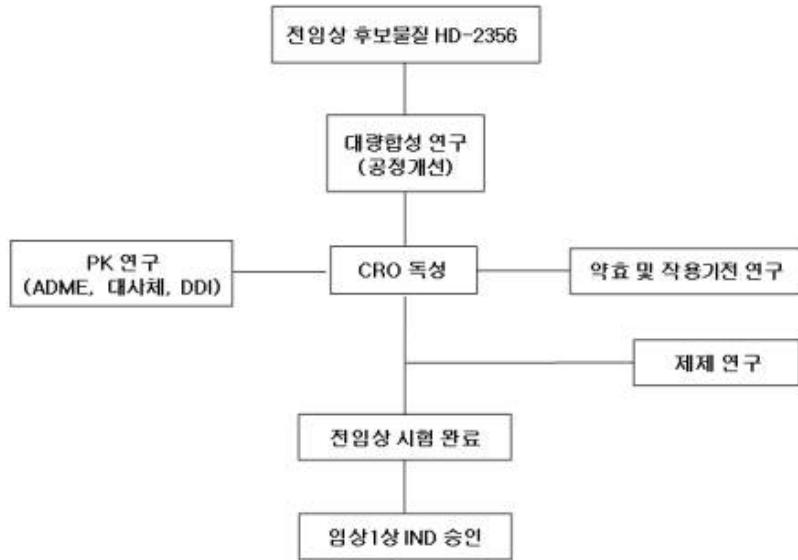
Nature Reviews Disease Primers | Article number: 15019 (2015)

기존 제품과 병용 : 본 연구를 통해 개발될 부작용이 개선된 인슐린 저항성 개선 당뇨병 치료제는 향후 세계적인 신약으로 개발되어 많은 수익을 줄 것으로 기대된다. 최근 당뇨병 치료제 급여기준 개정으로 3제 요법에 대해 급여가 모두 인정됨에 따라, 처방 패턴에 변화가 있을 것으로 주목되고 있는데. 현재 국내 당뇨병 치료제 시장은 DPP-4 억제제계 제제가 주도하고 있는 상황이며, 여기에 메포민 +DPP-4 억제제 2제 요법에 3제 요법으로 추가가 가능해지면서, 과거 퇴출 이슈를 겪은 바 있는 티아졸리 딘디온 (Thiazolidinedione, TZD)계 제제의 부활이 예상되고 있다. 특히 메트포르민 또는 SU계 제제 단독요법에 DPP-4 억제제를 병용한 경우에는 3제 요법으로 고려될 수 있는 약제는 인슐린 저항성을 개선하는 TZD계 제제뿐이다. 따라서 본 약물이 개발될 경우 TZD계 약물을 대체 할 수 있으며, 부작용이 개선되어 국민건강 보건증진에 기여할 것이다.

2.3.2 시간적 측면에서 시장지위 : 임상진행 중인 약물이 없으므로 과제 성공 시, first in class 가능함.

3. 연구수행 내용 및 결과

3.1. 연구개발 추진체계



3.2. 연구개발 추진일정(2016년 9월 협약 변경관련 현장실사시 제공한 자료)

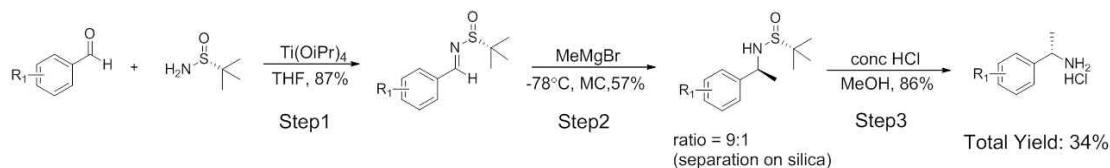
구분	내용	2014					2015					2016					2017									
		6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	
총괄 연구 과제	비임상 원료(DS)공정연구 /생산/안정성 연구	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	PK 연구 (대사연구)				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	약효 및 기전연구 (차별화 연구 포함)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	비(임상 독성연구 (rat, monkey)																		■	■	■	■	■	■	■	■
	약효 및 기전연구 (병용투여 효능확보)																		■	■	■	■	■	■	■	■
	임상용 원료 생산 (3KG)																		■	■	■	■	■	■	■	■
	DS(원료) 안정성 시험																		■	■	■	■	■	■	■	■
제제 안정성 시험	제제 안정성 시험	장기																	■	■	■	■	■	■	■	■
		가속																	■	■	■	■	■	■	■	■
IND 자료준비 및 승인																			■	■	■	■	■	■	■	■

3.3. 연구개발 내용

3.3.1. HD-2356 DS 합성/생산위한 중간체 합성 연구

3.3.1.1. 출발물질 합성 연구(CA)[(S)-1-(3-Fluoro -4 -methyl phenyl)ethanamine]

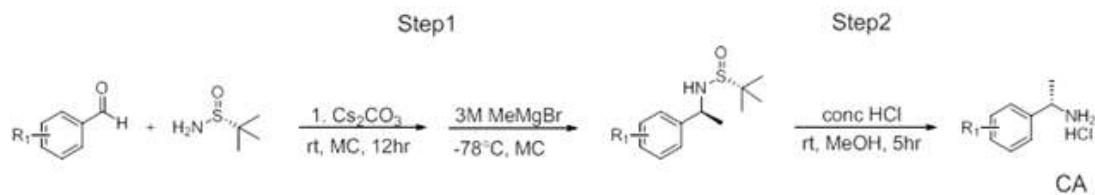
- Commercial 구입이 어려운 원료로 자체 합성/분석법 개발
- Chiral purity 99.9% 순도를 확보하여 HD-2356 대량생산에 사용 하였다.
- 연구 목표 : 함량 $\geq 98\%$, 98% ee 확보, 수율 $\geq 34\%$
- 연구 결과 : 함량 $\geq 99\%$, 99% ee, 수율 $\geq 50\%$



- 연구 내용

1. 3steps 반응 단계를 2steps 으로 단축함
2. 1step의 이민생성 반응의 dehydration시약을 $Ti(OiPr)_4$ 에서 Cs_2CO_3 로 사용 시, 수율향상 및 in situ 반응으로 진행 가능
3. 실험실적 scale-up 진행완료 : 100g X 3 batch

- 연구 결과



BatchNo.	Step 1	Step 2	Total 수율 (2 steps)
평균 수율	113.5g(61.4%)	76.9g(86.4%)	53.0%
CA-001	118.8g(64.2%)	76.6g(86.1%)	55.3%
CA-002	106.4g(57.5%)	78.2g(87.9%)	50.5%
CA-003	115.3g(62.3%)	75.8g(85.2%)	53.1%

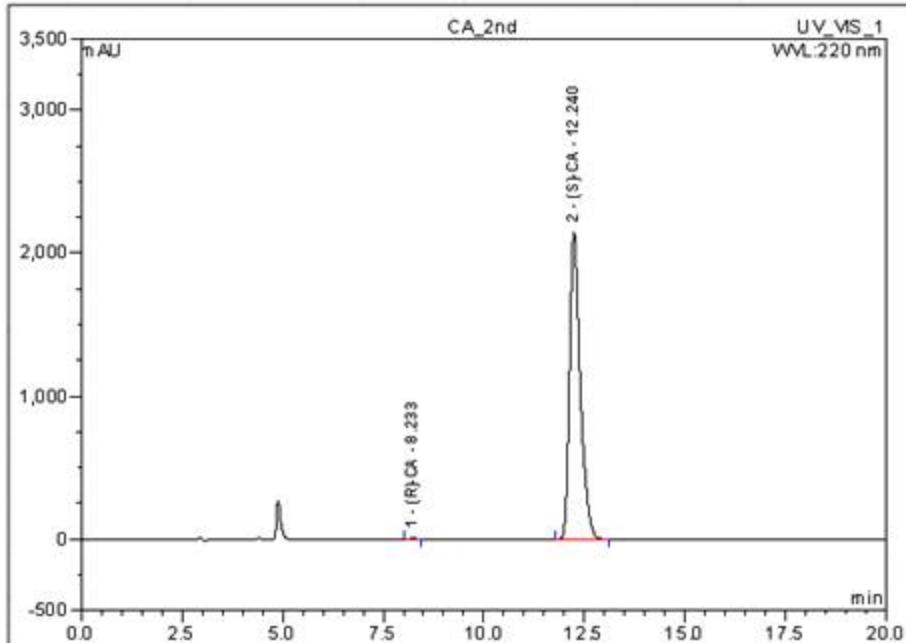
Certificate of Analysis

Product Name.: (S)-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethanamine

Analysis item	Specification	Results
Appearance	White crystalline powder	Conform
Identification	NMR	Conform
	HPLC	Conform
Loss on Drying	NMT 1.0%	0.56%
Chiral Purity	99% up	99.9%
Assay(HPLC)	98% up	99.8%

4 CA_2nd

Sample Name:	CA_2nd	Injection Volume:	5.0
Vial Number:	RC3	Channel	UV_VIS_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	220
Control Program:	TEST_20min	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	TEST	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	17.07.14 13:13	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	20.00	Sample Amount:	1.0000

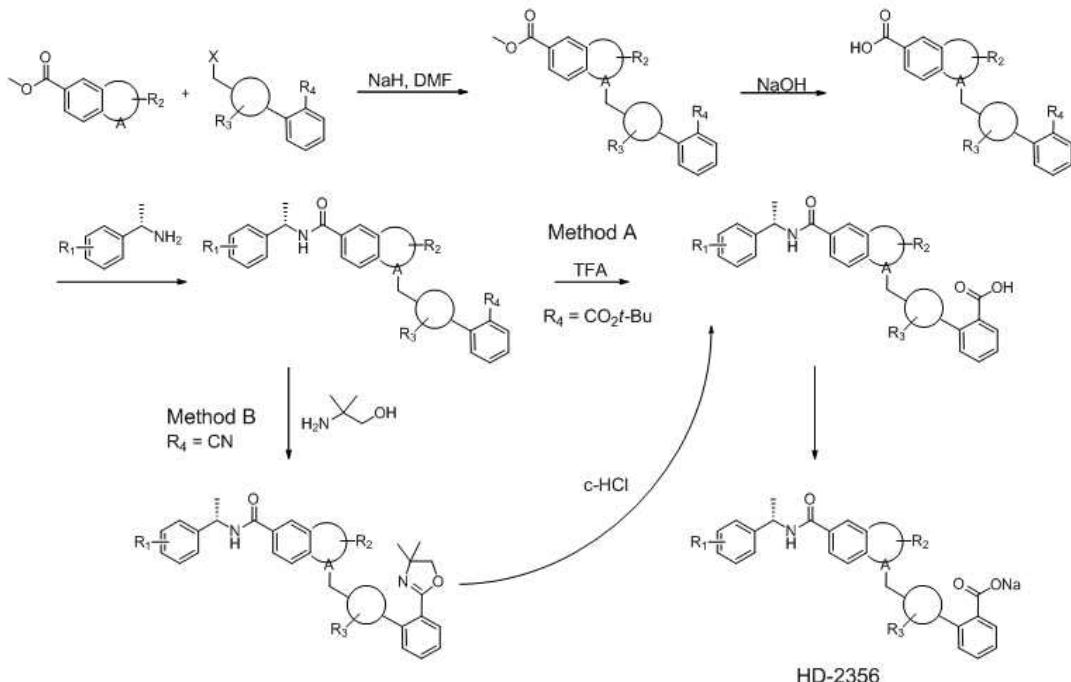


No.	Ret.Time min	Peak Name n.a.	Area mAU/min	Height mAU	Rel.Area %	Resolution(USP)
1	8.23	(R)-CA	0.453	2.411	0.07	n.a.
2	12.24	(S)-CA	660.432	2144.689	99.93	10.52
Total:			660.8851	2147.10	100.000	

3.3.1.2. HD-2356 합성 연구 (Report Number HD-SYN-01)

- 연구 목표 : 수율 향상(6단계 수율 13% $\Rightarrow \geq 30\%$), 공정개선
- 연구 결과 : 수율 향상(6단계 수율 : 33.3%), 100g scale
1차 Pilot 연구 진행하여 1.53 kg 합성(수율:37%) 완료함
2차 Pilot 연구 진행하여 3.00 kg 합성(수율:36.1%) 완료함
- 연구 내용

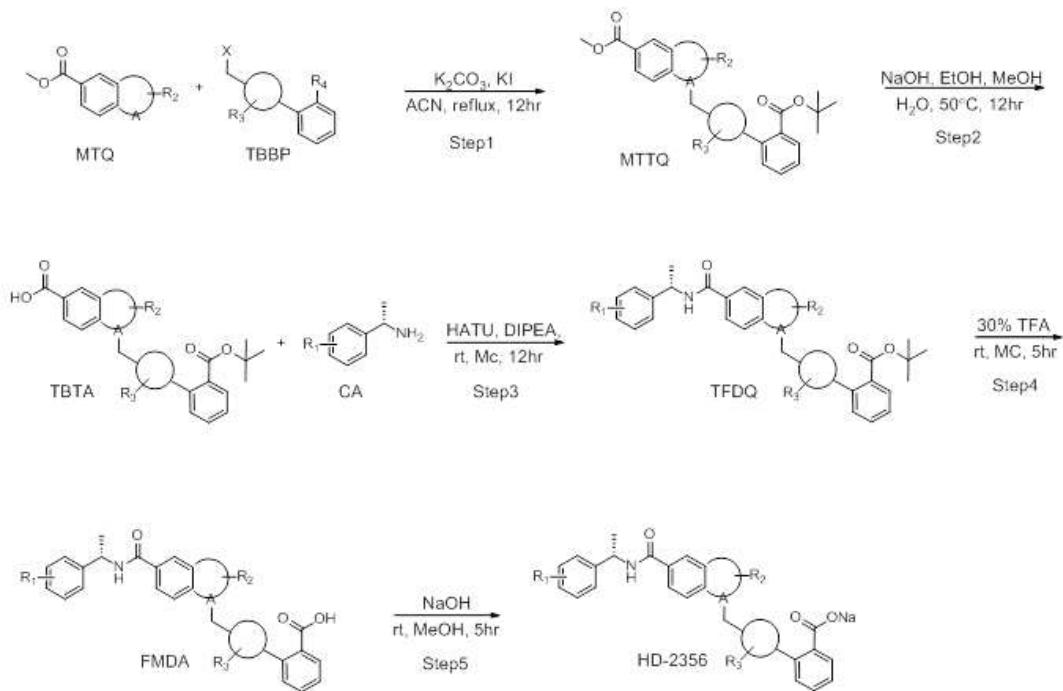
[연구 초기]



최적의 합성법을 도출하기 위하여 2가지 경로를 가지고 합성연구를 진행 하였으며, Method B의 경우에는 카르복실 보호기인 Oxazoline의 도입으로 재결정 및 불순물 제거가 용이하였다. Method A의 경우 5단계로 Method B의 6단계 보다 짧은 반응경로를 가지고 있으나, 카르복실의 보호기인 t-Butyl 단계에서의 결정성이 fuming 형태로 나타나 결정화에 어려움이 발생하여 불순물을 제거하기가 어려웠다. 본 연구를 통해서 공정개선 연구를 수행한 결과, 수율 및 불순물 제거용이성 등을 고려하여 Method A의 합성법으로 최종선택을 하였다. Method A에서 발생된 불순물 제거는 주 불순물이 극성이며 물에 잘 용해되는 성질을 가지는 물질로 확인되어 work-up과정에서 염기성(pH=12)에서 제거 할 수 있었다. 초기 결정생성에 어려움은 불순물 제거로 결정생성의 어려움이 해결 되었다.

- 연구 결과

[연구결과]



- HD-2356 제조 지시서 (100g scale)

[Step 1] MTTQ 제조

출발 물질	반응 수량	Flow diagram	반응 조건	비고	
1. MTO	100 g		1. 반응기에 ACN를 넣고 <u>교반</u> 하면서, MTO, TBBP, K_2CO_3 , KI를 첨가한다. 2. 2hr 동안 reflux 한다 3. 실온으로 냉각한다. 4. 고체를 여과하여 제거한다. 5. 어액을 <u>감압</u> 하면서 농축한다.	 	
2. TBBP	199.7 g				
3. K_2CO_3	216.8 g				
4. KI	43.4 g				
5. ACN	700 mL				
6. Acetone	200 mL				
			수율 : Crude한 상태로 다음 반응을 진행한다.		

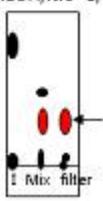
[Step 2] TBTA의 제조

출발 물질	반응 수량	Flow diagram	반응 조건	비고
1. MTTO 2. MeOH/EtOH	239.3 g 500 / 1000 mL	첨가	1. Crude MTTO를 MeOH, EtOH 녹인다.	
3. NaOH 4. H ₂ O	418.4 g 600 mL	첨가 교반	2. NaOH를 H ₂ O에 녹이고 서서히 첨가한다. 3. 55 °C에서 5시간 동안 반응한다.	
		농축	4. 반응액을 감압 하에서 농축한다.	
5. H ₂ O / EA	1000 / 2000 mL	냉각/첨가 교반	5. 반응 내부온도를 0~5 °C로 냉각하고, H ₂ O / EA를 첨가한다. 6. 반응내부온도를 25 °C로 올리고, 30분간 교반한다.	
6. brine	1000 x 2 mL	추출	7. 반응액을 분리하고, EA출은 brine으로 다시 추출한다.(2회)	EA/HX=1/1
7. 2N-HCl	800 mL	결정화	8. 0~5°C로 낮각 후 2N-HCl을 서서히 첨가한다 (pH=2). 결정생성	
8. EA	200 mL	여과	9. 생성된 고체를 여과하고, EA로 씻어준다.	
	마른 수량 : 231.9 g		수율 : 180 g (77.6%) LC data : 99.08%	I Mix II

[Step 3] TFDQ의 제조

출발 물질	반응 수량	Flow diagram	반응 조건	비고
1. Crude TBTA 2. EDCI,HCI 3. DMAP 4. CA 5. CH ₂ Cl ₂	180 g 116.7 g 74.37 g 92.36 g 1800 mL	첨가	1. Crude TBTA를 CH ₂ Cl ₂ 에 녹인 다음, EDCI,HCI, DMAP를 첨가하고 CA를 마지막에 첨가한다.	
		교반	2. 25 °C (실온)에서 5시간 동안 교반한다.	
6. 2N-HCl 7. brine 8. 모수 Na ₂ SO ₄	900 mL 900 x 2 mL 180 g	추출	3. 2N-HCl를 첨가하고 30분간 교반 한 다음 추출하고, 유기층은 brine으로 씻어준다 4. 추출된 CH ₂ Cl ₂ 층은 모수 Na ₂ SO ₄ 로 건조한다.	EA/HX=1/1
		여과	5. Na ₂ SO ₄ 를 여과하여 제거한다.	
		농축	6. 여과액을 감압 하에서 농축한다.	
	마른 수량 : 234.87g		수율 : Crude한 상태로 다음 반응을 진행한다	I Mix II

[Step 4] FMDA의 제조

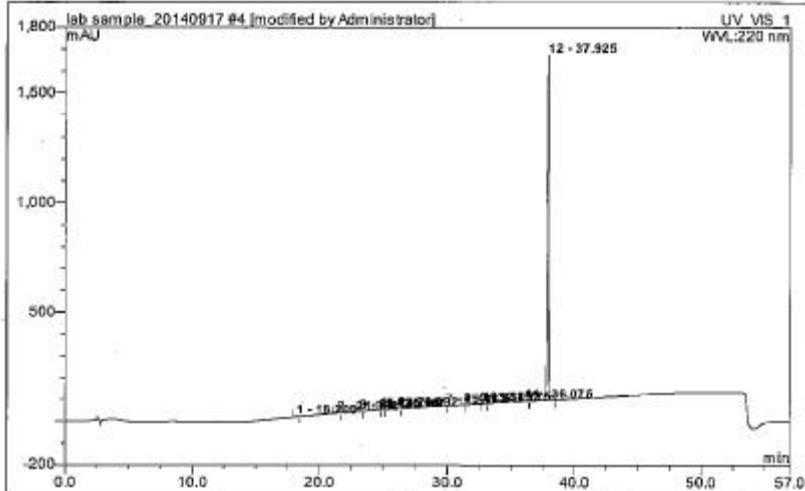
출발 물질	반응 수량	Flow diagram	반응 조건	비고
1. Crude TFDQ 2. TFA 3. CH_2Cl_2	<u>234.87 g</u> <u>466.2 mL</u> <u>1800 mL</u>	첨 가	1. 반응기에 crude TFDQ를 CH_2Cl_2 를 녹인 후, TFA를 서서히 첨가한다.	
		교 반	2. 실온에서 5시간 동안 교반한다.	
		냉 각	3. 0 °C로 냉각한다.	
4. 6N-NaOH	<u>750 mL</u>	첨 가	4. 6N-NaOH를 서서히 첨가한다 (pH=12 control)	
5. brine 6. 무수 Na_2SO_4	<u>2000 x 3 mL</u> <u>234 g</u>	추 출	5. 반응액을 분리하고, 유기층은 brine으로 3번 씻어준다. 6. 유기층(CH_2Cl_2)을 무수 Na_2SO_4 로 건조한다.	
		여과	7. Na_2SO_4 를 Celite /silica 하에서 여과하여 제거한다.	
7. EA	<u>3600 mL</u>	결정화	8. 0 °C 하에서 EA로 solid을 잡는다.	MeOH/MC=1/9
8. IPE	<u>2000 mL</u>	여과	9. 생성된 고체를 여과하고, IPE로 씻어준다.	
			마른 수율 : 212.1 g 수율 : 118.4 g (55.82%) LC data : 98.22%	

[Step 5] HD-2356의 제조

출발 물질	반응 수량	Flow diagram	반응 조건	비고
1. FMDA 2. MeOH	<u>60.4 g</u> <u>1000 mL</u>	첨 가	1. FMDA를 MeOH 녹인다	
3. NaOH 4. MeOH	<u>4.392 g</u> <u>200 mL</u>	첨 가	2. NaOH를 MeOH에 녹이고 서서히 첨가한다.	
		교 반	3. 실온에서 12시간 동안 반응한다.	
		농 축	4. 반응액을 강약 하에서 농축한다.	
5. THF 6. IPE	<u>1500 mL</u> <u>2000 mL</u>	결정화	5. THF에 녹인 후, 0 °C 하에서 IPE를 첨가, solid 생성	
7. Hex	<u>1000 mL</u>	여과	6. 생성된 고체를 여과하고, Hex로 씻어준다.	
			마른 수율 : 62.940 g 수율 : 50.1 g (79.6%) LC data : 98.95%	

4 HDP-247-056(HD-2356-Na⁺)

Sample Name:	HDP-247-056(HD-2356-Na ⁺)	Injection Volume:	5.0
Vial Number:	RA3	Channel:	UV_VIS_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	2356_BD	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	2356	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	2014-09-17 12:41	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	57.00	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU ² /min	Rel.Area %	Resolution(USP)	Plates(USP)
✓1	18.20	n.a.	1.621	0.2826	0.12	n.a.	73789
2	21.39	n.a.	0.736	0.1392	0.06	11.68	94397
3	23.15	n.a.	0.531	0.1097	0.05	6.25	105939
✓4	24.70	n.a.	2.287	0.3363	0.14	8.02	183727
5	25.17	n.a.	0.000	0.1019	0.04	n.a.	n.a.
6	26.09	n.a.	0.394	0.0634	0.03	n.a.	136325
7	29.88	n.a.	0.924	0.1550	0.06	13.23	169311
8	31.32	n.a.	0.663	0.1142	0.05	5.14	220114
9	32.49	n.a.	0.612	0.0970	0.04	4.60	283716
10	✓ 32.78	n.a.	1.577	0.2956	0.12	1.10	233740
11	✗ 36.08	n.a.	3.748	0.8417	0.35	10.47	161564
12	37.93	n.a.	1577.407	239.8127	98.95	6.17	397870
Total:			1590.502	242.349	100.00		64.663

3.3.2. HD-2356 유연물질 규명 연구(HD-Syn-01)

- 연구 목표 : 비임상 원료(DS) 유연물질 (>0.1%, RRT) 7개(1.12, 0.94, 0.84, 0.76, 0.59, 0.49, 0.41) 구조 확인 및 공정 최적화 연구
- 연구 결과 :
 - 4종의 impurity(RRT: 1.12, 0.76, 0.59, 0.41) 구조 확인 완료
 - 공정개선 연구로 RRT=1.12 (0.16%), 외에 나머지 6개의 유연물질은(RRT 0.94, 0.84, 0.76, 0.59, 0.49, 0.41) < 0.1%이하로 공정 개선함
 - (실험실 30g scale 5 batch에서 확인)
- 유연물질 구조

Impurity (Chemical Name)	Structure	Source
4'-formyl-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylic acid		RRT = 0.41
(S)-N-(1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl)-4'-(hydroxymethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-carboxamide		RRT = 0.59
1-((2'-carboxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-6-carboxylic acid		RRT = 0.76
N2-((R)-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl)-N4'-(S)-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl-[1,1'-biphenyl]-2,4'-dicarboxamide		RRT = 1.12

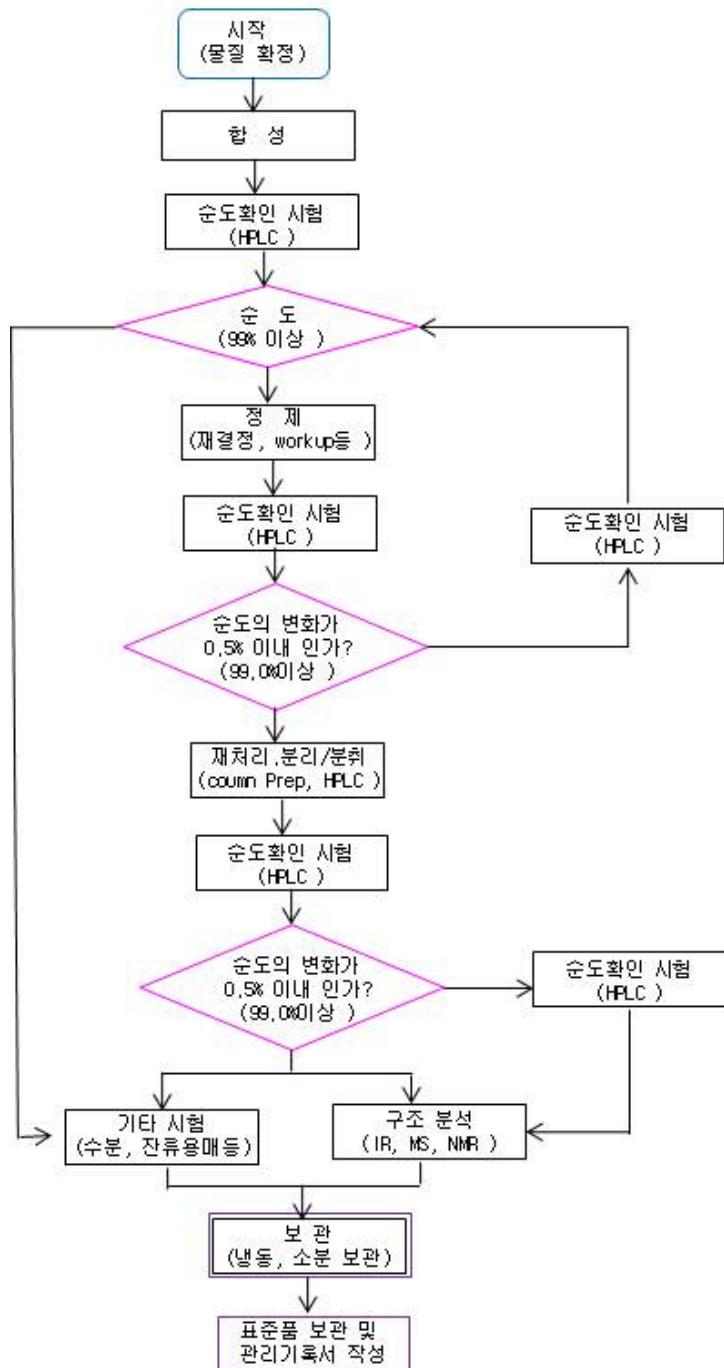
3.3.3. HD-2356 대량생산 (HD-Syn-02)

- 3.3.1.2. HD-2356 합성 연구결과를 토대로 위에 기술한 공정으로 수행함
- DS의 안정성과 비임상 GLP-Toxicity를 위한 시료 1.5 kg과 3.1 kg을 각각 합성함

3.3.4. 표준물질 합성

물질 분석을 위하여 표준품을 합성해야 하므로 하기의 표준품 제조 프로세스에 따라 합성하였다.

표준품 제조 프로세스



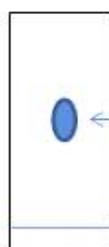
- 연구 결과 : 50g 확보 (Assay : 99.73%)
기준 및 시험방법 확립함

[연구 내용]



1. 결정형이 semi-solid type
2. Assay 99% 이상 절제가 어려움(assay: 97~98%)
3. Prep LC 사용시 절제 가능, but 1일 500mg 확보가능
20g 확보 시, 40일 소요

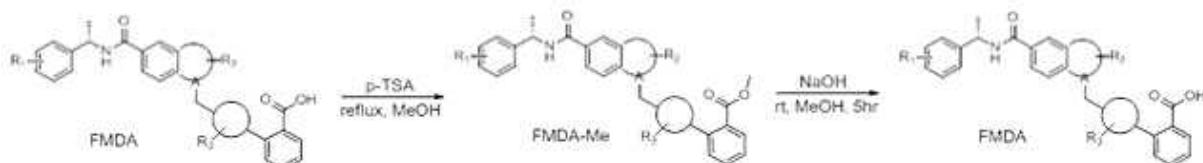
$\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9:1$



불순물이 포함됨

◆ 일반 column으로 분리가 어렵고, Prep LC로만 분리 가능함

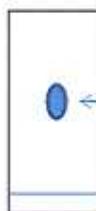
TLC 용매가 극성이라 불순물 확인에 어려움 있음



정제 전 (assay: ~97%)

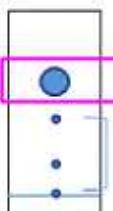
정제 후 (assay: ≥99.5%)

$\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9:1$



불순물이 포함됨

$\text{HX} : \text{EA} = 1:1$



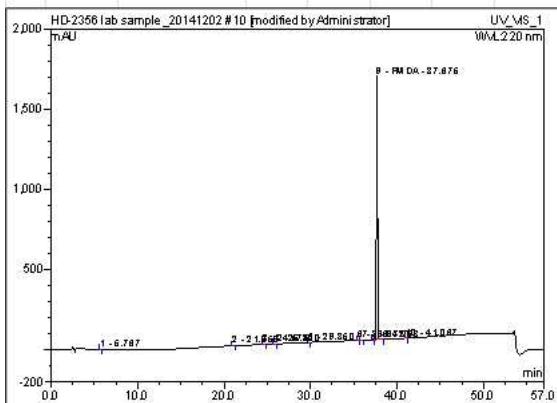
일반 column으로 분리가능

불순물이 분리됨
• 살포도는 더 적음

TLC 용매가 극성이라 불순물 확인에 어려움 있음

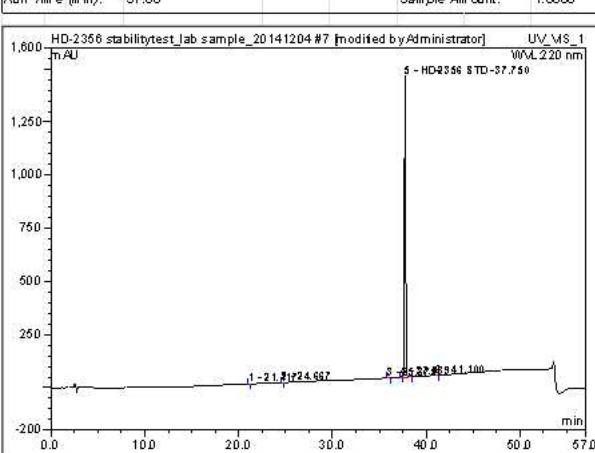
TLC 용매를 비극성으로 바꿈

10 SH_FMDA	
Sample Name:	SH_FMDA
Vial Number:	GB12
Sample Type:	unknown
Control Program:	2356_BD
Quantif. Method:	2356nLap sample 20141028_SK
Recording Time:	2014-12-02 18:58
Run Time (in min):	57.00
Injection Volume:	5.0
Channel:	UV_VIS_1
Wavelength:	n.a.
Bandwidth:	n.a.
Dilution Factor:	1.0000
Sample Weight:	1.0000
Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time	Peak Name	Height	Area	Rel.Area	Amount	Type
	min		mAU	mAU*min	%		
1	5.77	n.a.	0.301	0.034	0.01	n.a.	BMB*
2	21.05	n.a.	0.296	0.047	0.02	n.a.	BMB*
3	24.58	n.a.	0.370	0.056	0.02	n.a.	BMB*
4	26.80	n.a.	0.349	0.054	0.02	n.a.	BMB*
5	29.85	n.a.	0.472	0.067	0.03	n.a.	BMB*
6	35.54	n.a.	0.841	0.138	0.05	n.a.	BM*
7	36.12	n.a.	0.000	0.128	0.05	n.a.	MB*
8	37.26	n.a.	2.057	0.317	0.13	n.a.	BM*
9	37.68	RMDA	1638.860	249.699	99.60	n.a.	MB*
10	41.07	n.a.	1.050	0.166	0.07	n.a.	BMB*
Total:			1644.597	250.704	100.00	0.000	

7 HD-2356_STD	
Sample Name:	HD-2356_STD
Vial Number:	GAB
Sample Type:	unknown
Control Program:	2356_BD
Quantif. Method:	2356nLap sample 20141028_SK
Recording Time:	2014-12-04 15:02
Run Time (in min):	57.00
Injection Volume:	5.0
Channel:	UV_VIS_1
Wavelength:	n.a.
Bandwidth:	n.a.
Dilution Factor:	1.0000
Sample Weight:	1.0000
Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time	Peak Name	Height	Area	Rel.Area	Amount	Type
	min		mAU	mAU*min	%		
1	21.12	n.a.	0.438	0.073	0.03	n.a.	BMB*
2	24.67	n.a.	0.299	0.052	0.02	n.a.	BMB*
3	35.88	n.a.	0.368	0.079	0.04	n.a.	BMB*
4	37.33	n.a.	2.159	0.328	0.15	n.a.	BM*
5	37.75	HD-2356 STD	1416.494	218.088	99.73	n.a.	MB*
6	41.10	n.a.	0.382	0.063	0.03	n.a.	BMB*
Total:			1420.139	218.683	100.00	0.000	

3.3.5. DS (원료)의 가속 및 장기 안정성 연구

3.3.5.1. HD-2356 분석시험 (Report Number HD-Anal-01)

안정성 시험을 위한 분석 방법을 확립하였다.

HD-2356 시험방법서

1. Appearance

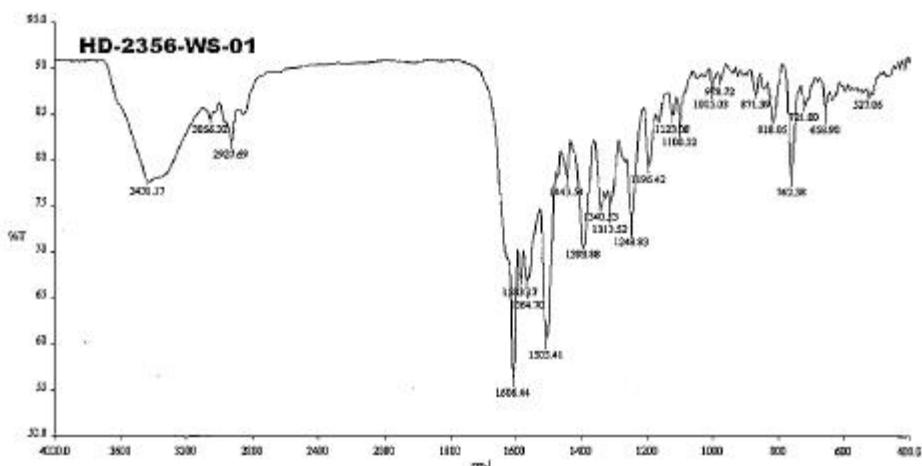
시료 약 1.0g ($1.0g \pm 0.1g$)을 취하여 거름종이 위에 옮겨놓고 육안으로 색상을 관찰한다.

2. Identification

2.1 FT-IR (KBr 법)

KBr 분말 200mg 정도와 시료 2~4mg을 악대사발로 잘 갈아준다. 고운 입자가 되도록 충분히 갈아준다. KBr은 흡습성이 있으므로 분쇄 종에 흡습 되지 않도록 빨리 하는 것이 좋다. 분쇄한 시료는 정제 성형기로 disk를 만든다. IR Spectrum을 측정한다.

< 대표 IR Chart >



2.2 HPLC RT (Retention Time)

3함과 동일



3. Purity (HPLC)

3.1 HPLC Operation Parameters

Column : Zorbax Eclipse Plus C18 , 5um, 4.6 x 250 mm

Column temperature : 30°C

Flow rate : 1.0mL/min

Injection Volume: 5uL

Wavelength : 220nm

Mobile Phase A : 0.1% TFA in H₂O/MeOH = 60/40

Mobile Phase B : MeOH/0.1% TFA in ACN = 40/60

Diluent : Methanol

Gradient :

Time (min)	Mobile Phase A(%)	Mobile Phase B(%)
0	80	20
3	80	20
30	10	90
35	10	90
35.10	80	20
42	80	20

Total run time : 42min

3.2 Reagents

- 1) Acetonitrile (HPLC Grade)
- 2) Methanol (HPLC Grade)
- 3) Water (HPLC Grade)
- 4) Trifluoroacetic acid (HPLC Grade)

3.3 Mobile Phase and Sample Preparation

1) Mobile Phase A : 0.1% TFA in H₂O/MeOH = 60/40

: 1L의 volumetric flask 안의 1L H₂O에 TFA 1mL를 첨가한다. 잘 섞은 후 이 액 600mL 과 MeOH 400mL를 1L 이동상 bottle에 넣고 잘 혼합한다.



2) Mobile Phase B : MeOH/0.1% TFA in ACN = 40/60

: 1L의 volumetric flask 안의 1L ACN에 TFA 1mL를 첨가한다. 잘 섞은 후 이 액 600mL과 MeOH 400mL를 1L 이동상 bottle에 넣고 잘 혼합한다.

3) Diluent : Methanol

4) Sample Preparation

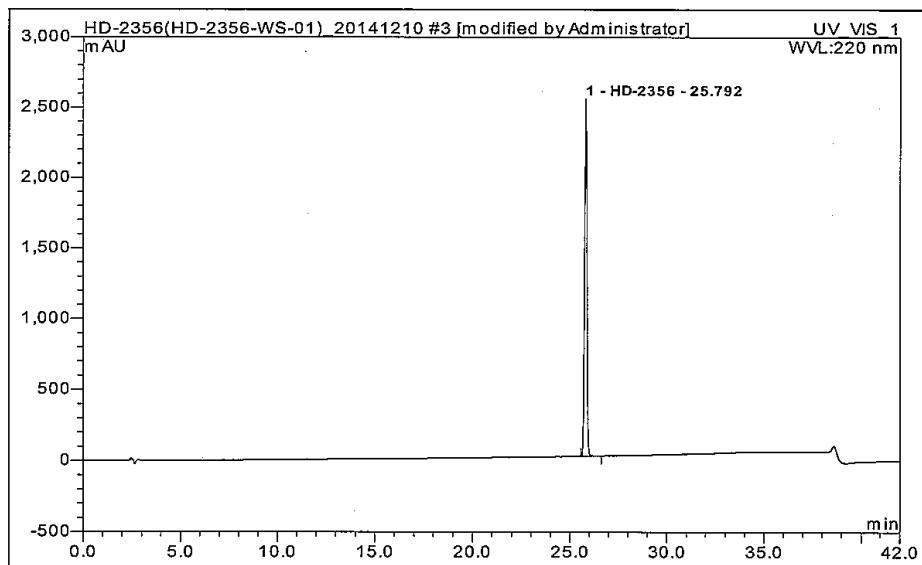
(1) Standard Solution

: HD-2356 표준품 약 50mg을 정확히 달아 50mL 용량 플라스크에 넣는다. 적당량의 Diluent를 넣고 잘 섞어준 다음 표시한다.

(2) Sample Solution

: HD-2356 Sample 약 50mg을 정확히 달아 50mL 용량 플라스크에 넣는다. 적당량의 Diluent를 넣고 잘 섞어준 다음 표시한다.

< 대표 Chromatogram >



4. Residual Solvent (GC)

4.1 GC Operation Parameters

Column : Agilent DB-624 (30m, 0.250mm ID, 1.40um DF)

Carrier Gas : Helium

Run Mode : 0.7mL/min (Constant Flow)

Injection Mode : Split ration 10:1

Injection Port Temperature : 200 °C

Detection Mode : Flame Ionization

Detection Gas Flow Rates : 30mL/min H₂, 25mL/min He, 300mL/min air

Detection Port Temperature : 260 °C

Injection Volume: 1.0uL

Diluent : Dimethylsulfoxide (DMSO)

Oven Temperature Program:

40 °C, hold for 3 minutes

Ramp at 5 °C /min to 100 °C

Ramp at 25 °C /min to 250 °C; hold for 5 minutes

Acquisition Time : 26.0 minutes

4.2 Reagents and Standard

- 1) Methanol (Sigma-Aldrich)
- 2) Ethanol (Sigma-Aldrich)
- 3) Dichloromethane (Sigma-Aldrich)
- 4) Hexane (Sigma-Aldrich)
- 5) Diisopropyl ether (Sigma-Aldrich)
- 6) Ethyl acetate (Sigma-Aldrich)
- 7) Tetrahydrofuran (Sigma-Aldrich)
- 8) Dimethylsulfoxide (DAEJUNG)



4.3 Standard and Sample Preparation

1) Standard Solution

(1) Stock Standard Solution

: 약 40mL의 DMSO가 들어있는 100mL 용량 플라스크 안에 각각의 solvent (MeOH, EtOH, MC, Hexane, IPE, EA, THF)를 약 250mg씩을 정확히 달아 넣어 잘 섞는다. DMSO로 표선 한 후 잘 섞는다.

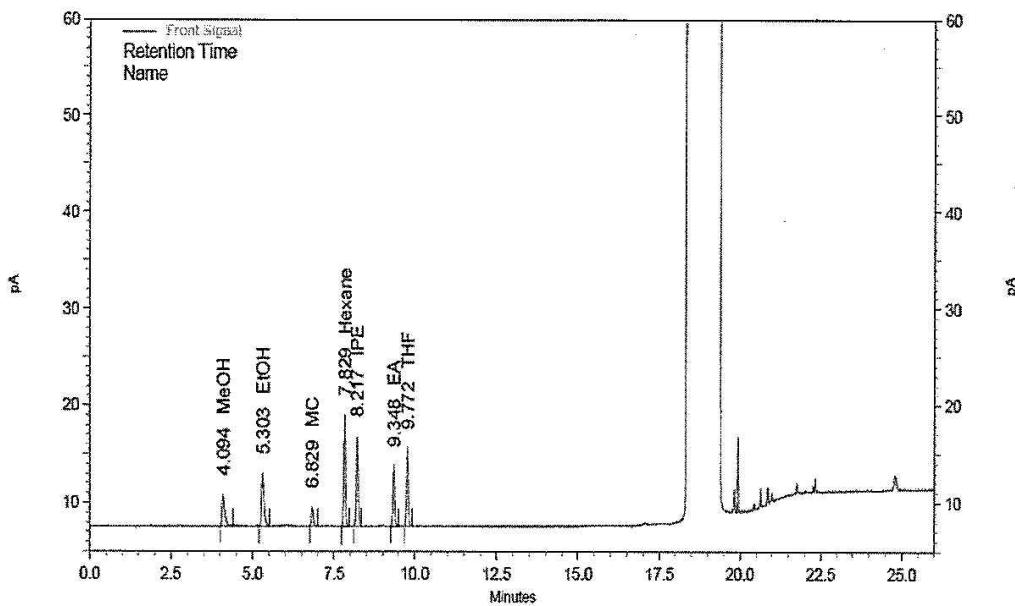
(2) Working Standard Solution

: 100mL 용량 플라스크에 Stock Standard Solution 2.0mL을 넣고 DMSO로 표선 한 후 잘 섞는다. 이 Working Standard Solution의 각 solvent 농도는 Sample solution HD-2356 기준농도 50mg/mL 대비 0.1% wt%이다.

2) Sample Solution

: HD-2356 Sample 약 250mg을 정확히 달아 5mL 용량 플라스크에 넣는다. 적당량의 DMSO를 넣고 잘 섞어준 다음 표선한다.

< 대표 Chromatogram >



5. Stereochemical Impurity (HPLC)

5.1 HPLC Operation Parameters

Column : CHIRALPAK AD-H, 5um, 4.6 x 250 mm

Column temperature : 30 °C

Mobile Phase : Hexane/Ethanol/TFA=500/500/1(v/v)

Diluent : Ethanol

Flow rate : 1.0mL/min

Injection Volume : 5uL

Wavelength : 220nm

Total run time : 15min

5.2 Reagents

1) Hexane (HPLC Grade)

2) Ethanol (HPLC Grade)

3) Trifluoroacetic acid (HPLC Grade)

5.3 Mobile Phase and Sample Preparation

1) Mobile Phase

: 1L bottle에 메스실린더를 사용하여 Hexane 500mL, Ethanol 500mL를 넣고 TFA 1mL을 각각 넣고 잘 섞어준다.

2) Diluent : Ethanol

3) Sample Preparation

(1) Standard Solution

: HD-2356 Standard 약 10mg을 정확히 달아 10mL 용량 플라스크에 넣는다. 적당량의 Diluent를 넣고 잘 섞어준 다음 표시한다.

(2) Standard Solution

: HD-2356 Sample 약 10mg을 정확히 달아 10mL 용량 플라스크에 넣는다. 적당량의





HYUNDAI PHARM. CO., IND

New drug Discovery Lab.
10F, Gyeonggi Bio-Center, 864-1, Iui-dong
Yeongtong-gu, Suwon-city, Gyeonggi-do

Tel: 82-31-888-6394
Fax: 82-31-888-6399

Certificate of Analysis

Product:	: HD-2356	Manufacturing Date	: Feb. 02, 2015
Batch. No.	: HD-2356-WS-02	Test Date	: Feb. 10, 2015
Supplier	: Hyundai Pharm.	Retest Date	: May. 09, 2015
Quantity	: 99g	Analysis Method	: In house
Storage Condition	: 2-8°C, Protect from light		

Tests	Specifications	Results
Appearance	White to yellow powder	Off-white powder
Identification		
- FT-IR	Should be consistent with the chemical structure when compared to reference standard	Consistent with the chemical structure when compared to reference standard
- HPLC retention time	Retention time for main peak consistent with reference peak	Retention time for main peak consistent with reference peak
Related substance (HPLC, Area%)		
- Individual impurity	Not more than 0.5% Report all impurity \geq 0.05% (by RRT)	Passed ND
- Total impurity	Not more than 3.0%	0.2%
Purity (HPLC, Area%)	Not less than 97.0%	99.8%
Residual solvent (GC)		
- Methanol	Not more than 3000ppm	52ppm
- <i>tert</i> -Butyl methyl ether	Not more than 5000ppm	4876ppm
- Tetrahydrofuran	Not more than 720ppm	ND
-		
Residual solvent (Carry over, GC)		
- Ethanol	Not more than 5000ppm	ND
- Methylene chloride	Not more than 600ppm	ND
- Hexane	Not more than 290ppm	ND
- Ethyl acetate	Not more than 3000ppm	ND
Stereochemical Impurity (HPLC)	Not more than 0.5%	0.03%
Sodium content (ICP-OES))	Report	4.3%



현대약품(주)
HYUNDAI PHARM

HYUNDAI PHARM. CO., IND

New drug Discovery Lab.
10F, Gyeonggi Bio-Center, 864-1, Iui-dong
Yeongtong-gu, Suwon-city, Gyeonggi-do

Tel: 82-31-888-6394
Fax: 82-31-888-6399

Heavy Metals (ICP-OES)

- As	15ppm	ND
- Pb	5.0ppm	ND
- Cd	5.0ppm	ND
- Hg	40ppm	ND
- Pd	100ppm	ND
- Co	50ppm	ND
- Mo	180ppm	ND
- V	120ppm	ND
- Se	170ppm	ND

Water (Karl Fischer) Not more than 5.0% 1.6%

Assay (Potency) Not less than 95.0% 97.7%

----- end of document -----

Decision: Passed

Date: Feb. 10, 2015

Researcher of Analysis Lab. :

Chief of Analysis Lab. :

QA manager of Analysis Lab. :


HYUNDAI PHARM. CO., IND

 New drug Discovery Lab.
 10F, Gyeonggi Bio-Center, 864-1, Iui-dong
 Yeongtong-gu, Suwon-city, Gyeonggi-do

 Tel: 82-31-888-6394
 Fax: 82-31-888-6399

- tert-Butyl methyl ether	Not more than 5000ppm	609ppm
- Tetrahydrofuran	Not more than 720ppm	543ppm

Residual solvent (Carry over, GC)		
- Methylene chloride	Not more than 600ppm	156ppm
- Hexane	Not more than 290ppm	ND
- Diisopropyl ether	Not more than 5000ppm	ND
- Ethyl acetate	Not more than 3000ppm	61ppm

Stereochemical Impurity (HPLC)	Not more than 0.5%	0.03%
-----------------------------------	--------------------	-------

Sodium content (ICP-OES)	Report	4.1%
--------------------------	--------	------

Heavy Metals (ICP-OES)		
- As	15ppm	ND
- Pb	5.0ppm	ND
- Cd	5.0ppm	ND
- Hg	40ppm	ND
- Pd	100ppm	ND
- Co	50ppm	ND
- Mo	180ppm	ND
- V	120ppm	ND
- Se	170ppm	ND

Water (Karl Fischer)	Not more than 5.0%	0.5%
----------------------	--------------------	------

Assay (HPLC, anhydrous basis)	Not less than 95.0%	97.7%
----------------------------------	---------------------	-------

----- end of document -----

Decision: Passed

Date: Apr. 14, 2015

3/3/14
Eun

Researcher of Analysis Lab. :

Chief of Analysis Lab. :

QA manager of Analysis Lab. :

○ 1차 년도 비임상 원료(DS) 생산 COA



HYUNDAI PHARM. CO., IND

New drug Discovery Lab.
10F, Gyeonggi Bio-Center, 864-1, Iui-dong
Yeongtong-gu, Suwon-city, Gyeonggi-do

Tel: 82-31-888-6394
Fax: 82-31-888-6399

Certificate of Analysis

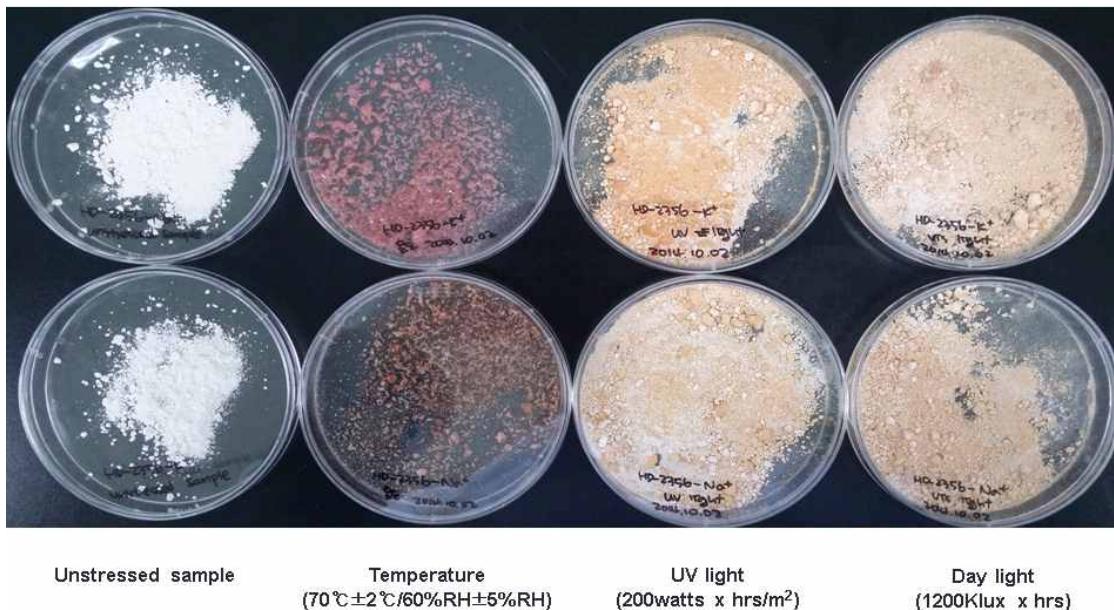
Product:	: HD-2356	Manufacturing Date	: Mar. 27, 2015
Batch. No.	: HD-2356-P-15001	Test Date	: Apr. 14, 2015
Supplier	: Hyundai Pharm.	Retest Date	: Jul. 13, 2015
Quantity	: 1.52kg	Analysis Method	: In house
Storage Condition	: 2-8°C, Protect from light		
Tests	Specifications	Results	
Appearance	White to yellow powder	Yellowish powder	
Identification			
- FT-IR	Should be consistent with the chemical structure when compared to reference standard	Consistent with the chemical structure when compared to reference standard	
- HPLC retention time	Retention time for main peak consistent with reference peak	Retention time for main peak consistent with reference peak	
Related substance (HPLC, Area%)			
- Individual impurity	Not more than 0.5% Report all impurity \geq 0.05% (by RRT)	Passed RRT 0.37, 0.05% RRT 0.41, 0.12% RRT 0.49, 0.09% RRT 0.55, 0.09% RRT 0.58, 0.15% RRT 0.75, 0.09% RRT 0.76, 0.13% RRT 0.79, 0.05% RRT 0.84, 0.16% RRT 0.88, 0.07% RRT 0.94, 0.25% RRT 1.02, 0.06% RRT 1.12, 0.16% RRT 1.15, 0.07% RRT 1.38, 0.07%	
- Total impurity	Not more than 3.0%	1.7%	
Purity (HPLC, Area%)	Not less than 97.0%	98.3%	
Residual solvent (GC)			
- Methanol	Not more than 3000ppm	ND	

3.3.5.2. 가혹시험

- HD-2356의 가혹조건 하에서 성상변화

Appearance (성상)

가혹 조건에서의 성상변화



위의 결과에서 나타내는 것과 같이 실온(unstressed sample)에서는 성상변화가 없었으나, 가온($70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ /60%RH $\pm 5\%$ RH) 및 빛(uv 200watt X hrs/m², 1200klux × hrs)에서는 녹는 현상 및 변색이 됨을 확인 할 수 있었다. 또한 함량 측정(HPLC)결과 HD-2356 화합물이 분해됨을 확인 하였다. 따라서 본 연구결과를 토대로 향후 장기보전 안정성 연구를 위해서는 빛이 차단되는 포장방법을 사용하여야 할 것으로 사료된다.

3.3.6.3. 장기보존시험, 가속 시험, 냉장조건에서 안정성시험 (12개월)

- 장기조건은 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH),
- 가속시험은 광선(광원:형광-D65)과 습도 $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 5\%$ RH),
- 내장조건은 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 수행함.

- 연구 목적 : HD-2356의 안정성 기간을 확보하기 위한 아래의 보관조건과 포장 방법으로 시료를 포장하여 안정성 시험을 착수 한다
- 시료 정보 : Batch No. HD-2356-L-14001
- 시험 기간 : 12개월 (2015.01.16 ~ 2016.01.16)
- 시험 방법 : HD-2356 시험방법서
- 보관 절차

구분		조건
1	장기보존(LT)	25°C±2°C/60% RH±5%RH
2	가속조건(AC)	40°C±2°C/75% RH±5%RH
3	냉장조건	5°C±3°C

- 포장 방법

1	<ul style="list-style-type: none"> - 1차 포장 : Double PE bag + Silicagel - 2차 포장 : Aluminum bag Aluminum b
2	<ul style="list-style-type: none"> - 1차포장 : Double PE bag + Silicagel - 2차포장 : Amber HDPE bottle

- 비 고

시험주기

장기 보존, 가속, 냉장 조건에서 3, 6, 9, 12 개월을 실시하도록 한다.

안정성 시험 항목

안정성 시험 시 경시 변화가 없는 항목인 중금속 시험은 항목에서 제외한다.

(단, 최종 12개월에는 전 항목을 분석하도록 한다.)

* 첨부 Table 1, Table 2 참조

파제 코드.	HI14C0995.	화제명.	(비밀) 획기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발.
제목.	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 냉장) 개발.		
문서번호.	HD-A-150501 (ver1.0).	작성일자.	2015년 09월 15일.
연구기간.	2015.01.16 ~ 2016.01.16.	작성자.	김은영.

Table 2. HD-2356-L-14001 안정성 시험 계획표

시험기간 (개월수)	보관 조건	포장방법.	Appearance.	Identification. FT-IR., HPLC RT.	Related Substance.	Purity.	Stereochemical Impurity.	Sodium content.	Heavy Metals.	Water.	Loss on drying.	Assay.
3 ^o	LT ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
	AC ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
	냉장 ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
6 ^o	LT ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
	AC ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
	냉장 ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○

시험기간 (개월수)	보관 조건	포장방법.	Appearance.	Identification. FT-IR., HPLC RT.	Related Substance.	Purity.	Stereochemical Impurity.	Sodium content.	Heavy Metals.	Water.	Loss on drying.	Assay.
9 ^o	LT ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
	AC ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
	냉장 ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
12 ^o	LT ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
	AC ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
	냉장 ^o	Double PE bag + Silicagel. + Aluminum bag.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○
		Double PE bag + Silicagel. + Amber HDPE bottle.	●○	●○	●○	●○	●○	●○	-○	●○	●○	●○

* 보관조건 : LT - Long term (25°C±2°C/60%RH±5%RH) // AC - Accelerated condition (40°C±2°C/75%RH±5%RH) // 냉장 - Refrigerator (5°C±3°C)

과제 코드	HII4C0995	과제명	(비임상)획기적 재증강소 효과를 가지는 First in class 항노령 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 기속, 냉장/6개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 3. HD-2356-L-14001 장기보존 (LT) 결과표

(포장 방법: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag)

Tests		Specification	보관: 장기보존 (25°C±2°C/60%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag				
			Initial	3months	6months	9months	12months
			2015.01.22	2015.04.28	2015.07.29		
Identification	FT-IR	Should be consistent with the chemical structure when compared to reference standard	Passed	Passed	Passed		
	HPLC RT	Retention time for main peak consistent with reference peak	Passed	Passed	Passed		
Related Substance (HPLC, Area%)	Individual impurity	NMT 0.5%	Passed	Passed (Table 10 참조)	Passed (Table 10 참조)		
	Total impurity	NMT 3.0%	1.2%	1.2%	1.4%		
Purity (HPLC, Area%)		NLT 97.0%	98.8%	98.8%	98.6%		
Stereochemical impurity (HPLC)		NMT 0.5%	0.26%	0.25%	0.25%		
Sodium content (ICP-OES)		Report	4.2%	3.9%	3.9%		
Heavy Metals (ICP-OES)	As	NMT 15ppm	ND				
	Pb	NMT 5.0ppm	ND				
	Cd	NMT 5.0ppm	ND				
	Hg	NMT 40ppm	ND				
	Pd	NMT 100ppm	ND				
	Co	NMT 50ppm	ND				
	Mo	NMT 180ppm	ND				
	V	NMT 120ppm	ND				
	Se	NMT 170ppm	ND				
Water (Karl Fischer)		NMT 5.0%	0.8%	1.7%	2.4%		
Loss on drying		Report	0.7%	1.7%	1.5%		
Assay (HPLC, anhydrous basis)		NLT 95.0%	98.6%	98.0%	98.2%		

화제 코드	HI14C0995	제작명	(비임상) 휙기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발	
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 냉장/6개월)			
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일	
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영	

Table 4. HD-2356-L-14001 장기보존 (LT) 결과표

(포장방법: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle)

Tests		Specification	보관: 장기보존 (25°C±2°C/60%RH±5%RH)/ 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				
			Initial	3months	6months	9months	12months
			2015.01.22	2015.04.28	2015.07.29		
Appearance		White or Off-White powder	Off-white powder	Off-white powder	Off-white powder		
Identification	FT-IR	Should be consistent with the chemical structure when compared to reference standard	Passed	Passed	Passed		
	HPLC RT	Retention time for main peak consistent with reference peak	Passed	Passed	Passed		
Related Substance (HPLC, Area%)	Individual impurity	NMT 0.5%	Passed	Passed (Table 11 참조)	Passed (Table 11 참조)		
	Total impurity	NMT 3.0%	1.2%	1.2%	1.4%		
Purity (HPLC, Area%)		NLT 97.0%	98.8%	98.8%	98.6%		
Stereochemical impurity (HPLC)		NMT 0.5%	0.26%	0.25%	0.25%		
Sodium content (ICP-OES)		Report	4.2%	3.9%	3.9%		
Heavy Metals (ICP-OES)	As	NMT 15ppm	ND				
	Pb	NMT 5.0ppm	ND				
	Cd	NMT 5.0ppm	ND				
	Hg	NMT 40ppm	ND				
	Pd	NMT 100ppm	ND				
	Co	NMT 50ppm	ND				
	Mo	NMT 180ppm	ND				
	V	NMT 120ppm	ND				
Water (Karl Fischer)		NMT 5.0%	0.8%	1.8%	2.5%		
Loss on drying		Report	0.7%	1.8%	1.7%		
Assay (HPLC, anhydrous basis)		NLT 95.0%	98.6%	98.2%	98.4%		

화제 코드	HI14C0995	화제명	(비임상)획기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 냉장/6개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 5. HD-2356-L-14001 가속조건 (AC) 결과표

(포장방법: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag)

Tests		Specification	보관: 가속조건 (40°C±2°C/75%RH±5%RH)/ 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag				
			Initial	3months	6months	9months	12months
		2015.01.22	2015.04.28	2015.07.29			
Appearance		White or Off-White powder	Off-white powder	Off-white powder	Off-white powder		
Identification	FT-IR	Should be consistent with the chemical structure when compared to reference standard	Passed	Passed	Passed		
	HPLC RT	Retention time for main peak consistent with reference peak	Passed	Passed	Passed		
Related Substance (HPLC, Area%)	Individual impurity	NMT 0.5%	Passed	Passed (Table 12 참조)	Passed (Table 12 참조)		
	Total impurity	NMT 3.0%	1.2%	1.3%	1.7%		
Purity (HPLC, Area%)		NLT 97.0%	98.8%	98.7%	98.3%		
Stereochemical impurity (HPLC)		NMT 0.5%	0.26%	0.26%	0.25%		
Sodium content (ICP-OES)		Report	4.2%	3.9%	3.9%		
Heavy Metals (ICP-OES)	As	NMT 15ppm	ND				
	Pb	NMT 5.0ppm	ND				
	Cd	NMT 5.0ppm	ND				
	Hg	NMT 40ppm	ND				
	Pd	NMT 100ppm	ND				
	Co	NMT 50ppm	ND				
	Mo	NMT 180ppm	ND				
	V	NMT 120ppm	ND				
Se		NMT 170ppm	ND				
Water (Karl Fischer)		NMT 5.0%	0.8%	2.0%	2.4%		
Loss on drying		Report	0.7%	1.7%	1.9%		
Assay (HPLC, anhydrous basis)		NLT 95.0%	98.6%	98.1%	98.0%		

과제 코드	HI14C0995	과제명	(비밀상) 획기적 재충강소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 낭장생개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 6. HD-2356-L-14001 가속조건 (AC) 결과표

(포장방법: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle)

Tests		Specification	보관: 가속조건 (40°C±2°C/75%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				
			Initial	3months	6months	9months	12months
		2015.01.22	2015.04.28	2015.07.29			
Appearance		White or Off-White powder	Off-white powder	Off-white powder	Off-white powder		
Identification	FT-IR	Should be consistent with the chemical structure when compared to reference standard	Passed	Passed	Passed		
	HPLC RT	Retention time for main peak consistent with reference peak	Passed	Passed	Passed		
Related Substance (HPLC, Area%)	Individual impurity	NMT 0.5%	Passed	Passed (Table 13 참조)	Passed (Table 13 참조)		
	Total impurity	NMT 3.0%	1.2%	1.4%	1.8%		
Purity (HPLC, Area%)		NLT 97.0%	98.8%	98.6%	98.2%		
Stereochemical impurity (HPLC)		NMT 0.5%	0.26%	0.25%	0.25%		
Sodium content (ICP-OES)		Report	4.2%	3.7%	4.1%		
Heavy Metals (ICP-OES)	As	NMT 15ppm	ND				
	Pb	NMT 5.0ppm	ND				
	Cd	NMT 5.0ppm	ND				
	Hg	NMT 40ppm	ND				
	Pd	NMT 100ppm	ND				
	Co	NMT 50ppm	ND				
	Mo	NMT 180ppm	ND				
	V	NMT 120ppm	ND				
	Se	NMT 170ppm	ND				
Water (Karl Fischer)		NMT 5.0%	0.8%	2.4%	3.2%		
Loss on drying		Report	0.7%	2.5%	2.6%		
Assay (HPLC, anhydrous basis)		NLT 95.0%	98.6%	97.5%	97.8%		

제작 코드	HI14C0995	제작일	(비밀번호) 초기적 재용감소 효과를 가지는 First in class 일노벨 치료제 HD-2356 개발
제작	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (증기, 기속, 냉장화개입)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 7. HD-2356-L-14001 냉장조건 결과표

(포장방법: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag)

Tests		Specification	보관: 냉장조건 ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)				
			Initial	3months	6months	9months	12months
			2015.01.22	2015.04.28	2015.07.29		
Appearance		White or Off-White powder	Off-white powder	Off-white powder	Off-white powder		
Identification	FT-IR	Should be consistent with the chemical structure when compared to reference standard	Passed	Passed	Passed		
	HPLC RT	Retention time for main peak consistent with reference peak	Passed	Passed	Passed		
Related Substance (HPLC, Area%)	Individual impurity	NMT 0.5%	Passed	Passed (Table 14 #3)	Passed (Table 14 #3)		
	Total impurity	NMT 3.0%	1.2%	1.2%	1.2%		
Purity (HPLC, Area%)		NLT 97.0%	98.8%	98.8%	98.8%		
Stereochemical impurity (HPLC)		NMT 0.5%	0.26%	0.25%	0.25%		
Sodium content (ICP-OES)		Report	4.2%	3.7%	3.9%		
Heavy Metals (ICP-OES)	As	NMT 15ppm	ND				
	Pb	NMT 5.0ppm	ND				
	Cd	NMT 5.0ppm	ND				
	Hg	NMT 40ppm	ND				
	Pd	NMT 100ppm	ND				
	Co	NMT 50ppm	ND				
	Mo	NMT 180ppm	ND				
	V	NMT 120ppm	ND				
Se		NMT 170ppm	ND				
Water (Karl Fischer)		NMT 5.0%	0.8%	1.0%	2.2%		
Loss on drying		Report	0.7%	1.0%	1.3%		
Assay (HPLC, anhydrous basis)		NLT 95.0%	98.6%	97.3%	98.0%		

제품 코드	HI14C0995	제제명	(비밀상)학기적 제충감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발
제작	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (증기, 가속, 날짜별)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 8. HD-2356-L-14001 낭장조건 결과표

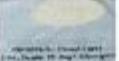
(포장방법: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle)

Tests		Specification	보관: 낭장조건 (5°C~33°C) 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				
			Initial	3months	6months	9months	12months
		2015.01.22	2015.04.28	2015.07.29			
Appearance		White or Off-White powder	Off-white powder	Off-white powder	Off-white powder		
Identification	FT-IR	Should be consistent with the chemical structure when compared to reference standard	Passed	Passed	Passed		
	HPLC RT	Retention time for main peak consistent with reference peak	Passed	Passed	Passed		
Related Substance (HPLC, Area%)	Individual impurity	NMT 0.5%	Passed	Passed (Total 15 ppm)	Passed (Total 15 ppm)		
	Total impurity	NMT 3.0%	1.2%	1.2%	1.3%		
Purity (HPLC, Area%)		NLT 97.0%	98.8%	98.8%	98.7%		
Stereoechemical impurity (HPLC)		NMT 0.5%	0.26%	0.26%	0.25%		
Sodium content (ICP-OES)		Report	4.2%	3.9%	4.0%		
Heavy Metals (ICP-OES)	As	NMT 15ppm	ND				
	Pb	NMT 5.0ppm	ND				
	Cd	NMT 5.0ppm	ND				
	Hg	NMT 40ppm	ND				
	Pd	NMT 100ppm	ND				
	Co	NMT 50ppm	ND				
	Mo	NMT 180ppm	ND				
	V	NMT 120ppm	ND				
Se		NMT 170ppm	ND				
Water (Karl Fischer)		NMT 5.0%	0.8%	1.2%	2.2%		
Loss on drying		Report	0.7%	1.2%	1.0%		
Assay (HPLC, anhydrous basis)		NLT 95.0%	98.6%	97.6%	97.6%		

제작 코드	HI14C0995	제작일	(비밀상) 회기자 체증감소 효과를 가지는 First in class 일노를 차음제 HD-2356 개발
제작	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 낭간(6개월))		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 9. HD-2356-L-14001 성상 변화 (Specification: White or Off-white powder)

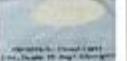
보관조건	포장방법	3months	6months	9months	12months
장기보관 (25°C±2°C/60%RH±5%RH)	Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag	Off-white powder	Off-white powder		
	Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle	Off-white powder	Off-white powder		
가속조건 (40°C±2°C/75%RH±5%RH)	Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag	Off-white powder	Off-white powder		
	Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle	Off-white powder	Off-white powder		
냉장조건 (5°C±3°C)	Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag	Off-white powder	Off-white powder		
	Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle	Off-white powder	Off-white powder		

Period Condition	3months	6months	9months	12months
보관: 장기보관 (25°C±2°C/60%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag				
보관: 장기보관 (25°C±2°C/60%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				
보관: 가속조건 (40°C±2°C/75%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag				
보관: 가속조건 (40°C±2°C/75%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				
보관: 낭장조건 (5°C±3°C) 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag				
보관: 낭장조건 (5°C±3°C) 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				

제품 코드	HI14C0995	제조일	(비밀상) 회기자 체증감소 효과를 가지는 First in class 일노를 차음제 HD-2356 개발
제품	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 낭간(6개월))		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 9. HD-2356-L-14001 성상 변화 (Specification: White or Off-white powder)

보관조건	포장방법	3months	6months	9months	12months
장기보관 (25°C±2°C/60%RH±5%RH)	Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag	Off-white powder	Off-white powder		
	Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle	Off-white powder	Off-white powder		
가속조건 (40°C±2°C/75%RH±5%RH)	Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag	Off-white powder	Off-white powder		
	Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle	Off-white powder	Off-white powder		
냉장조건 (5°C±3°C)	Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag	Off-white powder	Off-white powder		
	Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle	Off-white powder	Off-white powder		

Period Condition	3months	6months	9months	12months
보관: 장기보관 (25°C±2°C/60%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag				
보관: 장기보관 (25°C±2°C/60%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				
보관: 가속조건 (40°C±2°C/75%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag				
보관: 가속조건 (40°C±2°C/75%RH±5%RH) 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				
보관: 낭간(6개월) 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag				
보관: 낭간(6개월) 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle				

과제 코드	HI14C0995	과제명	(비임상)학기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 냉장/6개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 10. HD-2356-L-14001 장기보존 (LT) 6개월 Related substance (포장방법: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag)

No.	Peak Name	장기보존 (LT) / 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag											
		Initial			3months			6months					
		RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)
1	unknown				7.822	0.31	0.01	7.787	0.31	0.01			
2	unknown				9.276	0.36	0.01	9.209	0.36	0.01			
3	unknown				9.975	0.39	0.01	9.967	0.39	0.01			
4	unknown	10.442	0.41	0.11	10.460	0.41	0.11	10.405	0.41	0.12			
5	unknown	12.683	0.49	0.09	12.662	0.50	0.10	12.613	0.50	0.11			
6	unknown	13.908	0.54	0.02	13.678	0.54	0.03	13.689	0.54	0.03			
7	unknown	15.111	0.59	0.06	15.187	0.60	0.05	15.160	0.60	0.07			
8	unknown				15.311	0.60	0.01	15.522	0.61	0.02			
9	unknown							15.958	0.63	0.00			
10	unknown	16.236	0.63	0.17	16.205	0.64	0.15	16.147	0.64	0.16			
11	unknown	18.903	0.73	0.02	18.567	0.73	0.02	18.698	0.74	0.02			
12	unknown	19.261	0.75	0.04	19.013	0.75	0.02	19.078	0.75	0.05			
13	unknown	19.517	0.76	0.12	19.422	0.76	0.07	19.335	0.76	0.10			
14	unknown	20.192	0.78	0.02	20.189	0.79	0.03	20.011	0.79	0.03			
15	unknown	20.519	0.80	0.01	20.195	0.79	0.01	20.120	0.79	0.01			
16	unknown	21.617	0.84	0.10	21.431	0.84	0.12	21.369	0.84	0.12			
17	unknown				21.653	0.85	0.01	21.573	0.85	0.01			
18	unknown				22.349	0.88	0.02	22.275	0.88	0.02			
19	unknown				22.355	0.88	0.02	22.282	0.88	0.02			
20	unknown							23.184	0.91	0.01			
21	unknown							23.277	0.92	0.01			
22	unknown	24.300	0.94	0.12	24.018	0.94	0.14	23.945	0.94	0.15			
23	unknown	24.817	0.96	0.04	24.260	0.95	0.02	24.164	0.95	0.03			
24	unknown	25.433	0.99	0.21	25.151	0.99	0.19	25.057	0.99	0.19			
25	HD-2356	25.758	1.00	98.80	25.465	1.00	98.83	25.385	1.00	98.63			
26	unknown	26.364	1.02	0.04	25.916	1.02	0.01	25.840	1.02	0.01			
27	unknown				28.002	1.10	0.01	27.853	1.10	0.00			
28	unknown	28.983	1.13	0.03	28.405	1.12	0.03	28.302	1.11	0.04			

1 2



과제 코드	HI14C0995	과제명	(비임상)학기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 냉장/6개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 11. HD-2356-L-14001 장기보존 (LT) 6 개월 Related substance (포장방법: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle)

No.	Peak Name	장기보존 (LT) / 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag											
		Initial			3months			6months					
		RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)
1	unknown				7.825	0.31	0.01	7.798	0.31	0.01			
2	unknown				9.296	0.36	0.01	9.196	0.36	0.02			
3	unknown				9.955	0.39	0.00	9.880	0.39	0.01			
4	unknown	10.442	0.41	0.11	10.465	0.41	0.11	10.407	0.41	0.12			
5	unknown	12.683	0.49	0.09	12.665	0.50	0.10	12.618	0.50	0.11			
6	unknown	13.908	0.54	0.02	13.689	0.54	0.03	13.695	0.54	0.03			
7	unknown							14.160	0.56	0.08			
8	unknown	15.111	0.59	0.06	15.191	0.60	0.05	15.444	0.61	0.02			
9	unknown				15.318	0.60	0.01	15.960	0.63	0.00			
10	unknown	16.236	0.63	0.17	16.211	0.64	0.15	16.151	0.64	0.16			
11	unknown	18.903	0.73	0.02	18.584	0.73	0.02	18.700	0.74	0.02			
12	unknown	19.261	0.75	0.04	19.006	0.75	0.03	19.078	0.75	0.06			
13	unknown	19.517	0.76	0.12	19.431	0.76	0.07	19.340	0.76	0.10			
14	unknown	20.192	0.78	0.02	20.140	0.79	0.03	20.020	0.79	0.03			
15	unknown	20.519	0.80	0.01	20.196	0.79	0.01	20.129	0.79	0.01			
16	unknown	21.617	0.84	0.10	21.438	0.84	0.12	21.373	0.84	0.13			
17	unknown				21.665	0.85	0.01	21.591	0.85	0.01			
18	unknown				22.353	0.88	0.02	22.285	0.88	0.02			
19	unknown				22.360	0.88	0.02	22.291	0.88	0.02			
20	unknown							22.998	0.91	0.01			
21	unknown	24.300	0.94	0.12	24.022	0.94	0.15	23.947	0.94	0.17			
22	unknown	24.817	0.96	0.04	24.276	0.95	0.02	24.162	0.95	0.03			
23	unknown	25.433	0.99	0.21	25.151	0.99	0.19	25.071	0.99	0.20			
24	HD-2356	25.758	1.00	98.80	25.471	1.00	98.79	25.387	1.00	98.57			
25	unknown	26.364	1.02	0.04	25.911	1.02	0.01	25.829	1.02	0.01			
26	unknown				27.973	1.10	0.01	27.851	1.10	0.01			
27	unknown	28.983	1.13	0.03	28.415	1.12	0.03	28.282	1.11	0.04			

1 3



과제 코드	HI14C0995	과제명	(비임상)획기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 금뇨병 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 기속, 냉장/6개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 12. HD-2356-L-14001 가속조건 (AC) 6 개월 Related substance (포장방법: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag)

No.	Peak Name	가속조건 (AC) / 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag											
		Initial			3months			6months					
		RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)
1	unknown				7.827	0.31	0.01	7.764	0.31	0.01			
2	unknown				9.304	0.37	0.02	9.391	0.37	0.02			
3	unknown				10.005	0.39	0.01	10.078	0.40	0.02			
4	unknown	10.442	0.41	0.11	10.478	0.41	0.13	10.407	0.41	0.14			
5	unknown	12.683	0.49	0.09	12.675	0.50	0.10	12.618	0.50	0.13			
6	unknown	13.908	0.54	0.02	13.682	0.54	0.03	13.700	0.54	0.03			
7	unknown	15.111	0.59	0.06	15.202	0.60	0.07	15.153	0.60	0.10			
8	unknown				15.335	0.60	0.01	15.391	0.61	0.03			
9	unknown							15.965	0.63	0.01			
10	unknown	16.236	0.63	0.17	16.222	0.64	0.15	16.151	0.64	0.17			
11	unknown							16.413	0.65	0.01			
12	unknown	18.903	0.73	0.02	18.620	0.73	0.02	18.818	0.74	0.02			
13	unknown	19.261	0.75	0.04	19.182	0.75	0.04	19.073	0.75	0.09			
14	unknown	19.517	0.76	0.12	19.442	0.76	0.08	19.338	0.76	0.11			
15	unknown	20.192	0.78	0.02	20.204	0.79	0.03	20.020	0.79	0.03			
16	unknown	20.519	0.80	0.01	20.211	0.79	0.02	20.245	0.80	0.03			
17	unknown							20.322	0.80	0.01			
18	unknown	21.817	0.84	0.10	21.449	0.84	0.14	21.373	0.84	0.17			
19	unknown				21.682	0.85	0.01	21.611	0.85	0.01			
20	unknown				22.371	0.88	0.03	22.253	0.88	0.04			
21	unknown				22.378	0.88	0.02	22.282	0.88	0.03			
22	unknown							23.076	0.91	0.01			
23	unknown							23.260	0.92	0.01			
24	unknown	24.300	0.94	0.12	24.031	0.94	0.18	23.945	0.94	0.22			
25	unknown	24.817	0.96	0.04	24.287	0.95	0.02	24.178	0.95	0.03			
26	unknown	25.433	0.99	0.21	25.164	0.99	0.19	25.071	0.99	0.19			
27	HD-2356	25.758	1.00	98.80	25.482	1.00	98.66	25.387	1.00	98.29			
28	unknown	26.364	1.02	0.04	25.935	1.02	0.01	25.829	1.02	0.01			
29	unknown							28.002	1.10	0.01	27.849	1.10	0.00
30	unknown	28.983	1.13	0.03	28.422	1.12	0.03	28.298	1.11	0.04			

과제 코드	HI14C0995	과제명	(비임상)획기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 금뇨병 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 기속, 냉장/6개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 13. HD-2356-L-14001 가속조건 (AC) 6 개월 Related substance (포장방법: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle)

No.	Peak Name	가속조건 (AC) / 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle											
		Initial			3months			6months					
		RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)
1	unknown				7.833	0.31	0.01	7.782	0.31	0.01			
2	unknown				9.300	0.36	0.02	9.391	0.37	0.03			
3	unknown				9.989	0.39	0.01	10.078	0.40	0.03			
4	unknown	10.442	0.41	0.11	10.478	0.41	0.13	10.407	0.41	0.16			
5	unknown	12.683	0.49	0.09	12.678	0.50	0.11	12.618	0.50	0.13			
6	unknown	13.908	0.54	0.02	13.689	0.54	0.03	13.707	0.54	0.04			
7	unknown	15.111	0.59	0.06	15.202	0.60	0.08	15.149	0.60	0.11			
8	unknown				15.331	0.60	0.01	15.391	0.61	0.03			
9	unknown							15.960	0.63	0.01			
10	unknown	16.236	0.63	0.17	16.227	0.64	0.15	16.151	0.64	0.17			
11	unknown							16.496	0.65	0.01			
12	unknown	18.903	0.73	0.02	18.589	0.73	0.02	18.820	0.74	0.02			
13	unknown	19.261	0.75	0.04	19.180	0.75	0.05	19.073	0.75	0.11			
14	unknown	19.517	0.76	0.12	19.447	0.76	0.08	19.335	0.76	0.11			
15	unknown	20.192	0.78	0.02	20.198	0.79	0.03	20.022	0.79	0.03			
16	unknown	20.519	0.80	0.01	20.205	0.79	0.02	20.242	0.80	0.03			
17	unknown							20.322	0.80	0.02			
18	unknown	21.617	0.84	0.10	21.449	0.84	0.15	21.373	0.84	0.18			
19	unknown				21.696	0.85	0.01	21.609	0.85	0.01			
20	unknown				22.367	0.88	0.03	22.224	0.88	0.04			
21	unknown				22.373	0.88	0.02	22.286	0.88	0.03			
22	unknown							23.002	0.91	0.02			
23	unknown	24.300	0.94	0.12	24.031	0.94	0.20	23.945	0.94	0.24			
24	unknown	24.817	0.96	0.04	24.269	0.95	0.02	24.169	0.95	0.03			
25	unknown	25.433	0.99	0.21	25.165	0.99	0.19	25.071	0.99	0.20			
26	HD-2356	25.758	1.00	98.80	25.485	1.00	98.58	25.389	1.00	98.16			
27	unknown	26.364	1.02	0.04	25.924	1.02	0.01	25.889	1.02	0.01			
28	unknown				27.998	1.10	0.01	27.864	1.10	0.01			
29	unknown	28.983	1.13	0.03	28.416	1.12	0.03	28.298	1.11	0.04			

과제 코드	HI14C0995	과제명	(비임상)획기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 냉장/6개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 14. HD-2356-L-14001 냉장조건 (C) 6 개월 Related substance (포장방법: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag)

No.	Peak Name	냉장조건 (C) / 포장: Double PE bag + Silicagel + Aluminum bag								
		Initial			3months			6months		
		RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)
1	unknown				7.849	0.31	0.01	7.800	0.31	0.01
2	unknown				9.318	0.37	0.01	9.247	0.36	0.01
3	unknown				9.989	0.39	0.00	9.918	0.39	0.01
4	unknown	10.442	0.41	0.11	10.480	0.41	0.11	10.422	0.41	0.10
5	unknown	12.683	0.49	0.09	12.678	0.50	0.10	12.635	0.50	0.11
6	unknown	13.908	0.54	0.02	13.698	0.54	0.02	13.591	0.54	0.02
7	unknown	15.111	0.59	0.06	15.202	0.60	0.04	15.171	0.60	0.06
8	unknown				15.325	0.60	0.01	15.533	0.61	0.01
9	unknown							15.982	0.63	0.01
10	unknown	16.236	0.63	0.17	16.224	0.64	0.15	16.171	0.64	0.16
11	unknown	18.903	0.73	0.02	18.593	0.73	0.02	18.842	0.74	0.02
12	unknown	19.261	0.75	0.04	18.962	0.74	0.02	19.115	0.75	0.04
13	unknown	19.517	0.76	0.12	19.445	0.76	0.07	19.362	0.76	0.09
14	unknown	20.192	0.78	0.02	20.209	0.79	0.03	20.040	0.79	0.03
15	unknown	20.519	0.80	0.01	20.216	0.79	0.01	20.147	0.79	0.01
16	unknown	21.617	0.84	0.10	21.444	0.84	0.11	21.389	0.84	0.11
17	unknown				21.687	0.85	0.01	21.620	0.85	0.01
18	unknown				22.365	0.88	0.02	22.300	0.88	0.01
19	unknown				22.371	0.88	0.02	22.307	0.88	0.02
20	unknown	24.300	0.94	0.12	24.029	0.94	0.14	23.967	0.94	0.12
21	unknown	24.817	0.96	0.04	24.276	0.95	0.02	24.182	0.95	0.03
22	unknown	25.433	0.99	0.21	25.160	0.99	0.19	25.087	0.99	0.19
23	HD-2356	25.758	1.00	98.80	25.480	1.00	98.84	25.402	1.00	98.77
24	unknown	26.364	1.02	0.04	25.925	1.02	0.01	25.856	1.02	0.01
25	unknown				27.984	1.10	0.01	27.894	1.10	0.01
26	unknown	28.983	1.13	0.03	28.429	1.12	0.03	28.320	1.11	0.04

1.6



과제 코드	HI14C0995	과제명	(비임상)획기적 체중감소 효과를 가지는 First in class 당뇨병 치료제 HD-2356 개발
제목	HD-2356 안정성 시험 결과 보고서 (장기, 가속, 냉장/6개월)		
문서번호	HD-A-150501 (ver1.0)	작성일자	2015년 09월 15일
연구기간	2015.01.16 ~ 2016.01.16	작성자	김은영

Table 15. HD-2356-L-14001 냉장조건 (C) 6 개월 Related substance (포장방법: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle)

No.	Peak Name	냉장조건 (C) / 포장: Double PE bag + Silicagel + Amber HDPE bottle								
		Initial			3months			6months		
		RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)	RT (n=3)	RRT (n=3)	Area% (n=3)
1	unknown				7.820	0.31	0.01	7.807	0.31	0.01
2	unknown				9.278	0.36	0.01	9.222	0.36	0.01
3	unknown				9.966	0.39	0.00	9.920	0.39	0.01
4	unknown	10.442	0.41	0.11	10.451	0.41	0.11	10.422	0.41	0.11
5	unknown	12.683	0.49	0.09	12.656	0.50	0.10	12.629	0.50	0.11
6	unknown	13.908	0.54	0.02	13.693	0.54	0.02	13.720	0.54	0.03
7	unknown	15.111	0.59	0.06	15.176	0.60	0.05	15.162	0.60	0.07
8	unknown				15.302	0.60	0.01	15.527	0.61	0.02
9	unknown							15.964	0.63	0.00
10	unknown	16.236	0.63	0.17	16.200	0.64	0.15	16.162	0.64	0.16
11	unknown	18.903	0.73	0.02	18.580	0.73	0.02	18.824	0.74	0.02
12	unknown	19.261	0.75	0.04	18.931	0.74	0.03	19.098	0.75	0.05
13	unknown	19.517	0.76	0.12	19.425	0.76	0.07	19.353	0.76	0.10
14	unknown	20.192	0.78	0.02	20.189	0.79	0.03	20.031	0.79	0.03
15	unknown	20.519	0.80	0.01	20.196	0.79	0.01	20.138	0.79	0.01
16	unknown	21.617	0.84	0.10	21.429	0.84	0.11	21.378	0.84	0.12
17	unknown				21.667	0.85	0.01	21.616	0.85	0.01
18	unknown				22.340	0.88	0.02	22.289	0.88	0.02
19	unknown				22.347	0.88	0.02	22.295	0.88	0.02
20	unknown	24.300	0.94	0.12	24.013	0.94	0.15	23.951	0.94	0.14
21	unknown	24.817	0.96	0.04	24.255	0.95	0.02	24.171	0.95	0.03
22	unknown	25.433	0.99	0.21	25.147	0.99	0.19	25.075	0.99	0.20
23	HD-2356	25.758	1.00	98.80	25.460	1.00	98.81	25.391	1.00	98.68
24	unknown	26.364	1.02	0.04	25.913	1.02	0.01	25.853	1.02	0.01
25	unknown				27.971	1.10	0.01	27.873	1.10	0.01
26	unknown	28.983	1.13	0.03	28.395	1.12	0.03	28.318	1.12	0.04

1.7



3.3.6. HD-2356 PK 연구

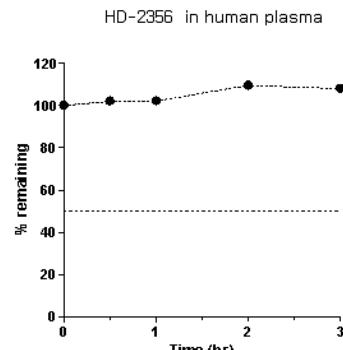
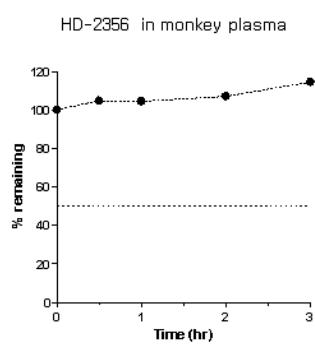
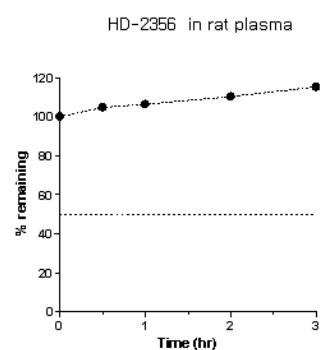
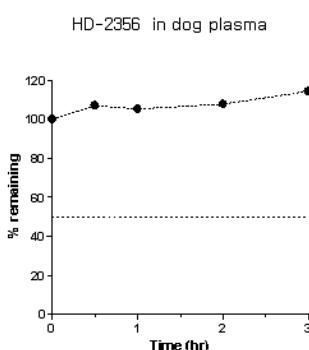
3.3.6.1. *in vitro* ADME 연구 진행 (Report Number: BEC-PK-2015-007)

HD-2356의 Plasma stability는 모든 종에서 안정한 약물로 판단됨.

Stability of HD-2356 in rat, dog, monkey and human plasma.

Compound	Plasma	% remaining at 180 min		$t_{1/2}$ [min]
		[mean]	[SD]	
HD-2356	Human	108.70	5.33	>180
	Monkey	114.46	2.21	>180
	Dog	114.33	1.18	>180
	Rat	115.31	0.10	>180
Procaine*	Human	0.01	0.00	
	Monkey	0.04	0.01	
	Dog	1.60	0.11	
	Rat	2.05	0.39	

*positive control



3.3.6.2. Protein binding of HD-2356 in rat, dog, monkey and human plasma
 (Report Number: BEC-PK-2015-006)

HD-2356의 Protein binding은 모든 종에서 99%이상을 나타냄

Protein binding of HD-2356 in various species plasma

Species	Test conc.	F_{ub} (%)*	F_b (%)**	Recovery (%)
	(μ M)			
Human	5	0.20 ± 0.20	99.80 ± 0.08	79.26 ± 2.41
Monkey	5	0.32 ± 0.21	99.68 ± 0.21	88.69 ± 1.82
Rat	5	0.27 ± 0.20	99.73 ± 0.20	85.58 ± 3.07
Dog	5	0.18 ± 0.03	99.82 ± 0.03	99.96 ± 5.25

Data are mean±SD (n=3). *fraction unbound, **fraction bound to plasma protein

3.3.6.3. Permeability of HD-2356 in Parallel Artificial Membrane
 (Report Number: BEC-PK-2015-005)

HD-2356의 Pemeability는 비교적 낮은 것으로 판단됨

The values of permeability coefficients (P_e) and mass retention (R) obtained in PAMPA test

Compound	Test conc. (mM)	P_e (nm/s)	*R (%)	** Comments
Metoprolol	200	17.59 ± 1.24	20.46 ± 0.93	Medium
Ranitidine	200	5.77 ± 1.51	1.09 ± 0.59	Low
Verapamil	200	132.63 ± 13.21	6.26 ± 1.23	High
Carbamazepine	200	142.28 ± 13.21	1.50 ± 0.28	High
HD-2356	200	7.29 ± 1.75	14.03 ± 2.39	Low

Assays were conducted in triplicate.

*R: mass retention

**Permeability : <15 nm/s (low permeability), >15 nm/s (high permeability)

3.3.6.4. Metabolic stability of HD-2356 in rat, dog, monkey and human liver microsomes(Phase II, Report Number:BEC-PK-2015-008)

Mircrosomal stability는 Phase-II glucuronidation 반응에 대해 Human>Rat>Dog>monkey 순으로 안정성에 종차를 보이고 있으며, Human, rat 에서는 UGT에 의한 대사가 상당히 안정한 것으로 보임

Metabolic stability of HD-2356 in rat, dog, monkey and human liver microsomes

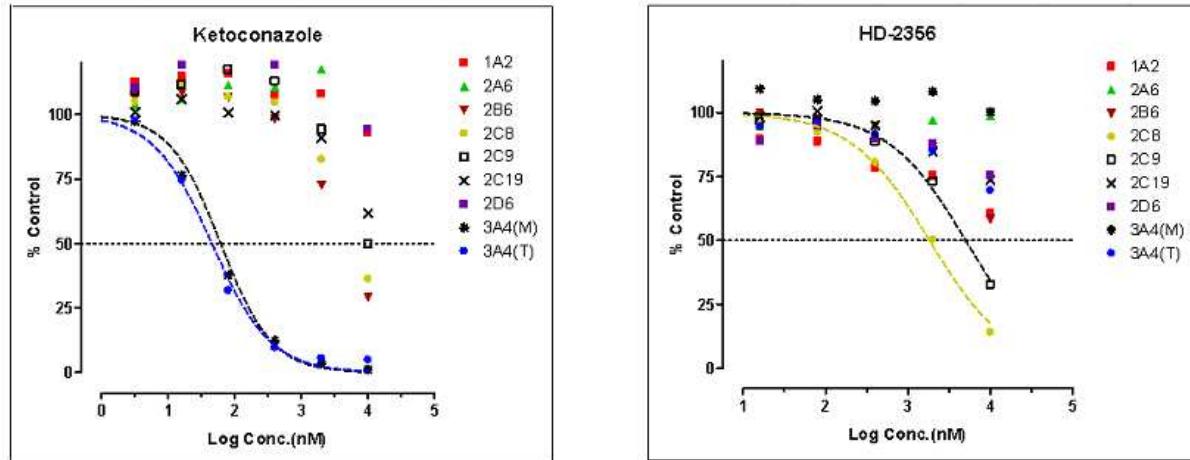
Reaction	Species	Cofactor	% remaining after 30 min incubation		k [min ⁻¹]	t _{1/2} [min]	Microsomal CL _{int} [uL/min/mg protein]
			HD-2356	4-MUF*			
Phase II	Human	+UDPGA	96.11 ± 0.73	0.63 ± 0.36		> 60	
		-UDPGA	105.19 ± 0.65	87.14 ± 0.02			
	Monkey	+UDPGA	45.59 ± 1.31	0.34 ± 0.13	0.0242	28.61	48.44
		-UDPGA	95.56 ± 4.07	93.06 ± 3.07			
	Dog	+UDPGA	56.51 ± 0.81	0.09 ± 0.12	0.0192	36.02	38.48
		-UDPGA	96.67 ± 1.88	94.46 ± 0.23			
	Rat	+UDPGA	77.19 ± 1.30	0.07 ± 0.05		>60	
		-UDPGA	96.73 ± 1.26	96.52 ± 0.39			

*positive control

3.3.6.5. Inhibition of CYP450 by HD-2356 in human liver microsomes

Inhibition of CYP450 by HD-2356 in human liver microsomes

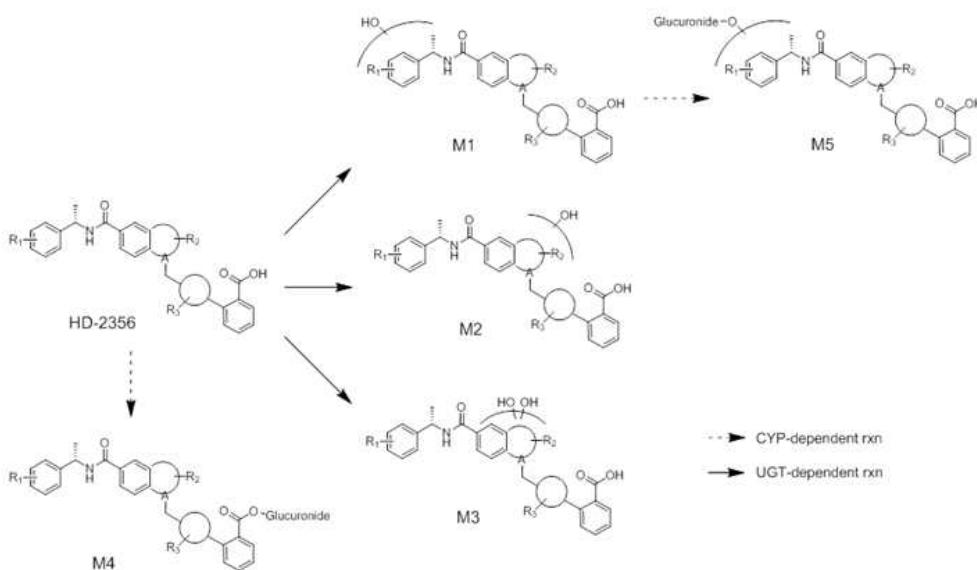
CYP450	Ketoconazole		HD-2356	
	IC50 (μM)	Hill Slope	IC50 (μM)	Hill Slope
1A2	>10	-	>10	-
2A6	>10	-	>10	-
2B6	4.72	1.26	>10	-
2C8	6.62	1.43	1.83	1.23
2C9	9.96	1.93	5.01	1.48
2C19	>10	-	>10	-
2D6	>10	-	>10	-
3A4 (M)	0.515	1.03	>10	-
3A4 (T)	0.427	1.11	>10	-



3.3.6.6. HD-2356 대사체 연구(Report Number 2015-06-001)

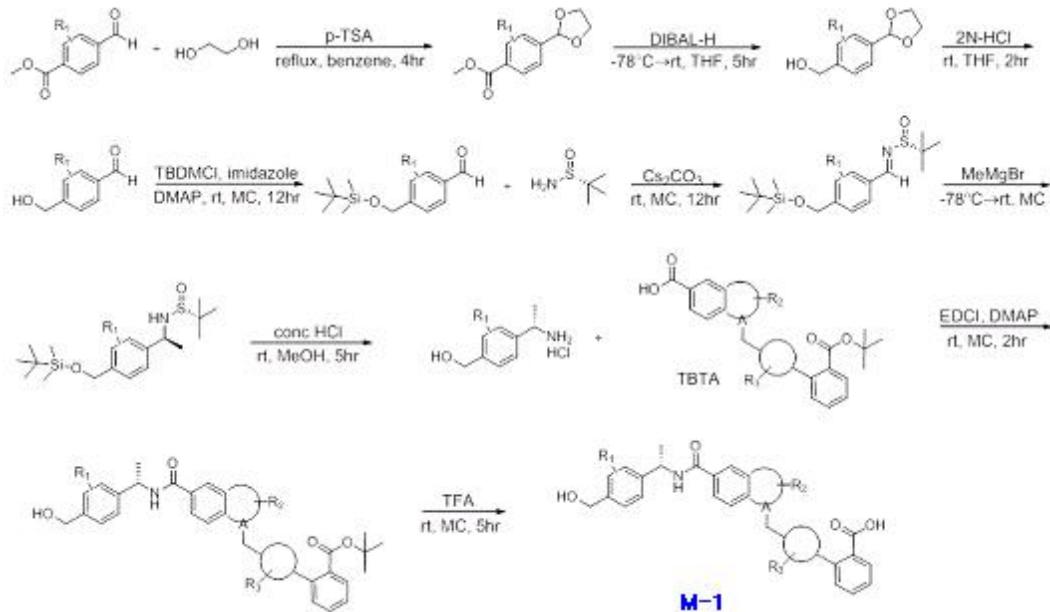
In vitro and *in vivo* metabolism study(in mouse)에서 2종의 mono-oxidation 대사체 (M1,M2), 1종의 dioxidation 대사체 (M3), 1종의 glucuronidation 대사체 (M4) 및 1종의 hydroxyglucuronidation 대사체 (M5)로 총 5종의 HD-2356 대사체를 검출하였다. HD-2356의 주요한 대사체로 예측된 M1외에도 mouse의 metabolic identification 연구를 통해 확인된 대사체인 M-2,3,4의 합성 연구 진행하였다.

Proposed the in-vitro metabolism pathway of HD-2356 in mouse liver



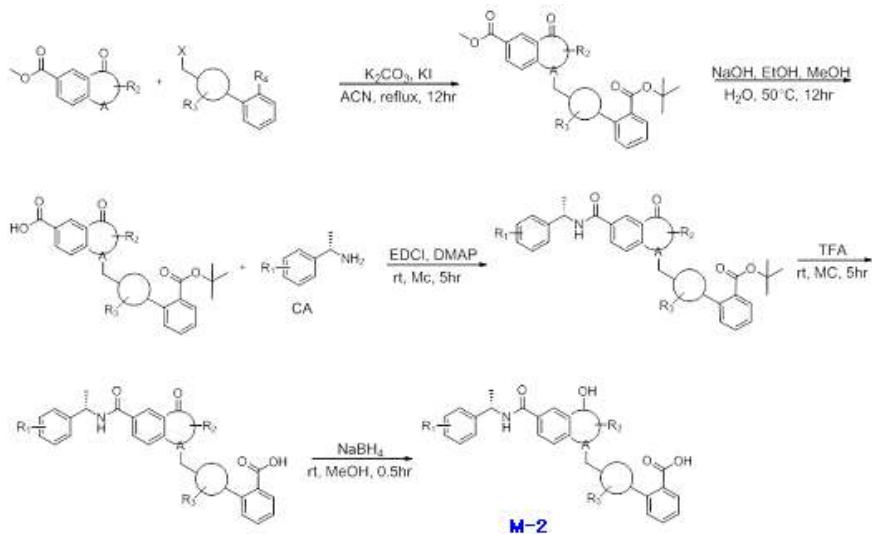
○ M-1의 합성연구

- 9단계 합성과정을 통해 합성
- PK 및 대사체 연구용 샘플 250mg 합성완료
- *in vitro* assay 진행 결과 active 화합물로 판단됨



○ M-2의 합성연구

- 9단계 합성과정을 통해 합성
- PK 및 대사체 연구용 샘플 500mg 합성(racemic)
- Prep LC를 사용하여 M-1(S,S), M-1(S,R) 분리함
- *in vitro* assay 진행 결과 active 화합물로 판단됨

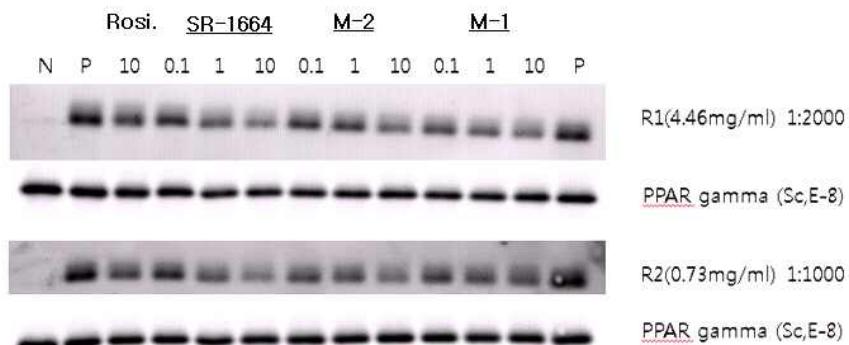


○ M-1, M-2의 in vitro assay 결과

: 연구 결과 : in vitro assay 결과 HD-2356의 mouse에서 주 대사체인 M-1,M-2가 active한 compound임을 확인함.

compound	PPARr competitive binding Assay (1uM, %)	PPARr transcriptional Activity assay (EC ₅₀ , nM)
Rosiglitazone	96%	59 nM
HD-2356	82%	No activity
M-1	35%	No activity
M-2	53%	No activity

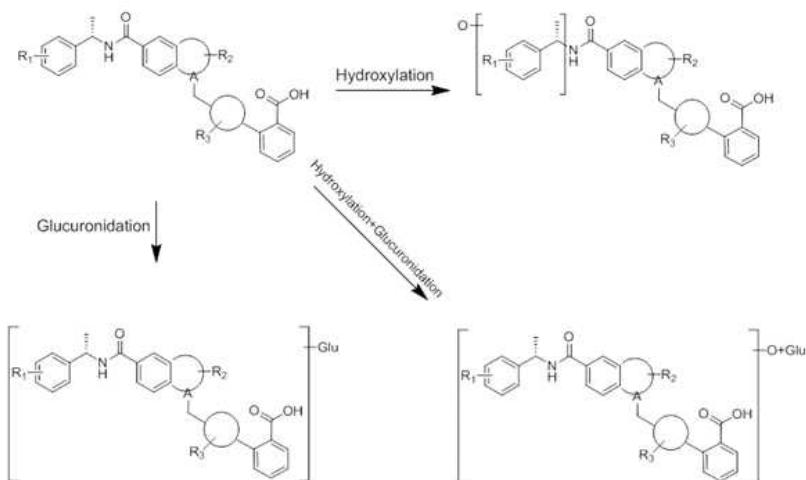
Cdk5 phosphorylation inhibition assay 결과



3.3.6.7. Study Title: Metabolism study for the drug candidate HD-2356

(Rat,dog.monkey, human, Report Number: CNU-MI-2015-001)

Proposed metabolic pathway of hd-2357 in vitro



연구결과 rat/dog/monkey/human liver microsomes에서 보이는 major 대사체는 mouse에서와 같이 oxidative metabolites M1과 glucuronide conjugated metabolite로 확인되었으며, 본 실험은 oxidation과 conjugation이 동시에 이뤄 질 수 있는 시스템에서 실험이 진행되어 M1의 glucuronide conjugated metabolite도 검출됨을 알 수 있었다. 이전에 진행된 M1의 glucuronide conjugated metabolite는 mouse *in vitro*에서도 detection된 대사체로 실제 *in vivo*(mouse)에서 검출이 안 되었으며, 추가적인 rat/dog의 *in vivo* 실험을 통해 확인을 진행할 예정이다.

그리고 CYP reaction phenotyping 실험 결과를 보면 human에서의 HD-2356의 대사는 CYP3A4/5와 -2C19가 major로 작용하며, HD-2356에서 oxidative metabolite M1으로의 대사과정은 CYP1A2, -2A6, -2E1을 제외하고 CYP2C19 > CYP3A4> CYP3A5> CYP2C9> 그 외, 순으로 영향을 받아 생성됨을 확인하였다.

3.3.6.8. HD-2356 화합물에 대한 설치류 (MOUSE) 에서의 Pharmacokinetics (Report number HD-PK-01)

HD-2356은 10mg/kg 투여 후 Cmax가 1150 ng/ml, AUC(AUClast)가 3319 ng.hr/ml로 exposure가 비교적 낮았으며, 25mg/kg 투여 후 Cmax가 7619 ng/ml, AUC(AUClast)가 17472 ng.hr/ml, 50mg/kg 투여 후 Cmax가 21840 ng/ml, AUC(AUClast)가 29337 ng.hr/ml로 나타났다.

< HD-2356 화합물에 대한 ICR mouse에서의 PK parameter >

Parameter	Unit	IV (n=3)				PO (n=3 or 4)			
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Dose	mg/kg	1		10		25		50	
t _{1/2}	h	5.5	0.73	2.6	0.36	2.7	0.22	4.3	1.8
t _{max}	h	N.A		0.4	0.14	1.8	0.5	0.5	0
C _{max}	ng/mL	N.A		1150.2	1444.8	7619.0	12532.5	21840.0	19204.4
AUC _{last}	ng.h/mL	6366.5	3704.3	3319.4	3911.5	17472.0	22190.2	29337.1	12895.2
AUC _{inf}	ng.h/mL	6431.3	3699.4	3343.2	3896.3	17489.6	22198.0	29506.0	12987.4
CL	L/h/kg	0.21	0.145	N.A		N.A		N.A	
V _z	L/kg	1.74	1.352	N.A		N.A		N.A	
V _{ss}	L/kg	0.4	0.318	N.A		N.A		N.A	
MRT	h	1.9	1.57	3.1	0.08	3	0.95	2.6	1.82
F	%			5.2		10.9		9.2	

*NC: Not calculated

HD-2356은 10, 25, 50 mg/kg의 경구 투여 후 낮은 exposure를 보이고 반감기는 moderate 이상을 가진 약물이다. 이에 따라 iv대비 BA도 5~10%로 낮은 BA를 보였다.

3.3.6.9. HD-2356 화합물에 대한 설치류 (Rat) 에서의 Pharmacokinetics

(Report number HD-PK-02)

HD-2356은 10mg/kg 투여 후 Cmax가 320 ± 331 ng/ml, AUC(AUClast)가 1416 ± 739 ng.hr/ml로 exposure가 비교적 낮았지만, T_{1/2}는 약 6시간 정도로 짧은 편은 아니었다. 그리고 Tmax는 0.83 h로 비교적 아주 빠르게 흡수 되는 약물은 아니었다. 고농도인 100 ~ 1000 mg/kg 투여군에서는 200 mg/kg 이상의 농도에서 saturation이 일어나는 현상이 보여 24시간까지 elimination phase가 잡히지 않아 정확한 PK parameter를 구하진 못하였으나 100, 200, 1000 mg/kg에서 각각 Cmax는 6132 ± 1098 , 6646 ± 4632 , 14389 ± 4769 ng/ml, AUC(AUClast)는 55261 ± 6117 , 96716 ± 64591 , 249052 ± 76704 ng.hr/ml으로 dose dependent하게 전반적으로 exposure(AUC)는 증가하였지만 linear하게 증가 되지는 않았다. 1000 mg/kg 투여군에서 투여 후 24시간까지 흡수 구간이 끝나지 않는 경향을 보여 T_{1/2}를 구하지 못하였지만 100, 200 mg/kg에서 2 ~ 6시간 정도의 T_{1/2}로 10 mg/kg 투여군과 비슷하였다.

< HD-2356 화합물에 대한 Rat에서의 PK parameter >

PK parameter	HD-2356											
	PO, 10 mg/kg			PO, 100 mg/kg			PO, 200 mg/kg			PO, 1000 mg/kg		
	mean n	SD	N	mean	SD	N	mean	SD	N	mean	SD	N
Dose (mg/kg)	10		3	100		3	200		3	1000		3
t _{max} (hr)	0.83	0.14	3	3.33	1.15	3	5.33	2.31	3	24.00	0.00	3
C _{max} (ng/ml)	320	331	3	6132	1098	3	6646	4632	3	14389	4769	3
AUC _{last} (ng.hr/ml)	1416	739	3	55261	6117	3	96716	64591	3	249052	76704	3
AUC _{inf} (ng.hr/ml)	1487	770	3	55432	6061	3	149042	7975	2	NC		
t _{1/2} (hr)	5.69	1.13	3	2	0.31	3	6.29	4.82	2	NC		
MRT _{inf} (hr)	6.96	1.29	3	6.02	0.28	3	10.76	5.36	2	NC		

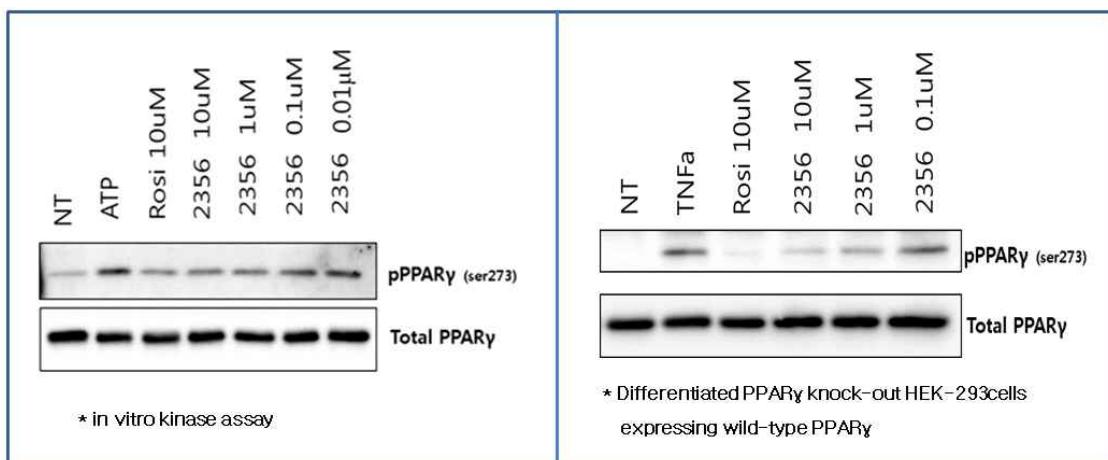
*NC: Not calculated

HD-2356은 10mg/kg 투여 후 Cmax가 320 ± 331 ng/ml, AUC(AUClast)가 1416 ± 739 ng.hr/ml로 exposure가 비교적 낮았지만, T_{1/2}는 약 6시간 정도로 짧은 편은 아니었다. 그리고 Tmax는 0.83 h로 비교적 아주 빠르게 흡수 되는 약물은 아니었다. 고농도인 100 ~ 1000 mg/kg 투여군에서는 200 mg/kg 이상의 농도에서 saturation이 일어나는 현상이 보여 (Figure 1) 24시간까지 elimination phase가 잡히지 않아 정확한 PK parameter를 구하진 못하였으나 100, 200, 1000 mg/kg에서 각각 Cmax는 6132 ± 1098 , 6646 ± 4632 , 14389 ± 4769 ng/ml, AUC(AUClast)는 55261 ± 6117 , 96716 ± 64591 , 249052 ± 76704 ng.hr/ml으로 dose dependent하게 전반적으로 exposure(AUC)는 증가하였지만 linear하게 증가 되지는 않았다. 1000 mg/kg 투여군에서 투여 후 24시간까지 흡수 구간이 끝나지 않는 경향을 보여 T_{1/2}를 구하지 못하였지만 100, 200 mg/kg에서 2 ~ 6시간 정도의 T_{1/2}로 10 mg/kg 투여군과 비슷하였다.

3.3.7. 약효 및 작용기전 연구

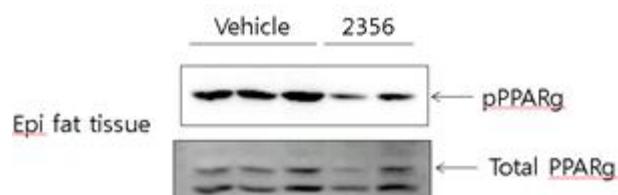
3.3.7.1. *in vitro* (Enzyme, HEk293 cell) HD-2356의 CDK5-mediated PPAR γ 의 serine²⁷³ phosphorylation의 억제 여부 확인 (Report Number: 2014년 6월 과제 제안서, Unist-01)

작용기전에 근거한 1차 Screening 방법으로 실험한 것으로 PPAR γ expression vector를 transiently transfection 시킨 HEK-293 cell에서 PPAR γ 의 Ser²⁷³의 인산화 억제 여부를 측정하였다. 자체 연구결과 확보된 결과에서 HD-2356 화합물에 의해 PPAR γ 의 Ser²⁷³의 인산화 억제가 용량 의존적으로 잘 발생하는 것을 확인하였다.

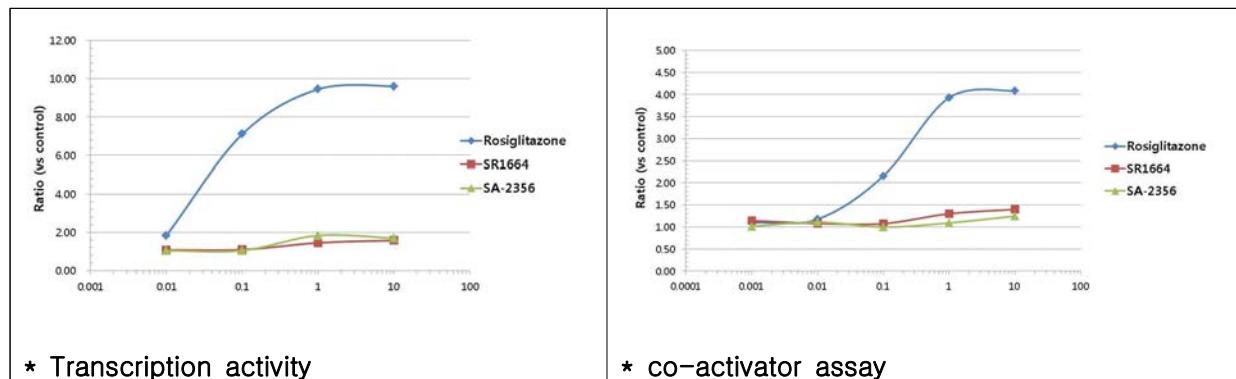


3.3.7.2. *ex-vivo*에서의 CDK5-mediated PPAR γ 의 serine²⁷³ phosphorylation의 억제 여부 확인 (Report Number Unist-01, 2014년 6월 과제 제안서 참조)

6주령 수컷 C57BL/6J에 고지방식을 10주 간 먹인 후, 화합물을 하루에 한 번 5일간 경구 투여를 실시한다. 그 후, 복부 내장지방을 채취하여 단백질을 추출하여 western blotting을 통해 지방조직에서의 PPAR γ 인산화를 검토하였다. 그 결과, 10 mg/kg HD2356 투여군에서 phosphorylation이 감소하였다. 따라서 HD2356은 고지방식으로 유도되는 PPAR γ 의 phosphorylation을 억제하는 것으로 사료된다.



3.3.7.3. HD-2356의 transcriptional activity 유발여부 실험(2014년 과제제안서 참조)

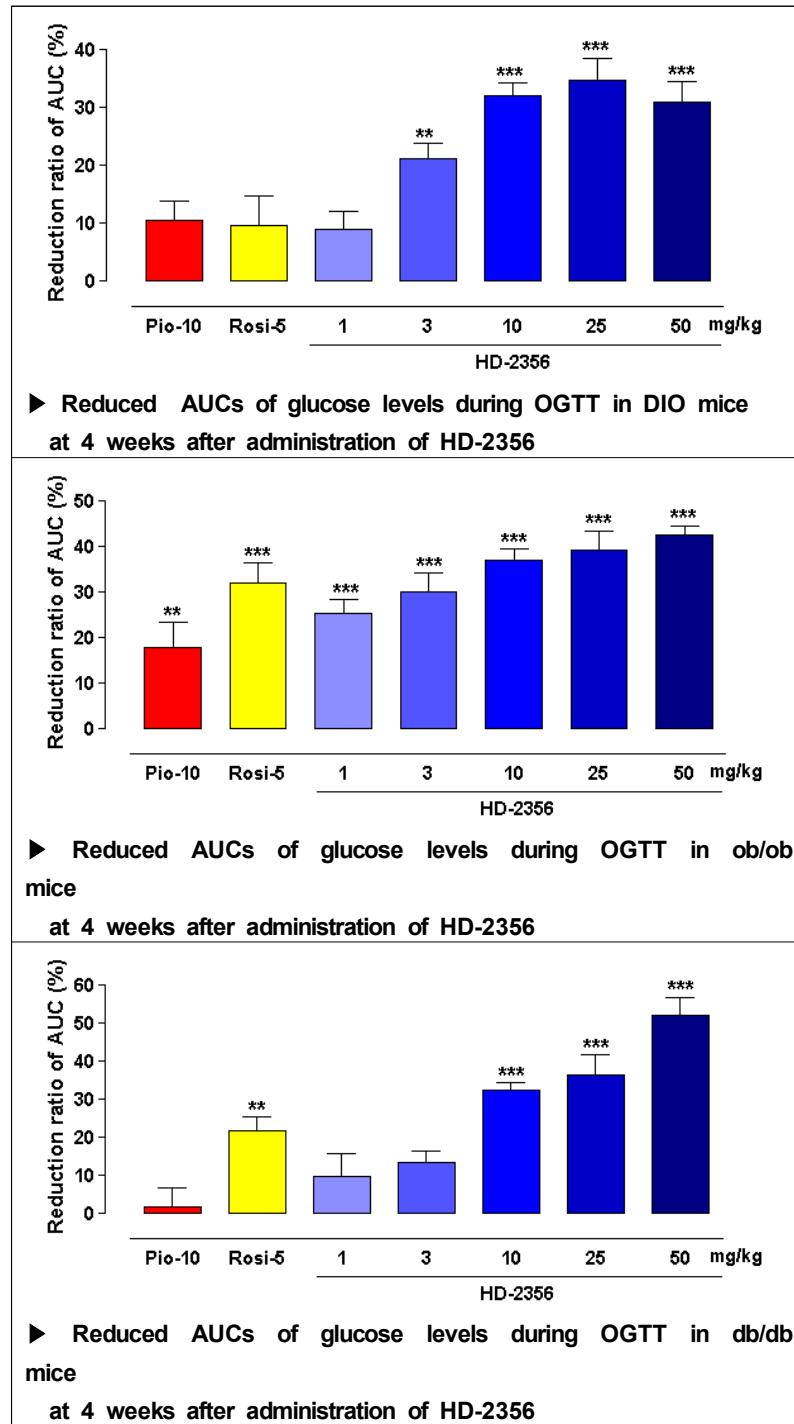


최근 연구들에 의하면, Glitazone계열 약물들의 체중 증가 등의 부작용들은 약물에 의한 transcription activity와 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Chandalia A, 2009., Choi JH. 2010.). HD-2356 화합물 또한 transcription activity의 증가 여부를 확인 한 실험에서 rosiglitazone과는 달리 transcription activity가 없는 것으로 확인 되었으며, 추가 실험인 co-activator assay에서도 rosiglitazone 과는 달리 transcription activity가 없는 것으로 확인 되었다.

3.3.7.4. HD-2356의 OGTT in vivo 효과(2014년 과제제안서 참조)

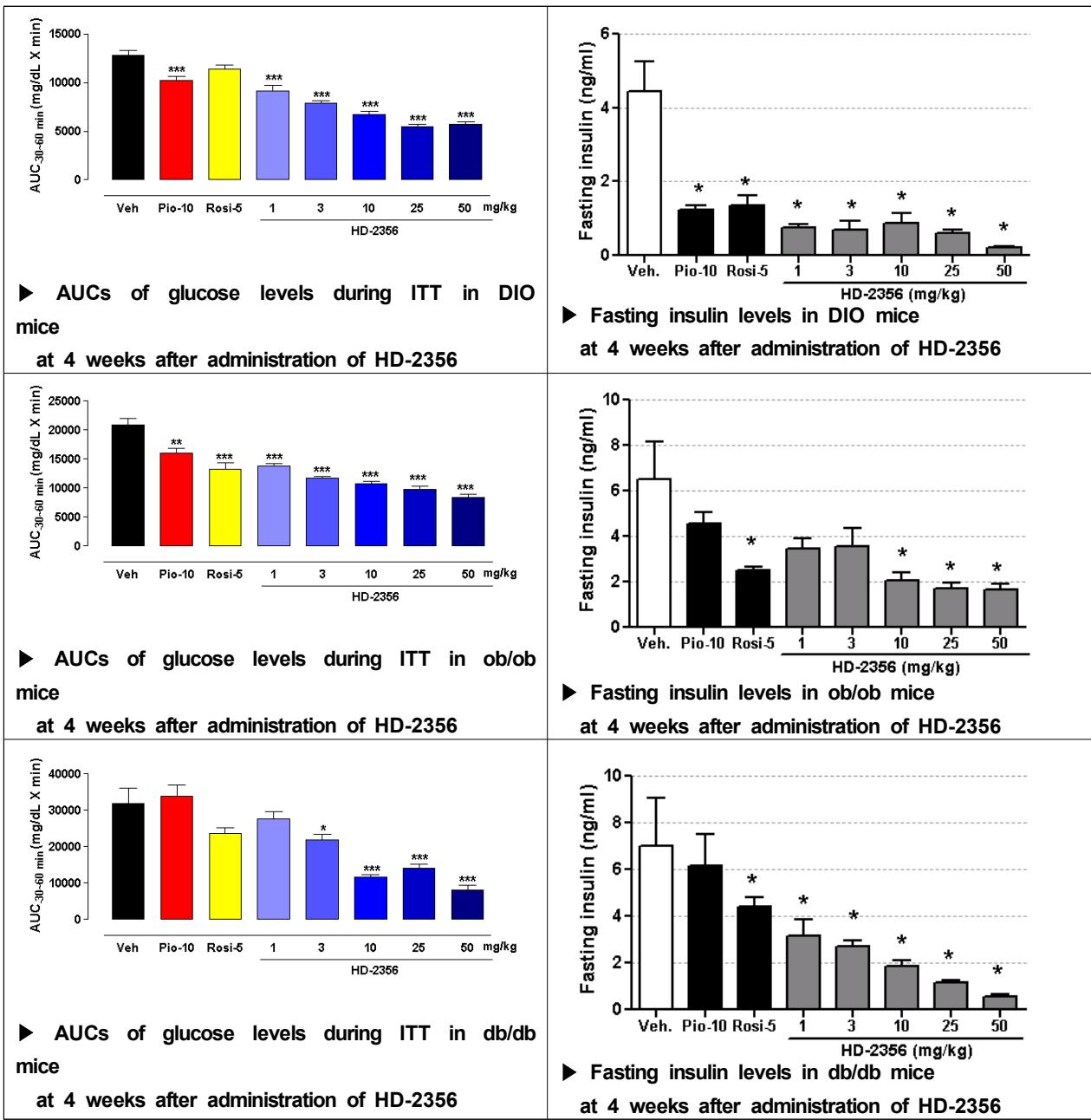
아래 자료에서 보다시피 다양한 mouse model에서 4주 반복 투여 후 OGTT(oral glucose tolerance test) 결과 우수한 혈당강하 효과를 가진다.

비만 모델 및 제 2형 당뇨 모델로 알려진 고지방식이 유도 비만 마우스 (DIO mice)와 ob/ob mice, db/db mice에 HD-2356의 4주간 반복 투여 후 OGTT를 실시한 결과 약 3 mg/kg의 투여 용량에서 유의한 혈당강하 효과를 확인 할 수 있었으며, 투여 용량 전체적으로 고른 용량 의존도의 경향을 보였다. 또한, 동일 용량의 glitazone 계열의 약물들에 비해 월등한 혈당 강하 효과를 보였다.



3.3.7.5. HD-2356의 ITT in vivo 효과(2014년 과제제안서 참조)

다양한 animal model에서 반복투여 후 수행한 ITT(insulin tolerance test)와 fasting insulin의 측정 결과에서 HD-2356의 혈당강하 효과가 인슐린 저항성 개선에 근거 함을 알 수 있다.



3.3.7.6. HD-2356 은 vivo 약효 (OGTT, ITT, fasting insulin, body weight, 1차 년도 결과 보고서)

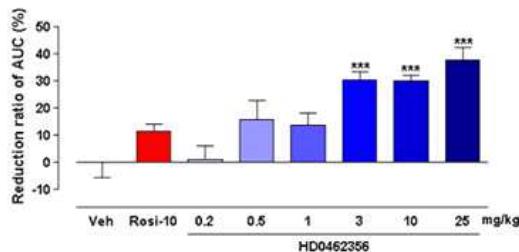
HD-2356 공정 개선 후 COA 발행된 원료로 실험한 4주 반복투여 결과에서 2014년 제안당시 약효가 재현되고 있음을 확인할 수 있다.

초기기 약효평가에서 혈당강하 및 인슐린 저항성 개선효과 농도가 1mpk에서 확인이 되어 이 농도보다 낮은 0.2 / 0.5mpk 용량을 추가하여 COA (Batch. No : HD2356-L-15001) 가 발행된 원료로 DIO 병태모델에서 4주 반복투여를 진행하였다.

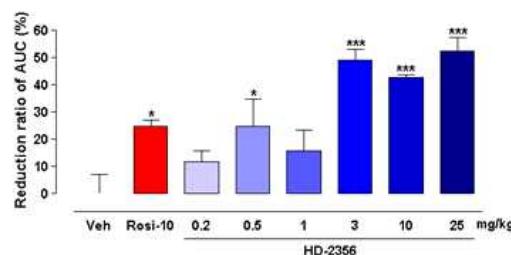
DIO mice 4주 반복 투여 실험 protocol

화합물	투여 용량(mg/kg)	용매	투여경로
Lean (n=4)	0		
Vehicle (n=6)	0		
Rosiglitazone (n=6)	10		
HD0462356 (n=6)	0.2 (n=6) 0.5 (n=6) 1(n=6) 3 (n=6) 10 (n=5) 25 (n=3)	0.05% Tween 80 in saline	p.o. q.d.

※ HD0462356 화합물은 분석결과에서 권장한 대로 4~5일에 한번 조제하여 차광 후 냉장보관하고 투여 시에만 잠시 꺼내어 사용함.

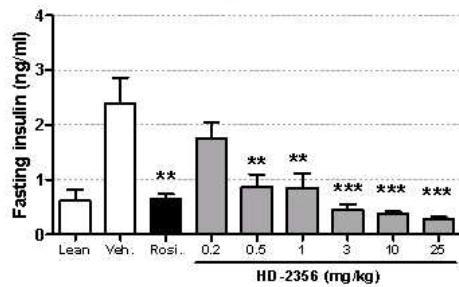
oGTT - day 28

*** : $p<0.001$, compared with the day 28 vehicle group

ITT - day 26

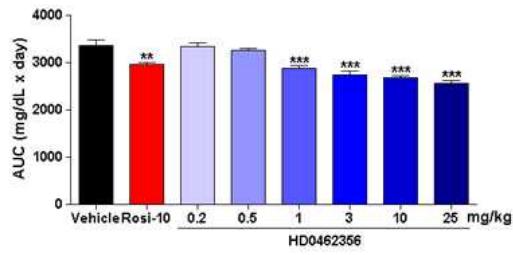
* : $p<0.05$, compared with the day 26 vehicle group

*** : $p<0.001$, compared with the day 26 vehicle group

Fasting insulin

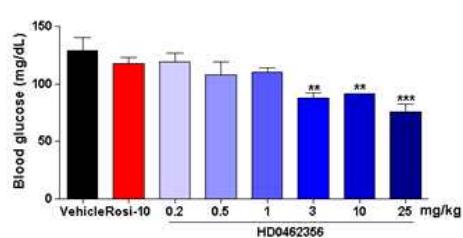
** : $p<0.01$, compared with the vehicle group

*** : $p<0.001$, compared with the vehicle group

NFG-AUC

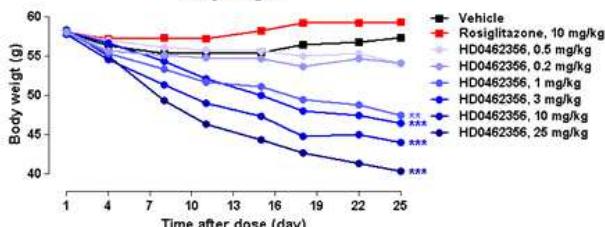
** : $p<0.01$, compared with the vehicle group

*** : $p<0.001$, compared with the vehicle group

Fasting glucose

** : $p<0.01$, compared with the day 28 vehicle group

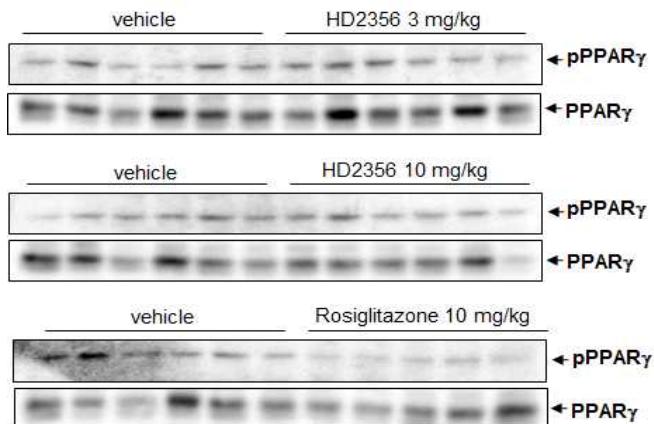
*** : $p<0.001$, compared with the day 28 vehicle group

Body weight

약효 평가 결과 1mpk 이상의 농도에서 유의적인 혈당강하, 인슐린 저항성 개선 및 체중 감소 효과를 확인 할 수 있었다. 추가적으로는 지방조직에서 PPAR γ 인산화 억제 효과 검증과, 지방조직에서 PPAR γ 인산화에 의해 변화되는 유전자 발현에 대한 화합물의 영향, 더불어 에너지 대사 관련 지표인 AMPK 등의 지표, angiogenesis 지표, BAT 관련 지표등도 확인 하였다.

3.3.7.7. HD-2356 *ex-vivo* 재현성 실험(CDK5-mediated PPAR γ 의 serine²⁷³ phosphorylation의 억제효과, Report Number Unist-02, 2015년 4-5월 수행)

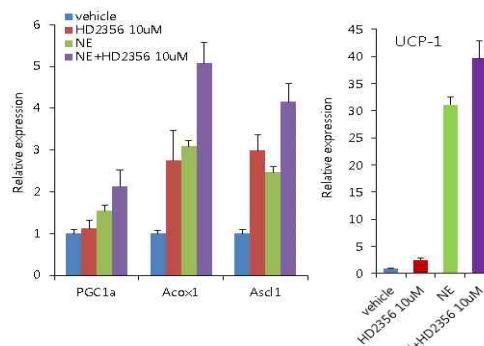
6주령 수컷 C57BL/6J에 고지방식을 10주 간 먹인 후, 화합물을 하루에 한 번 1달간 경구 투여를 실시한다. 그 후, 복부 내장지방을 채취하여 단백질을 추출하여 western blotting을 통해 지방조직에서의 PPAR γ 인산화를 검토하였다. 그 결과, 10 mg/kg Rosiglitazone을 투여한 군에서는 vehicle에 비해 PPAR γ 의 phosphorylation이 감소하였으나 3 mg/kg 또는 10 mg/kg HD2356 투여군에서는 phosphorylation의 변화가 보이지 않았다. 따라서 HD-2356은 고지방식으로 유도되는 PPAR γ 의 phosphorylation을 억제하지 못하는 것으로 사료된다.



3.3.7.8. HD-2356 항비만 mechanism연구(UNIST, 예비연구, 연구기간 2015.2-2015.5)

- 화합물의 세포수준에서의 지방산 산화 및 에너지 소비 촉진 효과 검증

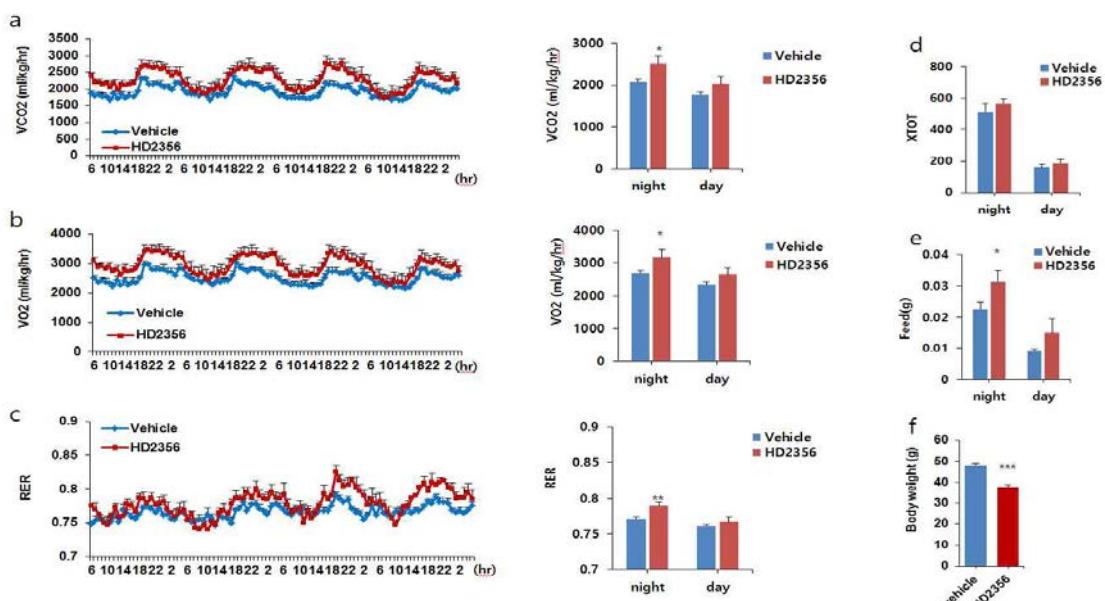
Brown adipocytes



갈색지방 유래 iBAT에 화합물을 처리하여 지방 합성(SREBP-1c, FASN), 지방 분해(HSL, ATGL), 지방산 산화(CPT1b, PPAR α), 열발생(PGC1 α , UCP-1)에 관련된 유전자 발현을 qPCR을 통해 검토하여 에너지 소비에 대한 화합물의 효과를 확인 해보았고, 관련 효과에 대해 긍정적인 결과 값을 얻어 후속 연구를 진행하였다.

3.3.7.9. 동물 수준에서의 에너지 소비 촉진 효과 평가(Report Number Unist-02, 2015년 4-5월 수행)

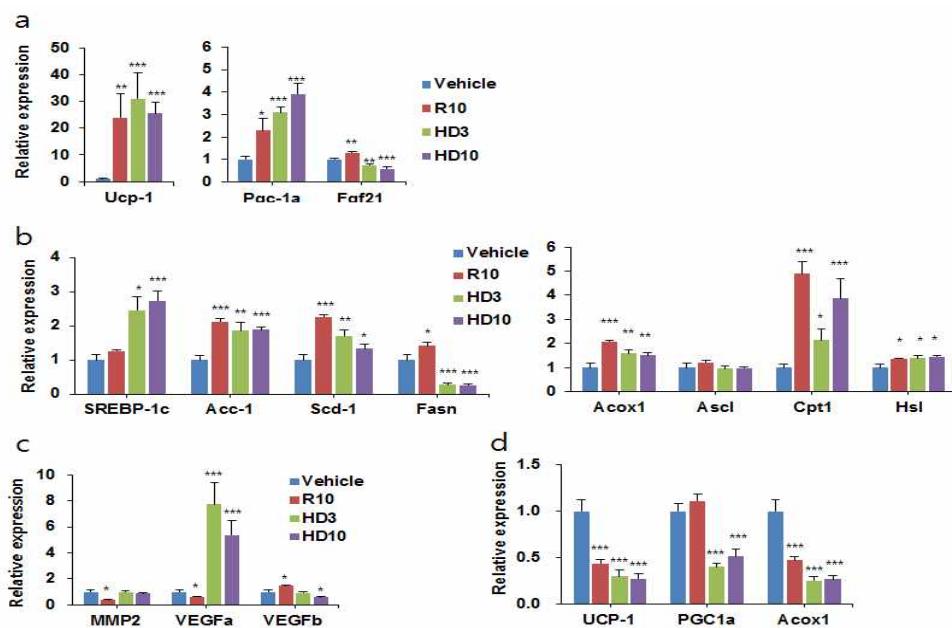
6주령 수컷 C57BL/6J에 고지방식을 10주간 먹인 후, 화합물(3 mg/kg)을 하루에 한 번 30일 간 경구 투여를 실시하였다. 투여가 종료된 시점에서 대조군과 비교하여 HD2356투여군에서 유의적인 체중 감소가 관찰되었다(Fig. f). 그 후, metabolic cage(Comprehensive Lab Animal Monitoring System, CLAMS)를 이용하여 에너지 섭취량과 소비량을 측정하였다. 그 결과, night 동안에 O₂ 소비량(Fig. a)과 CO₂ 생산량(Fig. b)이 유의적으로 증가하였다. 또한 RER이 대조군과 비교하였을 때 유의적으로 증가하였다(Fig. c). 반면, 동물의 움직임(운동량)을 나타내는 locomoto activity는 유의적인 변화가 없었고(Fig. d), food intake는 유의적으로 증가하였다 (Fig. e). 따라서 HD-2356은 *in vivo*상에서 에너지 소비를 촉진하는 것으로 사료된다.



3.3.7.10. 동물 수준에서의 에너지 소비 촉진 효과에 대한 mechanism 규명(Report Number Unist-02, gene expression)

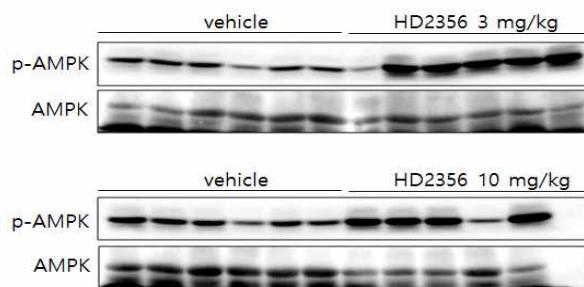
비만 모델에서 HD-2356은 유의적인 에너지 소비 증가와 함께 체중 감소 효과를 보였다. 또한 세포수준에서 HD-2356은 iBAT cell line에서 UCP-1의 발현을 유의적으로 증가시켰다. 따라서 HD-2356에 의한 체중 감소 효과에 대한 mechanism을 살펴보기 위해 6주령 수컷 C57BL/6J에 고지방식을 10주간 먹인 후, 화합물(3 또는 10 mg/kg)을 하루에 한 번 30 일 동안 경구 투여를 실시한 후, inguinal adipose tissue에서 thermogenesis (*Ucp-1*, *Pgc-1a*), lipogenesis (*Srebp-1c*, *Acc-1*, *Scd-1*, *Fasn*), lipolysis (*Hsl*), fatty acid oxidation (*Acox1*, *Ascl*, *Cpt1a*)에 대한 유전자 발현을 살펴보았다. Rosiglitazone (10 mg/kg)는 positive control로 사용하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여 thermogenic gene (*Ucp-1*, *Pgc-1a*)는 유의적으로 증가하였다 (Fig. a). Fatty acid oxidation과 lipolysis에 관여하는 *Acox1*, *Cpt1a*, *Hsl* 발현도 유의적으로 증가하였다 (Fig. c and d). 또한 lipogenesis에 관여하는 유전자의 발현 역시 HD2356 처리군에서 유의적으로 증가하였다 (Fig. b). 다음으로 angiogenesis에 관여하는 유전자 (*Mmp2*, *Vegfa*, *Vegfb*)의 발현을 살펴보았다. 그 결과, *Mmp2*는 발현의 변화가 없었고, *Vegfa*는 유의적으로 증가하였으나 *Vegfb*는 유의적으로 감소하였다 (Fig. c).

brown adipose tissue에서도 Thermogenic gene (*Ucp-1*, *Pgc-1a*)와 fatty acid oxidation gene (*Acox1*)의 발현을 살펴보았으나 대조군에 비해 유의적으로 발현이 감소하였다. 하지만 brown adipose tissue의 경우 positive control로 사용하였던 rosiglitazone에서도 이와 같은 유전자의 발현 증가가 보이지 않았다 (Fig. d). 따라서 HD-2356은 inguinal adipose tissue에서 energy expenditure에 관여하는 유전자의 발현을 증가를 통해 에너지 소비를 증가시키는 것으로 사료된다.



3.3.7.11. AMPK activation (*ex-vivo*, Report Number Unist-02)

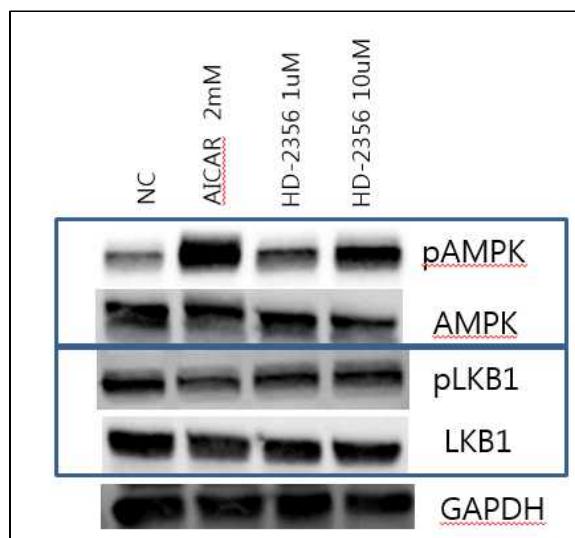
6주령 수컷 C57BL/6J에 고지방식을 10주간 먹인 후, 화합물(3 또는 10 mg/kg)을 하루에 한 번 30일 간 경구 투여를 실시한 후, epididymal adipose tissue에서 AMPK의 활성을 western blotting으로 확인하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여 HD-2356처리군에서 pAMPK의 발현이 증가하는 것이 관찰되었다. 따라서 HD-2356은 adipose tissue에서 pAMPK를 활성화시킴으로써 에너지 소비를 증가시키는 것으로 사료된다.



3.3.7.12. HD-2356의 AMPK activation mechanism 연구

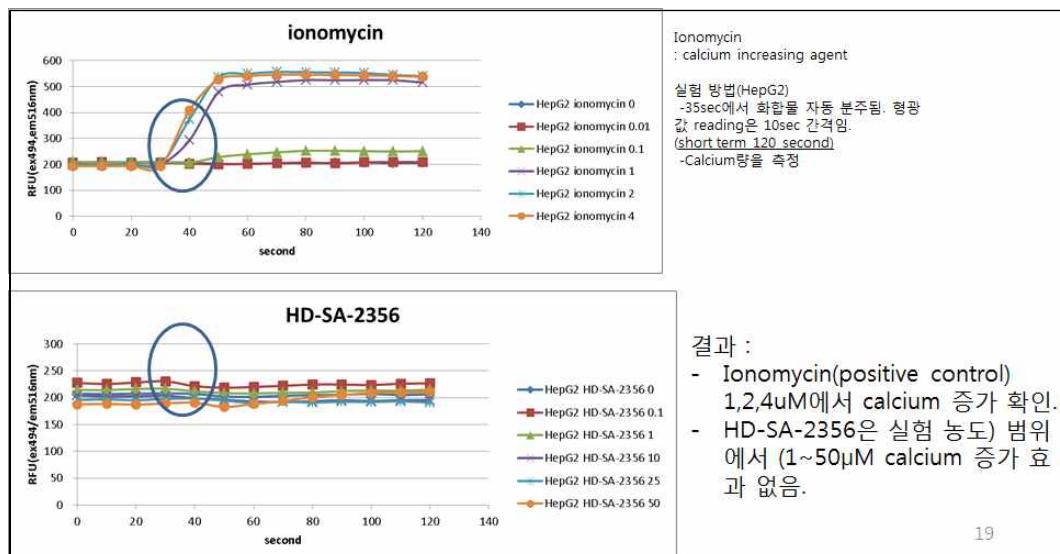
3.3.7.12.1. AMPK upstream signal study(LKB1/ Report number HD-pharm-04)

HD-2356 화합물의 Target tissue 중 하나인 Adipocyte 세포주인 3T3-L1(mouse adipocyte cell line)을 분화 시킨 후 HD-2356에 의해 AMPK phosphorylation이 증가하는 실험 조건에서 AMPK phosphorylation의 upstream signal인 LKB1의 activation 여부를 LKB1 phosphorylation을 통해 확인하였다. 실험 결과 HD-2356 화합물은 10 μ M 농도에서 AMPK의 phosphorylation을 증가시키지만 같은 농도에서 LKB1의 phosphorylation은 증가시키지 못했다. 따라서 HD-2356에 의한 AMPK phosphorylation의 upstream은 LKB1이 아닌 것으로 판단된다.



3.3.7.12.2. AMPK upstream signal Study (CaMKKb/ Report number HD-pharm-04)

HD-2356 화합물의 Target tissue 중 하나인 Hepatocyte 세포주인 HepG2(Human liver cell line)을 이용하여 AMPK phosphorylation의 upstream signal 중 하나인 CaMKKb의 activation 여부를 세포내 Calcium 농도 증가 여부를 통해 확인하였다. Calcium 농도 변화는 short term(~120second), long term(~1hour)으로 각각 나눠서 실험하였는데, 실험 결과 HD-2356 화합물은 positive control인 ionomycin과 달리 세포내 calcium 농도를 short term, long term 실험 조건에서 모두 증가시키지 못하는 것을 확인할 수 있었다.



3.3.7.13. Direct AMPK activation study(SignalChem, Report NumPber SCI-1706)

- AMPK: α,β,γ subunit으로 구성, 12 isoforms, control은 vehicle사용, phosphorylation 정도를 측정
- AMP (AMPK activator); positive control로 사용, % change from Control로 표기 --
- HD-2356은 AMPK를 direct activation 시키지 않는다.

Targets	Concentrations	Assay Conditions		Control			Reference: AMP			HD-2356		
		Raw Values (cpm)	Average Value	Raw Values (cpm)	Average Value	% Activation	Raw Values (cpm)	Average Value	% Activation	Raw Values (cpm)	Average Value	% Activation
AMPK A1/B1/G1	1 μM	111,093	110,391	110,742	144,560	157,858	151,209	36.54	115,302	115,454	115,378	4.19
	10 μM						107,974	114,112	111,043			0.27
AMPK A1/B1/G2	1 μM	153,180	160,475	156,828	198,066	192,840	195,453	24.63	172,724	186,381	179,553	14.49
	10 μM						165,528	174,296	169,912			8.34
AMPK A1/B1/G3	1 μM	80,973	88,106	84,540	104,108	102,821	103,465	22.39	89,485	96,711	93,098	10.12
	10 μM						92,181	92,114	92,148			9.00
AMPK A1/B2/G1	1 μM	136,232	142,270	139,251	176,399	174,385	175,392	25.95	129,619	134,915	132,267	(5.02)
	10 μM						133,313	133,945	133,629			(4.04)
AMPK A1/B2/G2	1 μM	125,344	131,198	128,271	171,067	168,851	169,959	32.50	147,964	146,588	147,276	14.82
	10 μM						147,843	149,347	148,595			15.84
AMPK A1/B2/G3	1 μM	93,619	100,050	96,835	104,681	95,169	99,925	3.19	96,614	87,580	92,097	(4.89)
	10 μM						94,607	93,411	94,009			(2.92)
AMPK A2/B1/G1	1 μM	41,031	46,585	43,808	109,109	109,622	109,366	149.65	44,802	48,426	46,614	6.41
	10 μM						46,652	47,038	46,845			6.93
AMPK A2/B1/G2	1 μM	63,399	68,185	65,792	118,992	116,684	117,838	79.11	73,031	76,328	74,680	13.51
	10 μM						73,171	69,333	71,252			8.30
AMPK A2/B1/G3	1 μM	26,027	28,115	27,071	57,525	57,892	57,709	113.17	31,601	31,438	31,520	16.43
	10 μM						29,616	26,663	28,140			3.95
AMPK A2/B2/G1	1 μM	39,930	45,652	42,791	61,457	62,439	61,948	44.77	44,329	40,955	42,642	(0.35)
	10 μM						40,635	33,515	37,075			(13.36)
AMPK A2/B2/G2	1 μM	26,068	27,595	26,832	46,104	46,827	46,466	73.18	31,151	30,400	30,779	14.71
	10 μM						28,143	28,573	28,358			5.68
AMPK A2/B2/G3	1 μM	6,519	6,914	6,717	11,124	10,666	10,895	62.21	7,967	8,122	8,045	19.77
	10 μM						6,576	7,008	6,792			11.12

3.3.7.14 HD-2356의 mechanism 추가 연구

3.3.7.14.1 1차 비만관련 GPCR 작용 관련 in vitro screening 진행

(Report number HYU010514A)

- 연구 결과: 15개의 비만관련 receptors에 대한 agonist /antagonist *in vitro* 결과 영향이 미약한 것으로 확인됨

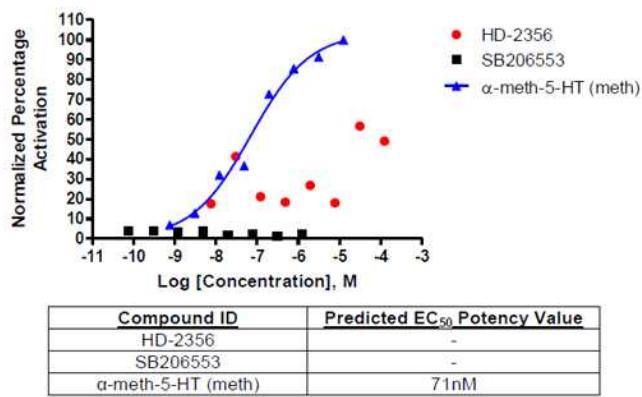
Agonist Data

(Percentage Activation Normalized to E_{max} Control)

GPCR Target	HD-2356 @ 12.5μM		
	n1	n2	Avg.
5-HT1A	-0.8	-0.9	-0.9
5-HT2A	-24.4	-15.2	-19.8
5-HT2B	-0.6	1.2	0.3
5-HT2C	42.6	23.5	33.0
5-HT6	5.6	-4.8	0.4
ADRA2C	-1.6	-7.7	-4.7
CB1	-1.6	0.2	-0.7
CB2	-5.5	-4.3	-4.9
D1	-4.1	-4.0	-4.1
D2L	-7.6	13.5	3.0
D4	5.5	2.8	4.2
D5	-5.1	-0.7	-2.9
H1	0.1	-0.2	0.0
H2	-8.3	-8.5	-8.4
H3	-1.5	-2.0	-1.7

단일 농도(12.5uM)에서 5-HT2C에서 33%의 활성을 나타내는 것으로 나타났으며, 이에 대한 농도의존성에 대한 추가적인 실험을 진행하였다. 실험결과는 아래와 같이 농도의존성이 없음을 확인하였다.

5-HT2C Agonist Data (Percentage Activation Normalized to E_{max} Control)

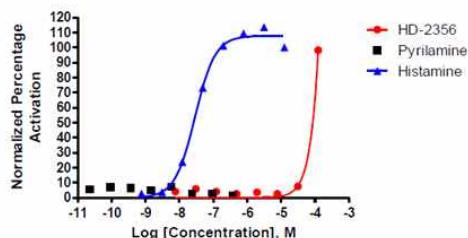


Antagonist Data (Percentage Inhibition)

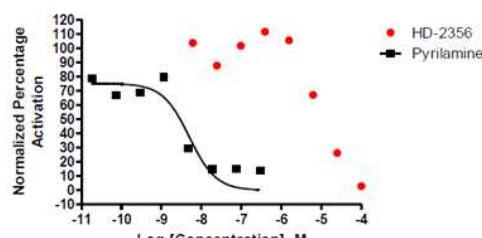
GPCR Target	HD-2356 @ 10μM		
	n1	n2	Avg.
5-HT1A	21.3	32.4	26.8
5-HT2A	-8.7	1.2	-3.8
5-HT2B	13.1	10.9	12.0
5-HT2C	52.6*	59.9*	56.2*
5-HT6	2.7	10.9	6.8
ADRA2C	46.0	45.9	46.0
CB1	17.8	24.0	20.9
CB2	27.3	41.6	34.4
D1	10.4	10.0	10.2
D2L	9.3	15.7	12.5
D4	36.1	33.2	34.7
D5	-7.5	-9.1	-8.3
H1	61.6	52.9	57.3
H2	1.6	-0.5	0.5
H3	95.9	88.4	92.2

Antagonist 또한 단일 농도(10uM)에서 H2,H3에서 각각 57%,92%의 저해 효과를 나타내어 추가적인 농도의 존성 실험을 수행하였다. 실험 결과 아래와 같이 농도의 존성이 없음을 확인하였다.

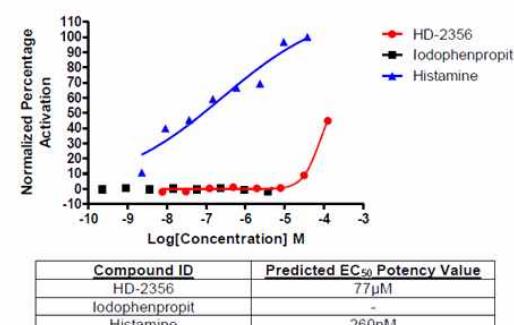
H1 Agonist Data (Percentage Activation Normalized to E_{max} Control)



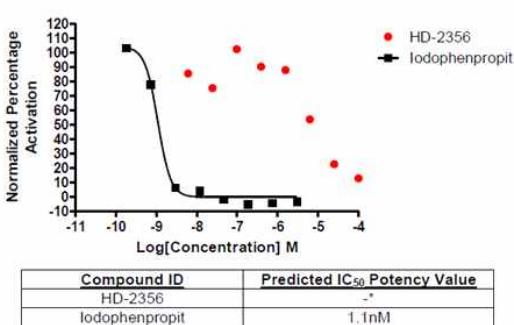
H1 Antagonist Data (Percentage Activation Normalized to EC₈₀ Control)



H3 Agonist Data (Percentage Activation Normalized to E_{max} Control)



H3 Antagonist Data (Percentage Activation Normalized to EC₈₀ Control)



3.3.8.14..2. 2차 비만관련 GPCR target *in vitro* assay(Report number HYU021215A)

- 연구 결과: 26개의 비만관련 receptors에 대한 agonist /antagonist *in vitro* 결과 영향이 미약한 것으로 확인됨

Agonist Data

(Percentage Activation Normalized to E_{max} Control) Antagonist Data (Percentage Inhibition)

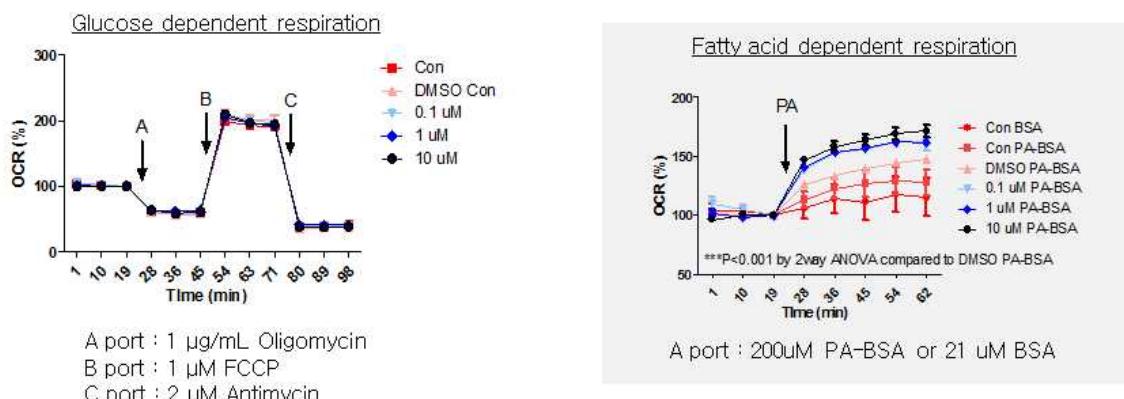
GPCR Target	HD-2356-L-15001 @ 12.5μM		
	n1	n2	Avg
5-HT1A	-1.0	-3.3	-2.2
5-HT2A	-1.8	-4.1	-3.0
5-HT2B	0.9	-2.7	-0.9
5-HT2C	1.9	0.0	1.0
5-HT6	-9.3	-9.3	-9.3
ADRA2C	-3.3	0.4	-1.4
ADRB1	4.4	-4.1	0.1
ADRB2	-3.6	-4.0	-3.8
ADRB3	-0.7	-0.8	-0.8
CB1	-0.6	-0.8	-0.7
CB2	0.3	-0.3	0.0
CCK1	-0.1	1.8	0.8
CCK2	-0.7	-0.7	-0.7
D1	-2.0	-0.7	-1.4
D2L	-2.6	-1.6	-2.1
D4	0.1	-0.3	-0.1
D5	-0.7	-0.8	-0.7
Ghrelin	-3.6	-3.8	-3.7
H1	7.1	-2.0	2.6
H2	1.8	-0.5	0.6
H3	-2.3	-0.2	-1.3
MC4	-2.9	-3.1	-3.0
MCHR1	-2.2	-2.2	-2.2
MCHR2	-9.9	-1.3	-5.6
Y2	9.1	-5.9	1.6
Y4	0.4	2.6	1.5

GPCR Target	HD-2356-L-15001 @ 10μM	
	n1	n1
5-HT1A	4.4	9.4
5-HT2A	-6.1	-6.7
5-HT2B	5.8	1.5
5-HT2C	17.4	19.0
5-HT6	6.7	7.6
ADRA2C	24.9	18.4
ADRB1	10.9	20.3
ADRB2	12.6	22.6
ADRB3	36.1	36.0
CB1	17.6	16.7
CB2	15.1	8.9
CCK1	17.7	15.5
CCK2	17.4	14.7
D1	6.3	5.6
D2L	7.6	7.7
D4	4.7	4.5
D5	2.4	0.8
Ghrelin	-1.8	4.5
H1	18.8	19.8
H2	17.4	12.8
H3	2.5	8.3
MC4	30.7	42.7
MCHR1	32.1	28.5
MCHR2	15.8	15.3
Y2	-3.1	-2.5
Y4	10.9	15.3

3.3.8.15.3 Seahorsebio XF24-3 analyzer을 이용한 에너지 소비 예비 연구

- Primary cultured hepatocytes from 11 weeks C57BL/6 mouse, Chemical pretreated for 24hr

- 마우스로부터 간세포를 분리배양한 후 Chemical을 24시간 전처리하고, 당(glucose) 및 지질(Palmitic acid, PA)에 대한 산화능 Oxygen consumption ratio(OCR)를 XF24-3 analyzer (Seahorsebio inc.)를 이용하여 측정하였음. (OCR은 mitochondria의 대사기능을 대변하는 항목임)



- 결과: Chemical 처리 후, 간세포에서 Glucose oxidation은 변화없으나(좌측), Fatty acid oxidation은 농도에 따라 증가함. 이는 HD-2356 화합물이 미토콘드리아 지질대사에 영향이 있음을 나타내며 체중감소에 영향이 있을 것으로 사료된다.

3.3.8. 독성 연구

독성연구는 GLP 기관인 KIT에서 수행하였다

3.3.8.1: 조제물 분석-0.05-TW80(Report Number G116103)

3.3.8.2: 조제물 분석-DW(Report Number G116104)

3.3.8.3: 조제물 분석-DMSO(Report Number G116105)

3.3.8.4: HD-2356_Method_Validation_Final_Report(정읍, 시료분석 뱸리 데이션) (Report Number G216066)

3.3.8.5: 단회 투여 독성(Rat) 완료하였다.(Report Number G116108)

3.3.8.6: 2주 반복투여(Rat) DRF 실험을 완료하였다.(Report Number N116038)

본 실험 4주 반복독성 시험 경우 500mg/kg 이하로 예상됨

3.3.8.7: 단회 투여(monkey) 독성 완료하였다(Report Number N 216046)

3.3.8.8: 2주 반복투여(Monkey) DRF 실험을 완료하였다.

(2017년 2월 현재, Report 작성중임)

본 실험 4주 반복독성 시험 경우 1000mg/kg 이하로 예상됨

3.3.8.9: 유전 독성 예비 실험(HD-Tox-01, report 화 되지 않았음)

3.3.8.10: Peroxisome proliferation issue

3.3.8.10.1. mouse에서의 HD-2356의 peroxisome proliferation

(Report Numbe 55-15-CP, 종합의견 요약)

조직병리학적 검경결과 HD 2356의 투여에 의한 주요 병변은 간 및 흉선에서 관찰되었다. 간에서는 HD 2356 투여에 의한 변화로 Generalized hepatocyte hypertrophy와 Generalized hepatocyte granular eosinophilia가 모든 투여군에서 발생하였으며, 수컷과 암컷 투여군 모두에서 정도(severity)가 용량의존적으로 증가하였다. 또한 Hepatocellular apoptosis, Parenchymal inflammation, dystrophic mineralization, Parenchymal necrosis, pigmented Macrophage/kupffer cells 병변이 발생하였다. 투여군에서 발생한 Generalized hepatocyte hypertrophy와 Generalized hepatocyte granular eosinophilia는 투여 약물의 의한 병변으로 판단된다. 또한 Hepatocellular apoptosis와 Parenchymal inflammation은 hepatocyte hypertrophy와 hepatocyte granular eosinophilia에 의해 이차적으로 hepatocyte에 손상이 생겨 발생한 병변으로 보인다. 또한 Dystrophic mineralization, Parenchymal necrosis는 간 손상으로 인한 염증이 심화되면서 나타난 것으로 판단된다. 이 외에 간에서 관찰된 Pigmented Macrophage/kupffer cells 소견 또한 약물에 의한 변화로 판단된다.

이 모든 간의 변화는 peroxisome proliferation 으로 판단되었고, 이를 규명하기 위한 전자 현미경 검사 등의 추가 실험이 요구되었다.

3.3.8.10.2. Rat에서의 HD-2356의 peroxisome proliferation

(Report Number GP-14-001, 종합의견 요약)

Sprague-Dawley(SD) 랫드에 2주 경구 투여하여 HD 046-2356물질의 독성을 관찰하였다. 수컷 고용량 투여군(250 mg/kg)에서 투여 11일차에 사망동물이 1예 발생하였으며, 사망 개체 (5M014)에 대하여 사후 부검과 검경을 실시한 결과, 사망과 관련된 조직병리학적 증거는 발견되지 않았다. 투여관련 변화가 나타난 장기는 간, 갑상선, 췌장이며 용량 반응성이 있었다.

3.3.8.10.3. HD-2356을 mouse에 7일 반복 경구 투여하는 모델을 이용한 간의 Peroxisome 증식 기전규명 연구(Report number 32-16-CP, 종합의견 요약)

전자현미경 검사 결과, peroxisome이 증가하였다. 단위면적당 평균 peroxisome의 개수는 0mg/kg/day군에 비하여 50mg/kg/day 투여군에서 크게 증가 하였으며, peroxisome의 지름 또한 증가한 것을 확인하여 조직병리검사에서 나타난 병변이 peroxisome proliferation에 의한 것임을 확정할 수 있었다.

Catalase와 PMP70에 대한 면역조직화학염색 검사 결과, 수컷과 암컷의 모든 50mg/kg/day군 마우스의 간세포 세포질에서 다수의 적갈색(red-brown)의 과립성 물질이 관찰되었고, 0mg/kg/day군의 간세포 세포질에서는 이보다 적은 정도로 관찰되었다. Western blot 검사 결과, 50mg/kg/day 군 마우스 모든 수컷 개체 및 일부 암컷 개체에서 Catalase의 발현이 0mg/kg/day군의 발현에 비하여 증가하였으며, 50mg/kg/day 군 모든 개체에서 PMP70의 발현이 0mg/kg/day 군의 발현에 비하여 증가한 것을 관찰하였다.

결과를 종합하여 볼 때, 본 시험의 HD2356약물 50mg/kg/day 투여군에서 나타난 간 독성은 peroxisome proliferation이 원인으로 판단되었다. 또한 Hepatocellular apoptosis와 Parenchymal inflammation은 hepatocyte hypertrophy와 hepatocyte granular eosinophilia에 의해 이차적으로 hepatocyte에 손상이 생겨 발생한 병변으로 보인다. 또한 Dystrophic mineralization, Parenchymal necrosis는 간 손상으로 인한 염증이 심화되면서 나타난 것으로 판단된다. 이 외에 간에서 관찰된 Pigmented Macrophage/kupffer cells 소견 또한 약물에 의한 변화로 판단된다.

이 모든 간의 변화는 peroxisome proliferation 으로 판단되었고, 이를 규명하기 위한 전자 현미경 검사 등의 추가 실험이 요구되었다.

3.3.8.10.2. Rat에서의 HD-2356의 peroxisome proliferation (Report Number GP-14-001, 종합의견 요약)

Sprague-Dawley(SD) 랫드에 2주 경구 투여하여 HD 046-2356물질의 독성을 관찰하였다. 수컷 고용량 투여군(250 mg/kg)에서 투여 11일차에 사망동물이 1예 발생하였으며, 사망 개체 (5M014)에 대하여 사후 부검과 검경을 실시한 결과, 사망과 관련된 조직병리학적 증거는 발견되지 않았다. 투여관련 변화가 나타난 장기는 간, 갑상선, 췌장이며 용량 반응성이 있었다.

3.3.8.10.3. HD-2356을 mouse에 7일 반복 경구 투여하는 모델을 이용한 간의 Peroxisome 증식 기전규명 연구(Report number 32-16-CP, 종합의견 요약)

전자현미경 검사 결과, peroxisome이 증가하였다. 단위면적당 평균 peroxisome의 개수는 0mg/kg/day군에 비하여 50mg/kg/day 투여군에서 크게 증가 하였으며, peroxisome의 지름 또한 증가한 것을 확인하여 조직병리검사에서 나타난 병변이 peroxisome proliferation에 의한 것임을 확정할 수 있었다.

Catalase와 PMP70에 대한 면역조직화학염색 검사 결과, 수컷과 암컷의 모든 50mg/kg/day군 마우스의 간세포 세포질에서 다수의 적갈색(red-brown)의 과립성 물질이 관찰되었고, 0mg/kg/day군의 간세포 세포질에서는 이보다 적은 정도로 관찰되었다. Western blot 검사 결과, 50mg/kg/day 군 마우스 모든 수컷 개체 및 일부 암컷 개체에서 Catalase의 발현이 0mg/kg/day군의 발현에 비하여 증가하였으며, 50mg/kg/day 군 모든 개체에서 PMP70의 발현이 0mg/kg/day 군의 발현에 비하여 증가한 것을 관찰하였다.

결과를 종합하여 볼 때, 본 시험의 HD2356약물 50mg/kg/day 투여군에서 나타난 간 독성은 peroxisome proliferation이 원인으로 판단되었다.

3.3.8.10.4. Beagle에서의 HD-2356의 peroxisome proliferation

(Report Number 4-16-CP, 종합의견 요약)

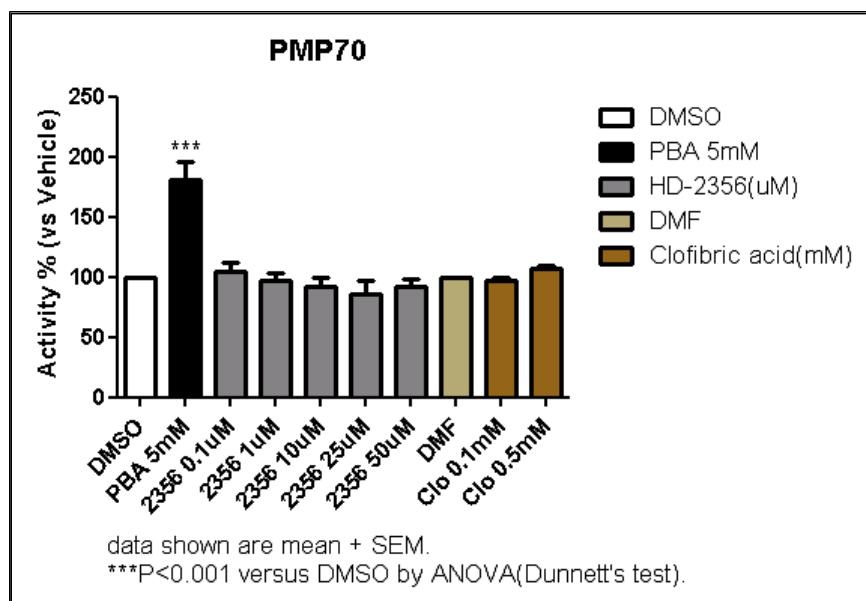
비글견(beagle dog)에서 당뇨치료제 후보물질(HD-2356) 투여에 따른 약물의 잠재적인 독성을 탐색적으로 알아보기 위한 시험이었다. 최초 투여용량을 구하기 위해 이전에 수행한 마우스 독성 시험 최고 용량인 50mg/kg을 비글견 용량으로 변환하여 최초 투여 용량 ($50\text{mpk} \times 1/6 = 8\text{mpk}$)을 산출하였다. 약물 투여 후 임상증상 관찰과 혈청생화학검사를 바탕으로 투여 용량을 증가시켜 총 16회에 걸쳐 용량설정시험을 진행하였고, 반복 투여 독성시험의 투여 농도를 500mg/kg으로 설정하고 반복투여시험을 진행하였다. 반복투여독성시험 1일차, 2일차 투여 직후 수컷과 암컷 둘다 구토 증상을 보였다. 5일차 투여 직후에는 구토 증상이 없었으나, 2시간 후 수컷에게서 구토 혼적을 발견하였다. 그 외의 투여에서는 구토 증상이 발견되지 않았다. 반복투여독성시험 약물 투여시 수컷과 암컷 비글 모두에서 침이 많이 흘리는 증상을 관찰 할 수 있었다. 혈액검사, 혈청생화학검사 결과 특이적인 사항이 관찰되지 않았다. 조직병리학적 검사 결과, 암컷 비글의 폐에서 Terminal bronchioles/alveolar ducts-inflammatoty cells/alveolar macrophages 가 관찰되었는데, 이는 침을 많이 흘리는 증상에 의한 병변이었다. 위에서는 투여 과정에서 생긴 자극에 의한 병변이 미약한 정도로 나타났다. Comet assay 결과는 대조군이 없어 판단하기 어렵지만 음성으로 판단된다. 전해질 검사 결과 투여전과 비교하였을 때 특이적인 변화가 관찰되지 않았고, 응고 검사 결과는 대조군이 없어 판단이 어렵지만 정상 범위로 판단된다.

결론적으로 HD-2356 500mpk를 7일간 투여한 비글의 장기에서는 조직병리학적 검경 결과 시험물질 투여와 관련된 표적장기는 폐와 위로 판단된다. 또한 본 시험 조건에서 MTD는 500 mg/ 이상이며, NOAEL 은 500 mg/kg 이상으로 여겨진다.

시험결과를 참고로 판단할 때, 향후 28일 투여 시험에서는 고용량을 700 mg/kg/day 로 하는 것이 추천되었다.

3.3.8.10.5. HD-2356의 Peroxisome Proliferation 여부 (Human HepG2 cell, Report Number HD-Pharm-02)

HD-2356 화합물은 mouse 조직에서 Hepatic peroxisome proliferation을 유도하였다. Hepatic peroxisome proliferation 현상은 주로 설치류 특이적 현상으로 알려져 있기 때문에 HD-2356에 의한 peroxisome proliferation 현상이 비설치류 세포에서도 나타나는지 Human liver cell line인 HepG2 세포주를 이용하여 peroxisome proliferation 유도 실험을 수행하였다. 실험 결과 HD-2356화합물은 HepG2 세포에서는 peroxisome proliferation을 일으키지 않았다.



3.3.9. HD-2356 formulation 연구

경구투여가 가능하게 적합한 부형제를 선정하기 위해 예비실험으로 HD-2356외의 상호 작용을 확인하는 실험으로 HD-2356 단일 및 복합검체의 장기 및 가속 보관 샘플에서 성상, DSC 및 FT-IR 측정결과는 11개의 부형제 가 HD-2356간에 서로 상호작용이 없는 것으로 판명되어 향후 후속연구에 사용예정이다.

3.3.9.1. HD-2356 화합물의 compatibility test (장기 및 가속실험)

3.3.9.1.1. Compatibility test의 protocol

항목	세부사항	비고
Mixture 선정	1) 주성분과 부형제 1:1 (w/w) mixture로 보관 용기당 1g 미하의 혼합물로 한정함 2) 보관용기 : 뚜껑이 달린 투명한 유리 바이알	1) 주성분의 특성, 가격, 처방비율에 따라 유동적 임 (혼합물은 되도록 1g 미하로 한다.)
단독보관 검체	주성분, 부형제 각 항목별 mixtire가 아닌 단독으로 검체를 보관	Ex) 주성분 7g, 부형제 7g
시험조건	장기(25°C, 60%습도), 가속(40°C, 75%습도) 챔버에서 보관	광안정성 및 가속시험은 별도로 진행
시험기간 (12주)	Initial, 3 days, 7days, 2weeks, 3 weeks, 4 weeks, 12 weeks	-
Sampling points	6회	-
시험항목	1) 성상 (사진으로 기록) 2) DSC, TGA 3) FT-IR	

3.3.9.1.2. Compatibility test의 실험결과 요약

순번	검체	시험결과															
		Initial		3 days		1 week		2 weeks		3 weeks		4 weeks		12 weeks			
	시험항목	성상	DSC	FT-IR	성상	DSC	FT-IR	성상	DSC	FT-IR	성상	DSC	FT-IR	성상	DSC	FT-IR	
1	HD-2356 (alone)	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
2	+MCC	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
3	+Starch	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
4	+Lactose	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
5	+PVP	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
6	+HPC	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
7	+HPMC	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
8	+Cross-povidone	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
9	+Na-CMC	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
10	+SSG	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
11	+Mg-stearate	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
12	+Talc	-	-	-	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

3.3.9.1.3. compatibility test 단일 검체성상 (장기-25℃, 60%습도) - 성상 변화 없음



3.3.9.1.4. compatibility test 단일 검체 성상 (가속-40℃, 75%습도) - 성상변화 없음



3.3.9.1.5. compatibility test 복합검체 성상 (장기-25℃, 60%습도) - 성상변화 없음



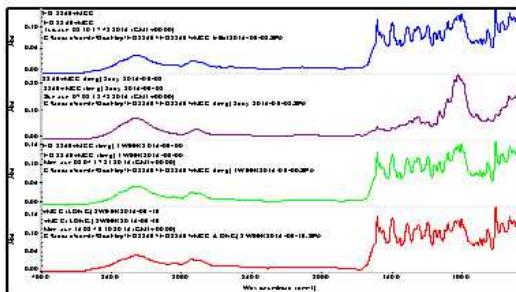
3.3.9.1.6. compatibility test 복합검체 성상 (가속-40℃, 75%습도) - 성상변화 없음



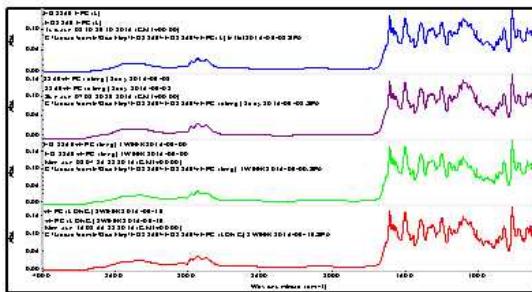
3.3.9.2. HD-2356 화합물의 compatibility test(FT-IR 분석)

3.3.9.2.1. compatibility test FT-IR 분석 (복합 검체)

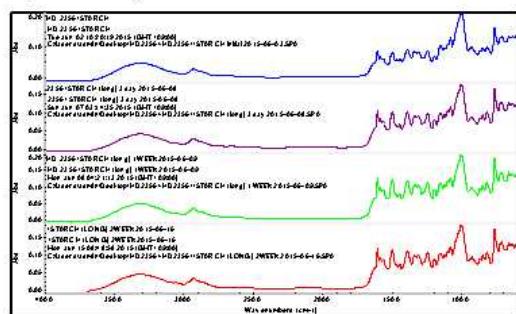
[2356 + MCC]



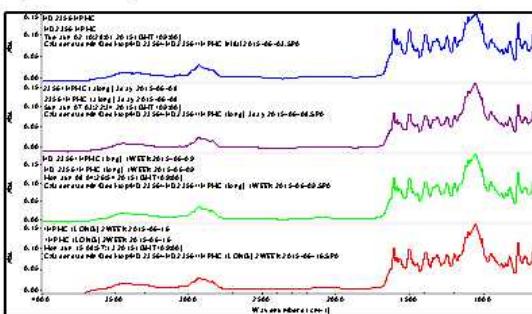
[2356 + HPC (L)]



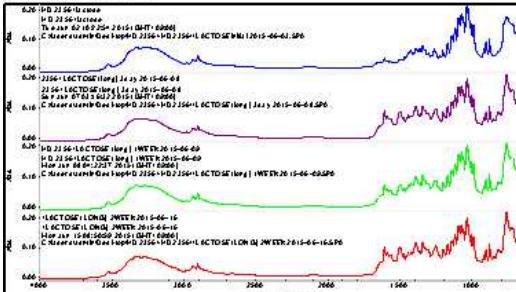
[2356 + Starch]



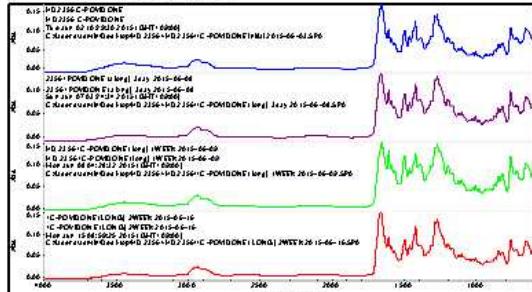
[2356 + HPMC]



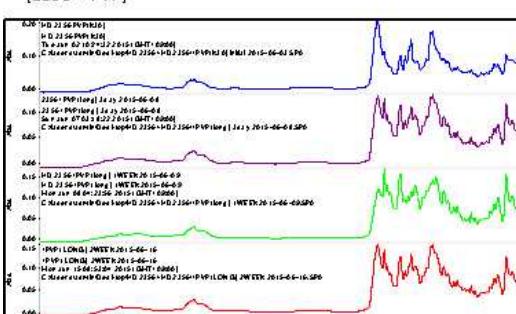
[2356 + Lactose]



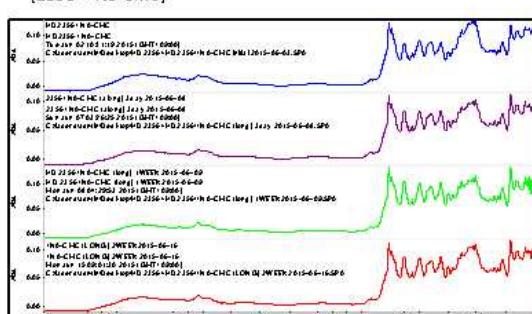
[2356 + Cross-povidone]

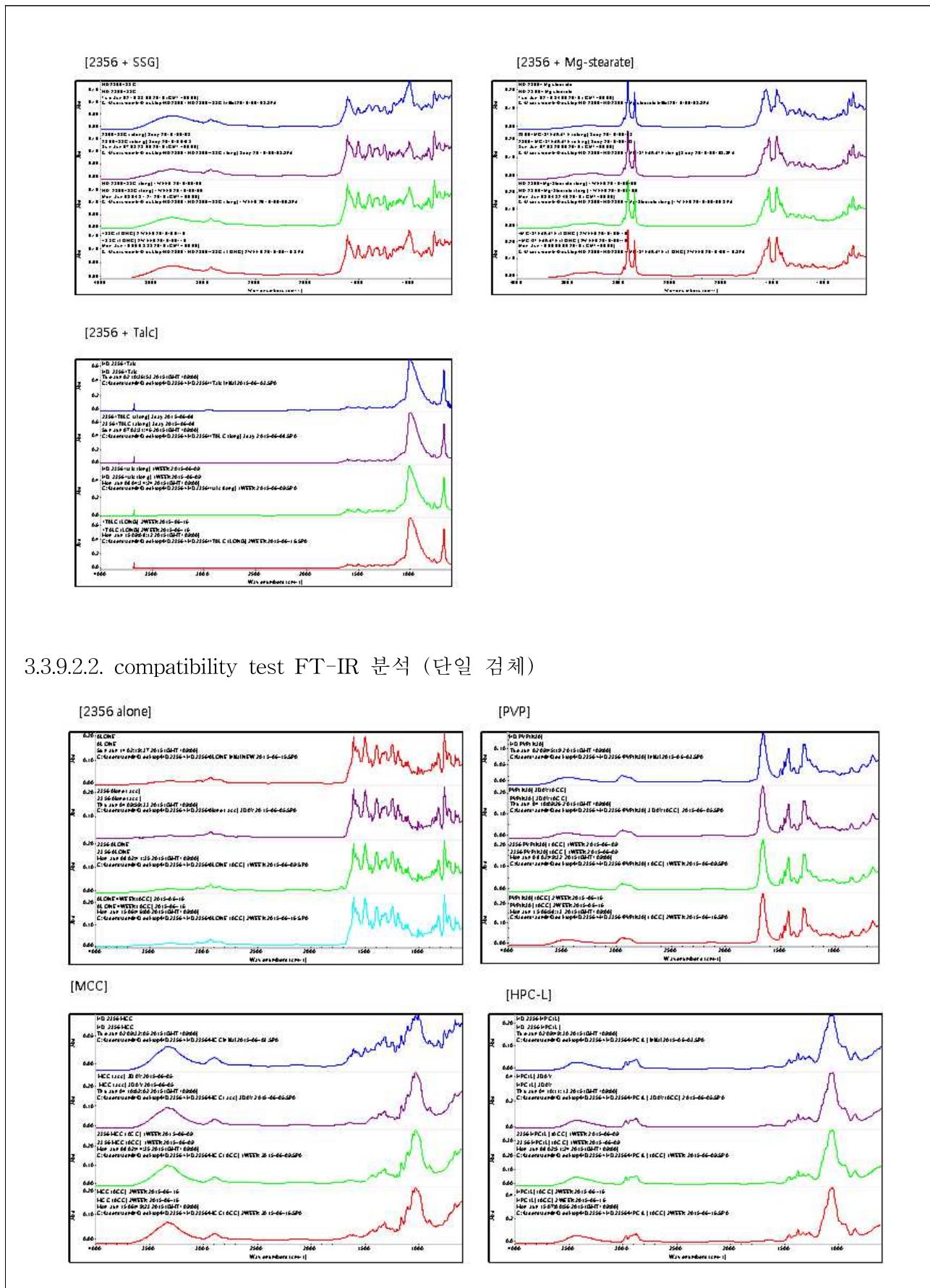


[2356 + PVP]

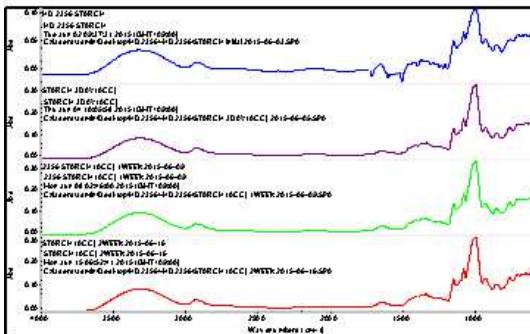


[2356 + Na-CMC]

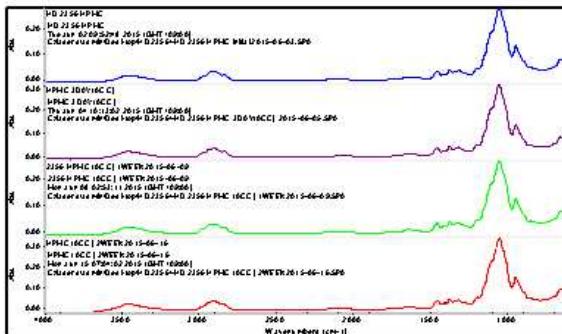




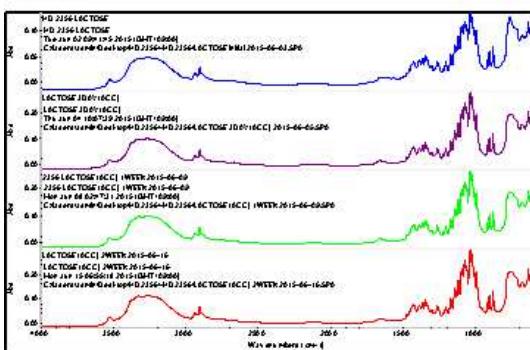
[Starch]



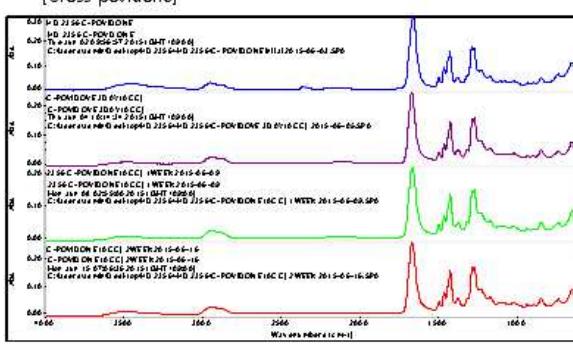
[HPMC]



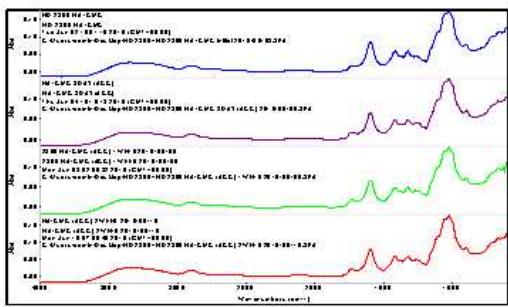
[Lactose]



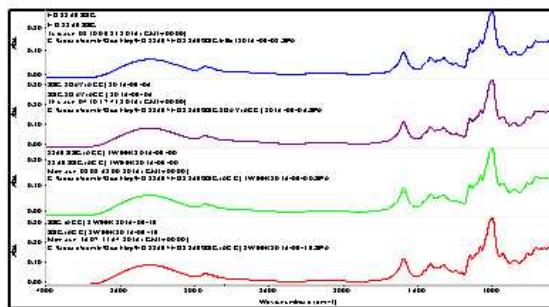
[Cross-povidone]



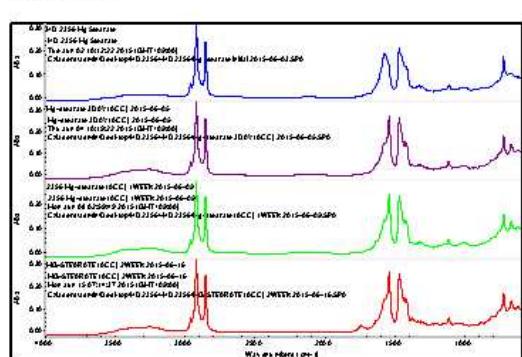
[Na-CMC]



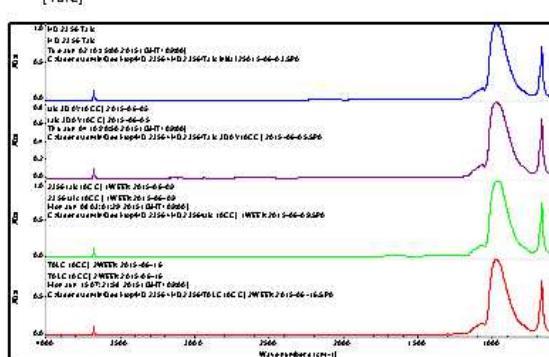
[SSG]



[Mg-stearate]

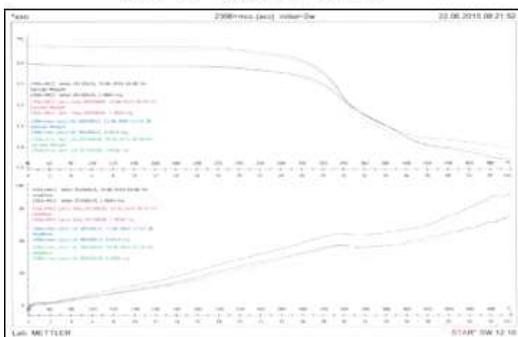


[Talc]

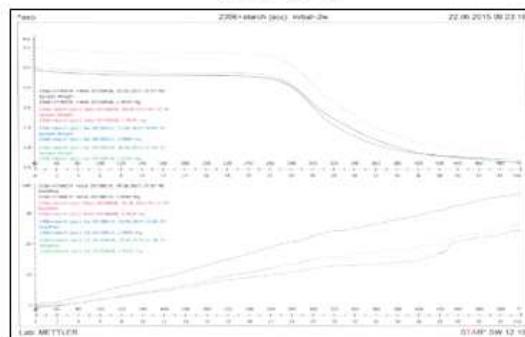


3.3.9.3. HD-2356 화합물의 compatibility test(DSC 분석)

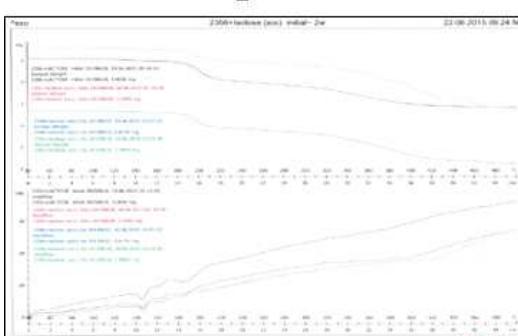
DSC 분석_2356+MCC



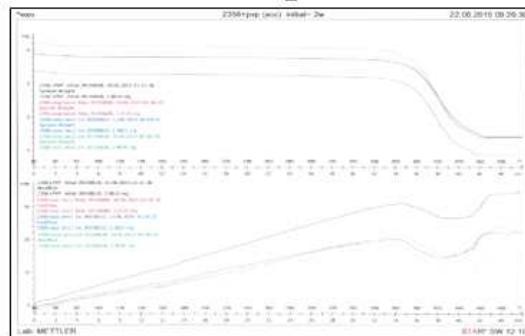
DSC 분석



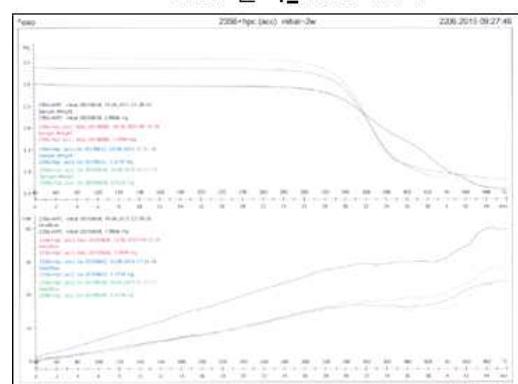
DSC 분석_2356+LACTOSE



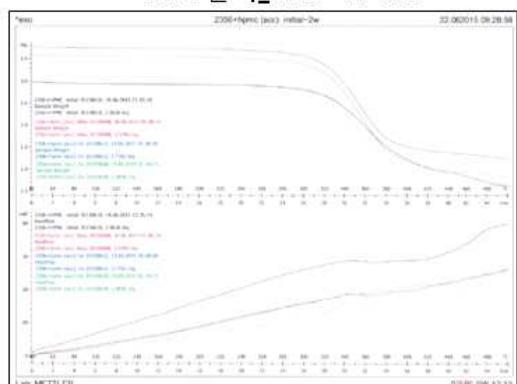
DSC 분석_2356+PVP



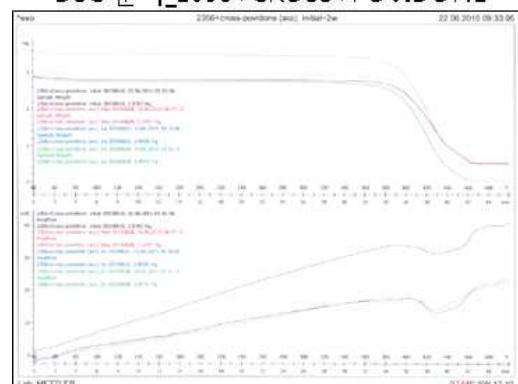
DSC 분석_2356+HPC



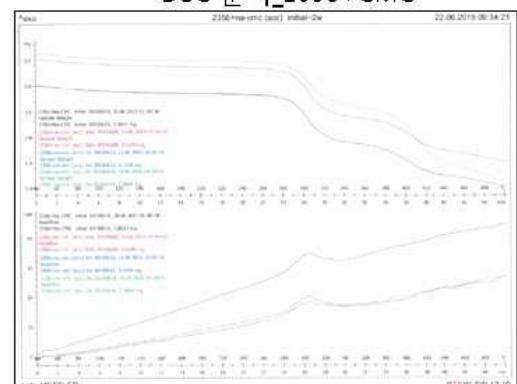
DSC 분석_2356+HPMC



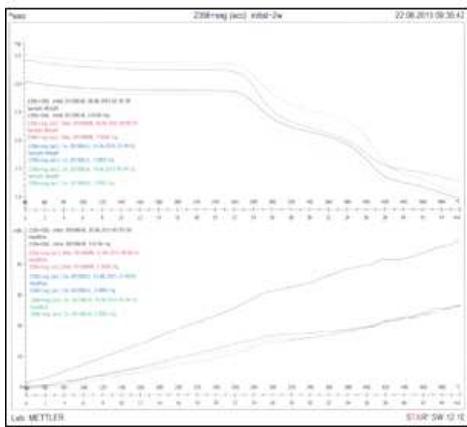
DSC 분석_2356+CROSS+POVIDONE



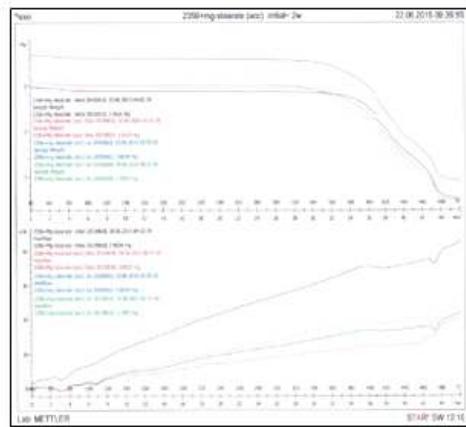
DSC 분석_2356+CMC



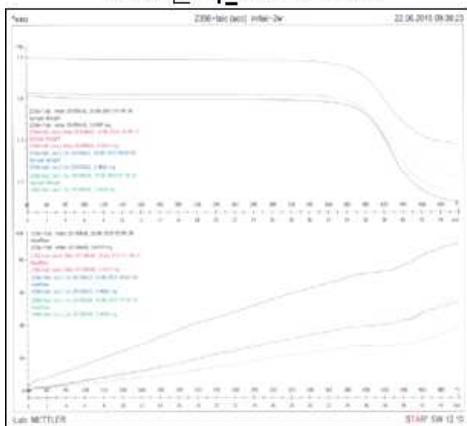
DSC 분석_2356+SSG



DSC 분석_2356+MG-STEARATE



DSC 분석_2356+TALC

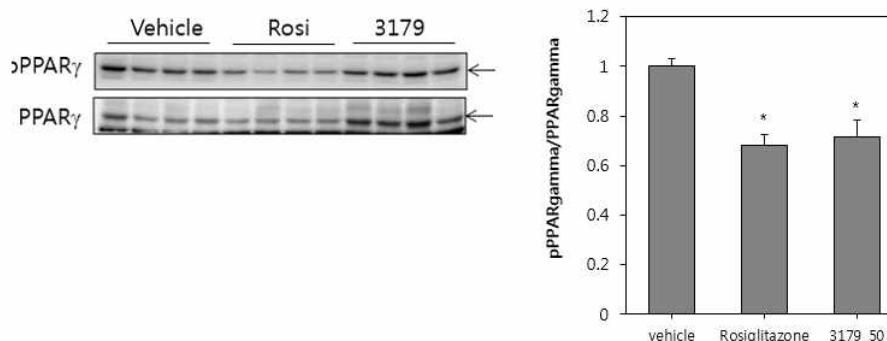


3.3.10. HD-2356 후속물질 연구(Report 2월 현재 작성 중)

HD-2356 후속물질 연구로 500여종 물질을 합성하여 library를 확보 하였고, *in vitro* assay 결과 1) PPAR γ 에 높은 affinity를 가지며(high affinity for PPAR γ), 2) PPAR γ agonist의 활성이 없는(lacking PPAR γ agonist), 3) 선택적으로 CDK5에 의한 인산화 억제 효과를 가지는(Blocking the CDK5 mediated PPAR phosphorylation) 과정 컨셉과 일치하는 물질 80개를 확보하여 DIO에서 약효를 확인한 결과 4종에서 약효를 나타내었고, 최종적으로 ex-vivo를 통해 선택적으로 CDK5에 의한 PPAR γ 의 인산화 억제 효과를 가지는 물질 1종을 도출하였다.

In vitro assay		HD-SA-3179
Structure		
M, W		472.69
Binding Affinity Rosiglitazone : 98 nM		90%, (95%) - 331nM
Transcription activity		No activity(11.97%)
CDK5 phosphorylation inhibition(10uM)		
CYP 10 uM (5-isomers)	1A2	104.29% (> 100 uM)
	2C9	44.69% (12.85 uM)
	2C19	97.79% (> 100 uM)
	2D6	97.39% (68.18 uM)
	3A4	98.30% (55.63 uM)
Metabolic stability		Human / Mouse / Rat : Low
Solubility		45.3 ug/ml
hERG (patch clamp)		≥ 50uM

Ex-vivo (50mg/kg)-DIO mouse



4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

○ 연차(단계)별 목표 및 내용 총괄

구분	목표	주요 연구개발 내용
0단계	1년차 ('14 6월~ '15 5월)	<ul style="list-style-type: none"> • 비임상 원료(DS) 공정연구 및 생산 <ul style="list-style-type: none"> • 공정개선연구 • DS(API) 분석 및 기준시험법 확립 • DA(API) 물성 연구 • DS(API) 안정성 (장기간속, 가혹) • DS(API) 표준물질합성 및 기준 설정 • 독성 시험용 시료 6Kg합성
		<ul style="list-style-type: none"> • PK 연구 (대사체 연구) <ul style="list-style-type: none"> • 설치류/비설치류 ADME 확보 • in vivo/vitro 주요 대사체 연구 • DDI 연구(CYP 연구) • Microsomal stability/Protein Binding
	• 약효 및 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 약효의 차별화 및 효능 확장 연구
	• 유전독성 시험 진행	<ul style="list-style-type: none"> • 유전독성, 시료검증 및 method validation
1단계	2년차 ('15 6월~ '16 5월)	<ul style="list-style-type: none"> • 비임상 독성 연구 <ul style="list-style-type: none"> • DRF (설치류/비설치류) • 4주 반복투여 독성(설치류/비설치류) • 유전독성 (완료) • safety pharmacology
		<ul style="list-style-type: none"> • 약효 및 작용기전 연구 <ul style="list-style-type: none"> • 약효의 차별화 및 효능 확장 연구 • 병용 투여 효능
		<ul style="list-style-type: none"> • 제제연구 <ul style="list-style-type: none"> • DP 분석 및 기준시험법 확립 • 제제 안정성 시험 및 약물의 제제화 확립
	• DS 생산 (임상용)	<ul style="list-style-type: none"> • 3 kg (약 5,000 Tab.용, 국내용)
	• DP 생산 (임상용)	<ul style="list-style-type: none"> • 3~4 strength 2000 T 목표
	• 임상 1상 IND 승인	<ul style="list-style-type: none"> • 임상 1상 IND 승인

○ 연구개발의 목표 및 성과실적

구분	목표	연구개발 수행내용	가중치 (%)	평가기준	성과실적	자체 평가 (%)
총괄 연구 과제	○ 비임상 원료 공정 개선 및 생산	○ 공정연구 및 대량생산 기술 확보 ○ 기시법 자료 확보 및 안정성 연구 진행 ○ 비임상 원료 합성 진행	40%	○ 수율향상 : ≥30% ○ 기준시험법 확보 ○ 비임상 원료 생산 (6Kg)	○ 수율 : 33.3% ○ 기준시험법 확보 ○ 1차 Pilot 진행 (1.53Kg 생산)	95%
	○ PK 연구 (대사체 연구)	○ in vitro ADME 진행 ○ mouse/rat 대사체 연구 ○ DDI(CYP) 연구진행	20%	○ ADME 자료확보 ○ 대사체 pattern 분석 ○ DDI 연구(CYP 연구)	○ 자료 확보	100%
	○ 약효 및 기전연구	○ DIO 4주 반복실험 진행 (COA 발행원료 사용) - 혈당강하, 인슐린 저항성, 체중감소 효과 확인 - 에너지 소비 및 항상성 확인실험 진행 ○ 비만target 기전 in vitro assay진행(26target 진행)	30%	○ 부작용 개선 효과 확인 ○ 체중 감소 효과 연구 내용 확보 ○ 차별화 포인트 확인	○ 자료 확보	100%
	○ 유전독성 시험 진행	○ KIT 의뢰 진행 - 복귀돌연변이 실험 - 염색체 이상실험	10%	○ 유전 독성 발현 여부	○ 2015.5.8~ (진행 예정)	95%
	계		100%			97.5%
2년 차	○ 비임상 독성 연구 ○ DRF ○ 4주 반복투여 독성 ○ 안정성 평가	○ NOAEL value 확보 ○ safety margin 확보	20% 20%	○ 자료 확보 ○ safety margin : 30배 이상	○ 2주 DRF 반복투여 원료 (rat, monkey) ○ 유전독성 예비시험 ○ 12개월 DS 안정성 평가 완료	40%
	○ 약효 및 기전연구	○ 약효 차별화 확보 ○ 병용투여 효능 확보	10% 10%	○ 1개 이상 차별화 포인트 확보 ○ 자료 확보	○ AMPK activation 기전연구 ○ PPAR alpha activation 연구	60%
	○ 임상용 원료 생산	○ 3kg	10%	○ 3Kg 확보	○ 합성공정연구 (유연물질개선)	30%
	○ 제제 연구	○ 기준시험법 확보 ○ 임상용 DP 생산	15% 5%	○ 자료 확보 ○ 3~4 strength 2000T	○ 11개 부형제 적합성 확인	50%
	○ 임상 1상 IND 승인	○ 임상 1상 IND 승인	15%	○ 승인	-	-
계			100%			41%

1차 년도 ① DS의 합성공정 최적화 ② 대사체 연구(*in vitro, in vivo*) ③ 대사체 구조 Identification 시도 ④ 약효(DIO mouse) ⑤ 항비만 효과 기전 연구-(1) ⑥ 항비만 효과 기전 연구-(2) ⑦ stability 연구용 DS 합성

2차 년도는 ① 비임상 GLP Toxicity 시료 합성(3kg)완료 ② 유연물질 Identification ③ 임상1상을 위한 DS 합성 공정 optimization 연구 ④ PK 연구 ⑤ 특허 11개 외국 개별국 번역문 제출 ⑥ 유전독성 예비시험 ⑦ 2주 반복 GLP-DRF 독성시험(Rat, Monkey) 그리고 기전 확인 시험으로 ⑧ DIO mouse에서 *ex-vivo*(PPAR-gamma Serine²⁷³의 phosphorylation Inhibition) 연구를 진행하였으나 제안당시와 달리 *ex-vivo*에서 PPAR-gamma Serine²⁷³의 phosphorylation 이 억제되는 것을 확인하지 못하였다. 그래서 *in vivo* 약효(glucose lowering effect, insulin 저항성 개선)를 설명할 수 있는 약효기전연구를 시도한 결과, 약효 dose부근(3~10mg/kg dosing) *ex-vivo*결과 AMPK가 활성화 된다는 것을 발견하였다(Report Number UNIST-02). 후속 연구로 ① AMPK upstream signal study(LKB1, CaKKK) ② Direct AMPK activation study ③ 비설치류(monkey)에서의 AMPK activation study(*ex-vivo*) ④ Human primary hepatocytes, adipose에서 AMPK activation study를 수행하였다.

구분	내용	2014					2015										2016							2017												
		6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
총 괄 연 구 과 제	비임상 원료(DS) 공정연구 /생산 /안정성 연구																																			
	PK 연구 (대사연구)																																			
	약효 및 기전연구 (차별화 연구 포함)																																			
	비.임상 독성연구 (rat, monkey)																																			
	약효 및 기전연구 (병용투여 효능확보)																																			
	임상용 원료 생산 (3KG)																																			
	DS(원료) 안정성 시험																																			
	임상용 DP(제제) 생산																																			
	제제 안정성 시험	장기																																		
	가속																																			
IND 자료준비 및 승인																																				

5. 연구결과의 활용계획

- 비록 HD-2356은 transcription activity free인 non-agonist PPAR-gamma ligand로서 PPAR-gamma serine 273-phosphorylation (CDK5 mediated)을 억제하는 효과가 ex vivo 실험에서 재현되지 못하였지만 PPAR-alpha agonism 효과가 있음을 확인한 바 있다. PPAR-alpha agonist가 현재 까지 허가된 약물이 존재하지 않는 질환인 NASH (비알콜성 지방간)이 기전이 될 수 있다고 여러 논문에 주장하고 있다(J.Hepatol. v 62,720-733,2015,World J.Hepatology. v7,1012-1019,2015, Elafibronor, 현재,임상 3상)

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

7. 연구개발성과의 보안등급

- 해당사항 없음

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설 장비 현황

- 해당사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 다른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

- 해당사항 없음

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

- 특허 11개국 해외 번역문 제출 완료 2016년 9월경
- 실적 증빙자료 참조

11. 기타사항

- 해당사항 없음

12. 참고문헌

1. Nature,477(7365): 477-481,2011
2. Am.J.Physiol. Endocrinol Metab 304,E1042-E1052,2013
3. Biomedical Pharmacology v 86,200-209,2013
4. J.Hepatol. v 62,720-733,2015,World J.Hepatology. v7,1012-1019,2015
5. World J.Hepatology.v7,1012-1019,2015
6. Molecular Endocrinology 28: 17561768, 2014
7. Nature Reviews Disease Primers1, Article number: 15019, 2015

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 보건복지부에서 시행한 **보건의료기술연구개발사업(첨단의료기기개발)**의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 보건복지부에서 시행한 **보건의료기술연구개발사업(첨단의료기기개발)**의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.