

농생명산업기술개발사업 최종 보고서

발간등록번호  
11-1543000-003149-01

# 천연물 유래의 아토피 피부염 치료제 개발 최종보고서

2020. 07. 10.

주관연구기관 / 동국제약(주)  
협동연구기관 / 중앙대학교

**농 립 축 산 식 품 부**  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “2017년 농생명산업기술개발사업\_천연물 유래의 아토피피부염 치료제 개발”(개발기간 : 2017. 04. ~ 2019. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 10.

주관연구기관명 : 동국제약 주식회사 (대표자) 오 흥 주

참여연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) 김 원 용



주관연구책임자 : 이 계 완

참여연구책임자 : 이 민 원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	117046-03-3-C G000	해 당 단 계 연구 기 간	2017. 04. 21 ~ 2019. 12. 31	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	천연물 유래(오리나무 추출물)의 아토피피부염 치료제 개발			
	세 부 과 제 명	- 동국제약(주): 아토피 치료제 개발을 위한 안전성/유효성 자료확보 및 대량생산공정 개발 / 과제번호 : 117046-03-3-SB010 - 중앙대학교 산학협력단: 오리나무를 이용한 아토피 악화인자 억제 천연물 소재 개발 및 국소적용 연구 / 과제번호 : 117046-03-3-SB020			
연구책임자	이 계 완	총 연구기간 참여연구원 수	총: 20명 내부: 20명 외부: 명	총 연구 개발비	정부: 750,000천원 민간: 502,000천원 (현금: 65,260천원, 현물: 436,740천원) 계: 1,252,000천원
연구기관명 및 소속부서명	동국제약(주) / 중앙연구소			참여기업명 동국제약(주)	
국제공동연구	상대국명: (해당 없음)			상대국 연구기관명: (해당 없음)	
위탁연구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자: (해당 없음)	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안등급: 일반 사유: 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 따른 분류 (보안과제 및 일반과제)기준에 근거하여 보안과제에 해당되는 내용이 없음으로 일반과제로 판정함
----------------------	---

### 9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

### 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<b>요약</b> - 물오리나무 소재에 대한 효능 평가, 지표성분 탐색, 시험법 검증(MV) 등 CMC 확립을 통해 의약품 규격화 완료하였음 - 물오리나무 소재에 대한 독성 평가 수행 완료하였음 - 아토피피부염 치료제 개발 관련 임상프로토콜 개발 완료 - 위의 성과를 바탕으로 임상2상 IND 신청 완료 하였음	보고서 면수 141page
---	-------------------

**<요약문>**

<p align="center">연구의 목적 및 내용</p>	<p>목적: 안전성 및 유효성이 확보된 천연물 유래의 글로벌 아토피피부염 치료제 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>원료의약품 표준화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품질관리 기준 및 제조 공정 표준화</li> <li>- 지표성분 함량 관리 기준 설정</li> <li>- 성분 프로파일을 통한 동등성 확인</li> </ul> </li> <li>비임상 효력시험             <ul style="list-style-type: none"> <li>- in-vitro/in vivo 아토피피부염 동물모델 효력평가</li> <li>- 아토피 피부염 동물모델에서 오리나무 추출물의 유효성 평가</li> <li>- 활성 성분 확인 및 작용기전 규명</li> </ul> </li> <li>비임상 독성시험             <ul style="list-style-type: none"> <li>- GLP 기관에서의 독성 시험(단회, 반복, 국소독성, 항원성) 수행을 통한 안전성 자료 확보</li> </ul> </li> <li>완제의약품 제형 연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 약물 전달에 최적화된 외용제 제형(연고, 크림, 젤) 연구</li> <li>- 완제의약품 안정성 확보(장기/가속 3개월)</li> </ul> </li> <li>임상 프로토콜 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- CRO 및 외부 전문가를 통한 임상 프로토콜 개발</li> </ul> </li> <li>임상 2상 IND 신청             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 임상시험계획승인 신청서 작성</li> </ul> </li> </ol>				
<p align="center">연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 아토피피부염 치료 기전 규명 관련 논문</li> <li>- 오리나무 추출물의 아토피피부염 관련 특허 출원/등록</li> <li>- 시제품 개발</li> <li>- 임상2상 IND 신청</li> </ul>				
<p align="center">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>[활용계획]</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>안전성과 유효성이 확보된 아토피 피부염 천연물 의약품 개발</li> <li>기능적 단일 compound 분리 및 규명을 통한 경구용 의약품 개발</li> <li>면역과민반응에 의한 피부상태개선용 기능성 식품 개발</li> <li>아토피 완화 기능성 화장품 개발</li> <li>나노캐리어 의약품전달기술을 이용한 다양한 외용제품 개발</li> </ol> <p>[기대효과]</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>아토피 치료제 시장의 성장성에도 불구하고 현재까지 아토피치료제는 거의 모두 수입에 의존하고 있으며 그나마 완치효능이 없어 장기적 복용이 요구되므로 환자 본인은 물론 국가의료비 제정의 절감효과 기대.</li> <li>본 사업을 통하여 개발된 천연물의약품은 시판 첫해인 2023년 35억 원의 국내 매출이 예상되며 2025년에는 360억 원 대의 초대형 제품군으로 성장할 것으로 예상됨.</li> <li>해외수출국 네트워크를 활용하여 2023년에 62억 원에서 2025년 434억 원의 해외 수출 예상됨으로 수출을 통한 국가 경제에 기여 예상.</li> <li>제품발매 후 내수시장 및 해외수출 매출증가로 신규 고용창출 효과 기대(생산 10명, 품질관리 3명, 연구 2명, 영업10명 등 총 25명)</li> <li>국내 자생식물의 고부가가치 창출이 가능하여 재배농가 소득증대 뿐만 아니라 관련 산업의 활성화로 지역경제에 이바지할 것으로 기대.</li> </ol>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	아토피피부염	물오리나무	나노캐리어	외용제	생약
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Atopic dermatitis	Alnus japonica(Thunberg) Steudel	Nanocarrier	Topical formulation	Herbal medicine

## < 목 차 >

<b>1. 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>6</b>
1-1. 연구개발의 개요 .....	6
1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황 .....	11
1-3. 연구개발의 중요성 .....	16
<b>2. 연구수행 내용 및 결과</b> .....	<b>18</b>
2-1. 연구개발 추진 전략 및 방법 .....	18
2-2. 연구개발 추진 체계 .....	19
2-3. 연구개발 추진 일정 .....	20
2-4. 원료의약품 표준화 .....	23
2-5. 비임상 효력 시험 .....	54
2-6. 비임상 독성 시험 .....	72
2-7. 완제 의약품 제형 연구 .....	94
2-8. 임상 프로토콜 개발 .....	108
2-9. 임상 2상 IND 신청 .....	114
<b>3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도</b> .....	<b>117</b>
3-1. 목표 .....	117
3-2. 목표 달성 여부 .....	118
3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후 대책 .....	127
<b>4. 연구 결과의 활용 계획 등</b> .....	<b>129</b>
4-1. 연구 결과의 활용 계획 .....	129
4-2. 기대 성과 및 파급효과 .....	129
<b>붙임. 참고 문헌</b> .....	<b>131</b>

# 1. 연구개발과제의 개요

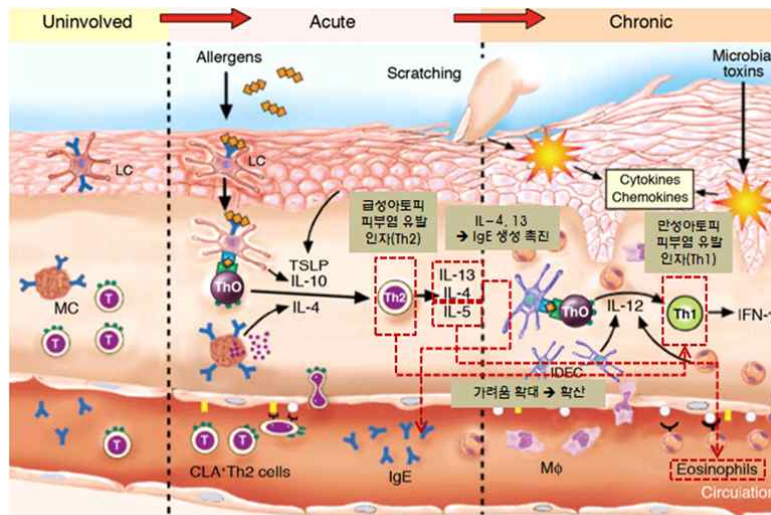
## 1-1. 연구개발의 개요

### 가. 연구개발 개요

#### 1) 질환 개요

- 아토피피부염 (AD, Atopic Dermatitis) 은 가려움을 동반하는 염증성 피부질환으로, 만성적이며 보통은 유아기에 시작됨.
- 유전적인 소인과 환경적인 요소가 모두 관여하는 복합적인 원인에 의하는 것으로 알레르기 염증 질환임. 주로 유·소아에 발생하는 가려움증이 심한 만성·재발성 피부염으로서 최근 발병률이 10-20%까지 급격히 증가함.
- 아토피 피부염 발병에는 Th cell이 중요한 역할을 수행하며, 병변에 T세포가 많이 발현되어 Th2에 의해 분비되는 사이토카인 (cytokine) 이 아토피 발병에 밀접한 관련을 보임. Th2는 IL-4, IL-5, IL-13을 분비하는데 이 중 IL-4, IL-13은 IgE 생성을 촉진하고, IL-5는 호염구 (basophil) 반응을 증가시키며 가려움이 생겨 긁기 시작하면 Th1 세포로 이동하여 만성 질환 유발됨.

[아토피 피부염 작용기전]



(출처 : 생명공학정책센터, 2007)

- 아토피 질환의 과거력이나 가족력이 있는 사람에서 흔히 나타나며 혈청 내에 IgE가 증가되어 있고 성장하면서 알레르기 비염이나 천식을 동반함. 자가면역성 질환의 성격이 짙은 아토피피부염의 발생빈도가 점차 증가하는 추세임.
- 2016년 국민건강보험공단 발표 자료에 따르면 우리나라 2015년 건강보험 적용 인구 기준 전체 AD 환자 93만 3,000명 중 12세 이하 어린이가 거의 절반에 가까운 48.6%를 차지함.
- AD는 일반적으로 IgE의 상승과 관련 되는데, 이는 소위 아토피 행진 (atopicmarch) 과도 관련되는 것으로 밝혀지고 있음. 아토피 행진이란 성장에 따라 아토피질환의 임상적 징후들이 순차적으로 진행되는 현상을 말하며, 이러한 아토피 행진에서 AD의 임상적 징후들은 일반적으로 음식물 알레르기, 천식, 알레르기성 비염과 같은 후차적인 알레

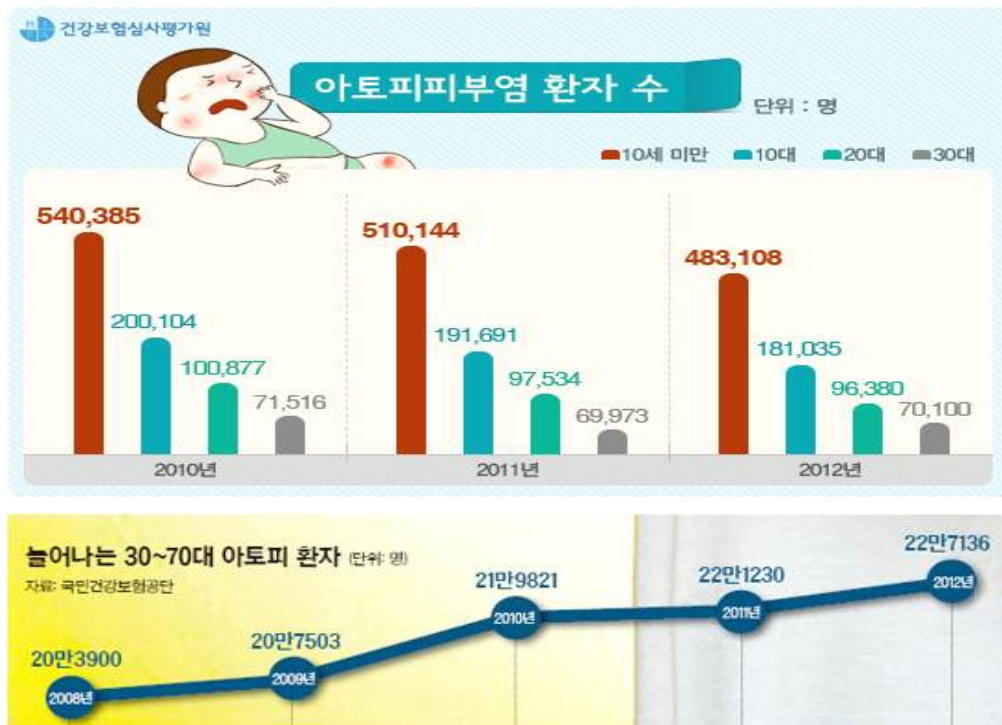
르기 질환의 선행질환으로 알려져 있어 AD의 초기관리가 중요함.

- 아토피 피부염은 **원인과 발생기전이 다양하고 호전과 악화를 반복하는 만성 질환**으로 **장기간의 꾸준한 치료 필요**하며, 재발을 반복하는 질병의 특성, 치료제 부작용에 대한 두려움 등으로 성인이 된 이후까지 중증화, 난치화되는 경우가 많음.

## 2) 아토피 피부염 환자 수

- 국민건강보험공단 진료비 지급 통계에 따르면 2008년부터 2012년까지 **아토피의 연평균 진료 인원은 104만 명**으로 집계되며, 전체 환자의 67%가 만 20세 미만으로 환자 대부분이 영유아와 청소년 이었음.

[아토피 피부염 환자(국민건강보험공단, 건강보험심사평가원 2015년 통계자료)]

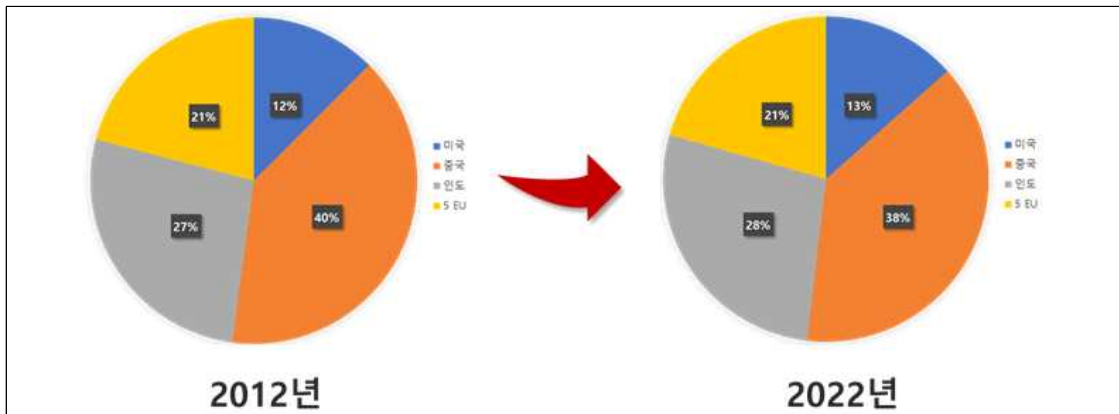


- 또한 건강보험심사평가원의 2008년부터 2012년까지의 통계자료에 따르면 어린이 환자는 2008년 57만9000명에서 2012년 47만 4000명으로 18% 줄어든 반면, 40대 환자는 2008년 4만8000명에서 2012년 5만2000명으로 8.3%, 50대 환자는 3만5000명에서 4만 5000명으로 28%나 상승되어 삶의 질을 떨어뜨리고 있음.
- **세계 아토피 피부염 환자 수는 2022년 1.38억명 예측**(GlobalData 2014).
- 중국은 2022년 4,800만명으로 가장 많은 환자가 발생할 것으로 보이나, 출산률 감소로 인해 환자 수는 마이너스 (연간 증가율 : -0.36%)가 될 것으로 예상됨.
- 미국은 2012년 1,560만명에서 2022년 1,670만명으로 가장 많은 환자가 증가될 것으로 예측 되고 있음(연간 증가율 : 0.71%)
-

### 3) 아토피 치료제 및 문제점

- 일반적으로 널리 사용되고 있는 스테로이드계 아토피 치료제의 경우, 그 효과에 비해 높은 부작용 때문에 시장규모가 계속 축소되고 있음.
- 미국 FDA는 아토피 치료제인 엘리델(Elidel) 및 프로토픽(Protopic)에 대해, 발암성을 우려하는 경고문 부착을 조치하였음.
- 국내 식약처 또한 2세 이하 유아에 대한 투여 금지 및 2차 치료약으로 사용 제한 조치 실시함.

[세계 아토피 피부염 치료제 시장]



(단위 : 백만명)

	2012년	2014년	2016년	2018년	2020년	2022년
미국	15.56	15.79	15.99	16.22	16.45	16.67
중국	49.43	48.86	48.38	48.05	47.82	47.64
인도	33.61	33.87	34.1	34.32	34.53	34.15
5 EU <sup>a)</sup>	26.09	26.22	26.37	26.46	26.52	25.55
합	<b>124.69</b>	<b>124.74</b>	<b>124.84</b>	<b>125.05</b>	<b>125.32</b>	<b>124.01</b>

<출처 : Atopic Dermatitis - Global Drug Forecast and Market Analysis to 2022>

a) 5 EU : 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인, 영국

[아토피 피부염 치료제 및 부작용]

구분	제품명	작용 기전/ 사용 방법/효과	부작용
국소 스테로이드제	- 에로코크림 - 리시놀 연고 - 더마톱연고	- 항염증과 면역억제 작용 - 피부염 발생 부위, 정도, 환자의 나이를 고려 적당한 강도로 사용	부신억제, 스테로이드성 여드름, 다모증, 성장장애, 쿠싱증후군
국소 calcineurin 억제제	- Elide - Protopic	- T 림프구 활성화억제 - 중증도 국소 스테로이드와 유사하나 스테로이드제보다 안전 - 얼굴, 목 등 민감 피부에 적용 - 2차 치료제, 국내 2세 이상 사용권장	입술 마르는 증상, 졸림, 집중력 장애
전신 면역억제제	- 사이클로스포린	- 선택적 치료 (하루 3mg/kg, 4mg/kg)	고혈압, 신장독성 발생 가능
항히스타민제	- 페니라민정 - 보니링정 - 자디텐	- 가려움증 진정에 의한 소양증 감소 - 이로 인한 수면장애 해소	졸음, 어지러움, 식욕증진, 저혈압






## 2) 연구개요 : 천연물 소재를 이용한 아토피 치료제 개발

- 현재 치료제들의 문제점들이 개선된 안전한 치료제 개발에 대한 사회적 요구가 급증함에 따라 장기 치료에도 안전하고 효력이 입증된 천연물 소재를 이용한 아토피 치료제 개발이 절실히 필요함.
- 본 과제를 통해 오리나무 추출물을 이용하여 이미 검증된 in vitro/in vivo을 바탕으로 비임상독성시험 및 임상 2상 시험을 위한 제출 자료를 확보할 예정임.
- 최종적으로 임상 2상 및 3상 시험 및 품목허가를 통해 글로벌 아토피 치료제 천연물 의약품을 개발하고자 함.

### (1) 오리나무

- 오리나무는 자작나무과에 속하며 낙엽교목으로 한국, 일본, 중국에 널리 분포.
- 주요성분으로 diarylheptanoid 계열이 많으며 lupenone, 베타-amylin, L-amyrin, glutenol, taraxerol, betulinic acid, hirsutenone 등 다종의 triterpenoid 외에 베타-sitosterol, heptacosane, 지방족 alcohol, pyrocatechol 계열 tannin 및 flavonoids 화합물이 함유되어 있음.

일반명	오리나무	 
약제명	적양(赤楊)	
학명/과명	Alnus japonica (Thunberg) Steudel / 자작나무과 (Betulaceae)	
약용부위	어린가지, 나무껍질	
한의서 효능	청열강화(淸熱降火) : 열기를 식히고 화기를 가라앉힘	
오리나무 관련논문	<ul style="list-style-type: none"> <li>-대장암세포주에서 적양 추출물의 미토콘드리아/Caspases 경로를 통한 Apoptosis 유도 작용</li> <li>-안검도동(眼瞼跳動)의 치험예</li> <li>-고지방식이 마우스 비만모델에서 감비경신환(4)에 의한 체중감량과 간 지방축적의 변화</li> <li>-청간해주탕(淸肝解酒湯)이 알코올성 간손상 Proteome에 미치는 영향</li> <li>-청간해주탕(淸肝解酒湯)의 항산화 작용에 관한 실험적 연구</li> <li>-청간해주탕(淸肝解酒湯)이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향</li> <li>-청간해주탕(淸肝解酒湯)이 CYP2E1-transfected HepG2 cell에서 알코올유발 세포독성에 미치는 영향</li> <li>-당약을 사용한 알코올성 간 질환의 성공적 치료 2례 : 사례보고</li> <li>-당뇨 처방에 근거한 생약재의 α-Glucosidase 활성 저해 효과 및 이를 활용한 미백 소재 평가법</li> <li><b>-오리나무유래 디아릴헵타노이드 허테논의 T 세포활성억제 및 항아토피 효능연구</b></li> </ul>	
오리나무 소재 일반식품 사용예	식품원료   여명808, 닥터제로, 모닝해파, 해취굿모닝 등	

(2) 개발제품 개념도



나. 연구개발 제품의 핵심기술 및 적용 분야

대상제품	오리나무 추출물을 함유하는 아토피 피부염 치료제 의약품(연고, 크림, 겔 제)
적용 분야	아토피 피부염
핵심기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 국내 오리나무 수피 70% 주정추출물에서 in-vitro, in-vivo 항아토피 효력 확인</li> <li>▪ 항아토피 효능검증을 위한 다양한 동물모델 보유(집먼지진드기 유도모델, DPCP 유도모델)</li> <li>▪ 나노제형기법을 통한 피부 보습력 및 약물전달능 증진법 기술</li> <li>▪ 활성성분 분리 및 구조 동정 연구</li> <li>▪ CMC 연구</li> <li>▪ 천연물 소재를 이용한 상품화 및 마케팅 역량</li> <li>▪ 원천특허 보유 : 해외특허등록 1건, 해외출원 2건, 국내특허등록 5건 등</li> </ul>

1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

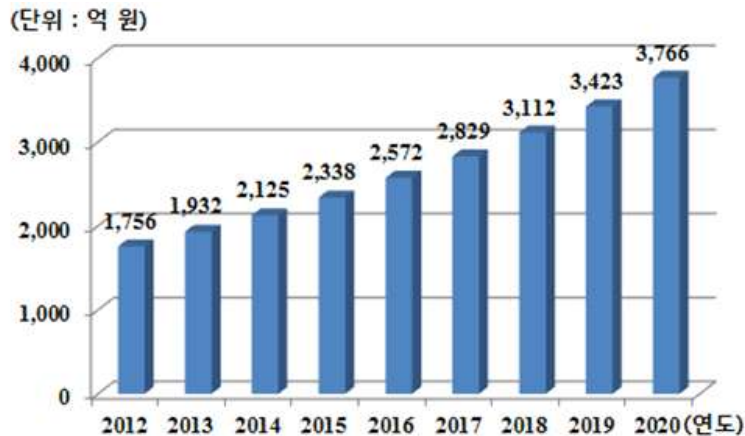
1) 기술현황

- 아토피 및 피부질환 치료제의 다양한 종류가 시판되고 있으나, 대부분 약용성분이 인공적으로 합성된 것을 사용하고 있음. 인공 약용성분은 장기간 사용하는 경우 심각한 부작용을 초래하거나 병원균의 내성을 유발하여 기대하는 치료효과를 얻지 못함.
- 특히 스테로이드계 아토피 치료제의 경우, 효과에 비하여 높은 부작용으로 2세 이하 유아에 대한 투여가 금지되고 있으며, 2차 치료약으로의 사용이 제한되고 있음.
- 가톨릭의과대학 김태윤 교수팀은 CpG-ODN(면역조절제)를 이용한 아토피 치료법을 개발하여 전임상 및 임상연구를 준비 중.
- 피부질환 유전체연구센터에서 한국인 아토피 피부염 환자에 대한 단일염기변이(SNP)를 조사하고 있음.
- 아토피 피부질환의 치료를 위한 약물전달요법은 보습제 또는 스테로이드, 칼시뉴린 저해제 연고등의 외용제 개발 분야가 두드러지며, 보습능과 약물 전달능을 향상시키는데 연구의 초점이 되고 있음.
- 대부분의 항아토피 연고는 흡수가 잘 되지 않아 추가적인 제형 연구가 필수적이며, 최근 한올바이오파마, 한스킨, 영진약품 등의 회사에서는 리포솜 기술을 이용해 제제화한 아토피 치료 제품을 개발 중에 있음.
- 현재 보습능 및 전달능 향상을 위한 고분자메트릭스 기반 크림의 연구가 활발히 진행 중이며, 칼시뉴린 저해제의 제형 내 분산시 기존 제품대비 아토피 치료에 있어 기존 제품대비 치료효과 향상을 보고함.

## 2) 시장현황

- 아토피 피부질환의 치료를 위한 약물전달요법은 보습제 또는 스테로이드, 칼시뉴린 저해제 연고등의 외용제 개발 분야가 두드러지며, 보습능과 약물 전달능을 향상시키는데 연구의 초점이 되고 있음. 아토피 피부염 환자의 증가 및 글로벌 시장 증가에 따라 국내 시장규모도 점차 증가하는 추세를 보이고 있으며, 의약품, 화장품을 포함하여 2020년에는 약 3,700억원 규모에 도달할 것으로 예상됨.

[아토피 피부염 관련 국내 시장 현황 및 전망]



- 하지만 국내 아토피 치료제 시장은 시장 규모 증가에도 불구하고, 아토피 치료에 따른 질환 유병율 감소가 환자 증가율을 상쇄하지 못하는 실정임. 따라서 이를 감소시킬 수 있는 진일보된 아토피 치료제 개발을 위해 국가적 차원의 대규모 지원이 절실히 요구됨.

## 3) 경쟁기관현황

- 한미약품, 유한양행, 종근당 등은 한국인 아토피 피부염의 분자생물학적 특성을 규명하고 진단기준과 새로운 치료법을 연구하여 아토피 이외에 장기이식에 많이 사용되는 약물 cyclosporin A의 제제화에 성공하여 기술 수출을 하고 있음.
- 동아제약은 다래추출물을 이용한 천연물신약 아토피치료제 (DA-9102)를 경구용 제제로 하여 임상 3상을 실시할 예정임.
- 한울제약은 아테노실코발라민을 주성분으로 하는 아토피치료제 개발 (HL-009)로 임상 3상 신청 중에 있음.
- 국내 큐리언트사에서 외국에서 개발된 기존 경구용 천식치료제를 외용제로 개발하여 아토피피부염 치료제로 개발중임. 현재 임상 2상 진행 중(염증 매개물질인 류코트리엔 저해작용으로 약효 발현).
- ㈜스텝디알에서 글루타민을 주성분으로 의약품과 화장품 형태로 1차 상품화해서 시판중이고, 추가적으로 명확한 작용기전을 규명하여 의약품으로 개발 예정.
- 그 외 중외제약, 영진약품, 일양약품 등에서 천연물을 중심으로 한 아토피 치료제 또는 기능성 화장품 개발을 준비하고 있음.

#### 4) 지식재산권현황

- 본 기술/제품과 관련 있는 수행기관이 보유한 지식재산권, 표준화 현황

	특허명	식물자원	등록현황	특허 번호/등록일
1	허수테논을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 개선용 조성물 (Composition for Treating Atopic Dermatitis Comprising Hirsutenone as an Active Ingredient)	오리나무	해외등록 (미국)	US20100190862/ 2011. 09. 06
2	허수테논을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부염 개선용 조성물 (Composition for Treating Atopic Dermatitis Comprising Hirsutenone as an Active Ingredient)	오리나무	국내등록	1010691790000/ 2011. 09. 26
3	허수테논을 유효성분으로 포함하는 면역반응 억제용 조성물 (Composition for Suppressing Immune Response Comprising Hirsutenone as an Active Ingredient)	오리나무	국내등록	1010724260000/ 2011. 10. 05
4	허수테논 화합물의 안정화를 위한 제형 (Formulation for Stabilization of Hirsutenone Compound)	오리나무	국내등록	1014751100000/ 2014. 12. 15

- 본 기술/제품과 직접적 경쟁관계에 있는 국내기관(기업), 지식재산권, 표준화 현황

	특허명	특허 번호/등록일	출원인	발명자
1	오리나무 유래 디아릴헵타노이드계 화합물을 포함하는 항산화 및 간보호용 조성물 (Antioxidative and Hepatoprotective Composition Containing Diarylheptanoids from <i>Alnus japonica</i> )	1009873030000 / 2010. 10. 06	주식회사 알바이오	라정찬, 김영호, 손동
2	물오리나무 줄기 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 간독성 질환 예방 및 치료용 조성물 (liver cytoprotective composition comprising an extract from the stem barks of <i>alnus hirsuta</i> and compounds isolated therefrom)	1010847330000 / 2011. 11. 11	한국과학기술연구원	김형자, 진창배, 이용섭, 정서윤
3	바이러스 억제제로서 유용한 디아릴헵타노이드계 화합물 (Diarylheptanoid for viral inhibitor)	1009504280000 / 2010. 03. 24	주식회사 알바이오	라정찬, 김영호, 권혁준, 원후동

#### 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

##### 1) 기술현황

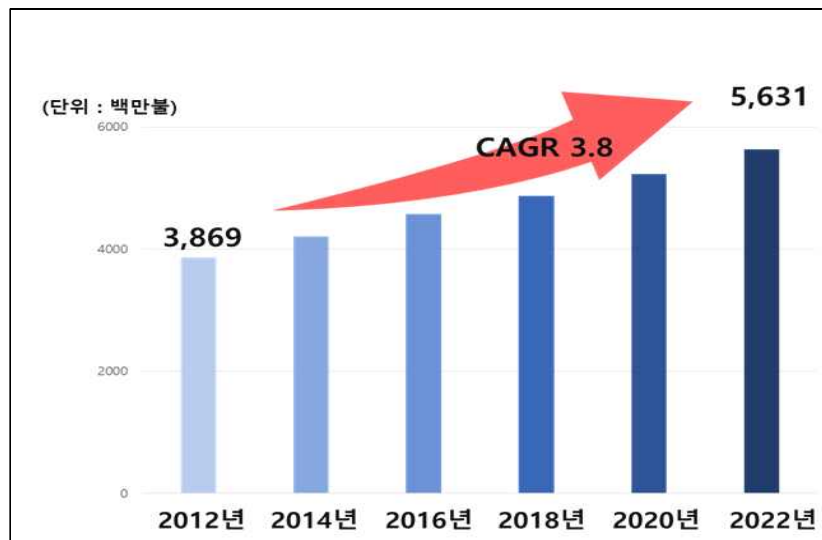
- 미국, 일본 등 선진국을 중심으로 아토피 피부염의 치료를 위한 치료제 개발이 활발히 진행되고 있음. 또한 신규 고효능 합성과 생물유래물질의 개발 및 응용연구에 집중하고 있으며, 아토피 피부염의 발병 메카니즘 규명을 위한 많은 연구개발이 추진 중.
- 미국 여러 대학의 공동연구로 아토피 피부염 환자에서 포도상구균의 사멸을 유도하는 항균 펩타이드 (cathelicidins와 bata defensins) 의 함량이 감소하는 현상을 발견하여 이를 보충시키는 방법으로 아토피의 개선 방법 연구.
- 일본 히로사키대 피부과팀에서 염증관련 단백질인 NF-kB와 결합하는 유전자와 유사한 인공 DNA를 개발하여 NF-kB의 작용을 억제시키는 원리를 연구함.

- 일본 기린맥주사는 알레르기 증상을 강력히 완화하는 유산균을 발견함.
- 비피더스 유산균을 이용하여 아토피 피부염 예방기술을 개발하고 2006년 10월 인체의 면역 불균형이 아토피 발생과 관련이 있다는 사실을 토대로 유아들의 장 면역 기능을 활성화하는 비피더스 유산균을 개발함.
- 포휴먼텍은 미국 예일의대와 2007년 7월 '자가면역 질환 치료제 공동연구'를 체결하고 자가면역억제 단백질 'FHT-CT4'의 치료 메카니즘을 규명하는 것으로, 인체 유래 물질 전달 펩타이드와 몸속 면역신호를 관장하는 T 세포와 FHT-CT4의 기능을 연구. 'FHT-CT4' 개발로 2006년 5월 Nature Medicine지 게재되었으며, Cyclosporin A 및 FK-506이 T 세포에 특이적으로 작용하지 않는 약점을 보완할 수 있는 방법을 공동으로 개발하고 있음.

## 2) 시장현황

- 아토피 피부염 치료제의 세계 시장 규모는 2012년 39억 달러에서 10년 동안 연평균 성장률(CAGR)은 3.8%로 2022년에는 56억 달러 규모로 성장할 것으로 예상됨.

[글로벌 아토피 치료제 시장전망(Global drug forecast and market analysis to 2022)]



- 지역별로는 미국(35%)이 가장 큰 비중을 차지하고 있으며, 인도(16%), 일본(13%), 독일(11%) 등이 주요 시장을 형성하고 있음
- 유형별로는 systemic agents와 topical moisturizer/emollients 시장이 가장 큰 규모를 형성할 것으로 전망됨. 특히 interleukin inhibitor 분야는 2016년 sanofi와 Regeneron의 'Dupilumab'이 주요 7개국에서 판매되기 시작하면서 급속도로 성장하여, 2022년까지 전체 시장의 13.3%를 점유할 것으로 예상됨.

## 3) 경쟁기관현황

- 세계적인 피부과 전문회사인 스티펠 (Stiefel Laboratories) 사의 아토피성 피부염 치료제

인 미믹스 크림(MimyX Cream)이 2005년 미 FDA에서 판매 승인을 받았으며, 국소적용 비스테로이드 치료제로서 모든 연령이 사용가능함. 피부 가장 외곽층인 각질(stratum corneum)의 구조와 성분을 회복시킴으로써 아토피를 치료하는 새로운 접근 방식임.

- 사노피, 노바티스, 화이자 등 글로벌 제약회사들이 수천억원의 개발비를 투입하면서 2022년에 56억달러(약6조7천억원)로 예상되는 아토피피부염 시장 선점을 위해 제품연구를 하고 있음
- 사노피의 듀필루맵(Dupilumab)은 중등도 및 중증 아토피피부염의 주요 염증매개물질인 IL-4와 IL-13의 억제 기전을 통해 효과를 발현하며, 2017년 FDA 승인을 앞두고 있음. 아토피피부염 치료제의 최초 항체의약품임.
- 화이자에서는 외용연고로 유크리사를 개발하였고, 염증생성에 관여하는 효소인 PDE-4를 억제하여 IL-4를 억제하여 효과를 발현함. 2016년 FDA 승인을 받았음.
- 노바티스에서 경구제로 만성 피부염증 치료제를 개발 중에 있으며, 염증 매개물질인 Histamine4 수용체 길항작용으로 피부염증 억제 효능을 보임.

#### 4) 지식재산권현황

- 본 기술/제품과 직접적 경쟁관계에 있는 국외기관(기업), 지식재산권, 표준화 현황

	특허명	특허 번호/ 등록일	출원인	발명자
1	Antioxidative and hepatoprotective compositions containing diarylheptanoids from alnus japonica (알누스 동백나무로부터DIARYHEPTANOIDS를 포함하는 항산화의 및 간보호의 조성물)	12774761/ 2010.05.06 (출원)	Rnl Bio Co., Ltd.	RA Jeong Chan, KIM Young Ho, SOHN Dong Hwan
2	Aジアリールヘプタノイド誘導体を有効成分とするメラニン生成抑制劑と皮膚外用劑、飲食品への応用 (DIARYHEPTANOIDS유도체를 유효성분으로 하는 멜라닌 생성 억제제와 피부 외용제, 음식품에의 응용)	JP 2006-137679 A/ 2011.09.02 (등록)	ICHIMARU PHARCOS Co., Ltd.	秋久 俊博 외
3	Diarylheptanoid compound and its preparation method and use (DIARYHEPTANOIDS 화합물 및 그 제조 방법과 응용)	CN 2014-107420 88/ 2014.12.08 (공개)	GUANGDONG HOSPITAL OF TRADITIONA L CHINESE MEDICINE	LU CHUANJIAN, CHEN SHAODAN, ZHAO RUIZHI, GAO JINTAO
4	Diarylheptanoide derivative and pharmaceutical composition comprising the same (DIARYHEPTANOIDS 파생물과 동일한 것을 포함하는 약학 조성물)	EP 0717027 B1/ 1999.05.12 (등록)	KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA	Yamazaki, Ryuta, Matsuzaki, Takeshi, Aiyama, Ritsuo, Hashimoto, Shusuke, Yokokura

### 1-3. 연구개발의 중요성

#### 1) 사회적 중요성

- 최근 산업화, 도시화, 전문화된 사회 구조로 인한 생활환경의 변화·환경오염성 물질의 출현으로 전형적인 오염 접촉형 질환인 아토피피부염, 접촉피부염 등의 **급격한 질환발생율의 증가 및 이에 따른 의료비 상승 등의 사회적 문제가 심화되고 있음.**
- 또한 노인인구 증가, 사회경제적 성장에 의한 생활환경 및 면역체계 변화 등으로 오염 접촉형 피부질환에 대한 **예방 및 관리를 위해 국가 차원의 종합대책이 요구됨.**
- 10세 미만의 소아에게서 아토피가 발생할 확률이 높지만, **10~30대까지도 꾸준히 아토피 환자가 증가되고 있음,**
- 따라서 아토피 피부염은 **질환 환자의 혼자만의 문제가 아닌 가족 구성원의 삶의 질을 떨어뜨릴 수 있음에 따라 안전하고 효율적인 치료제 개발이 중요함.**

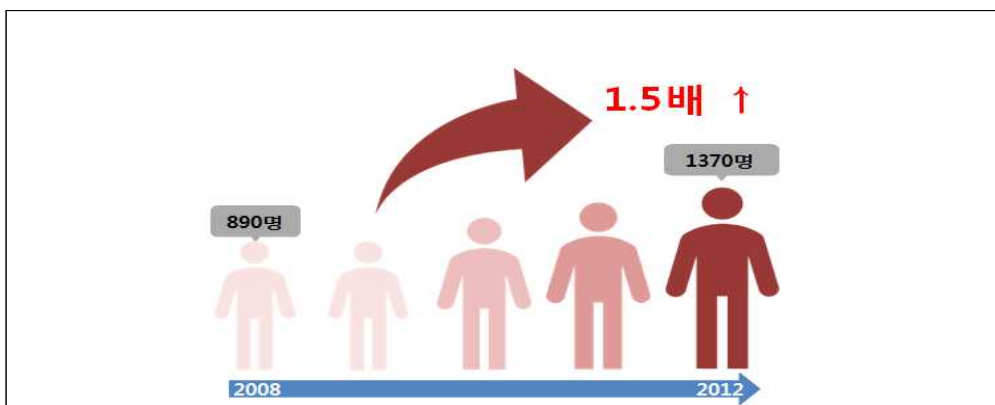
#### 2) 경제적 중요성

- **국내의 아토피 피부염 입원 환자수는** 2008년 896명이었으나 2012년에는 1,367명으로 **1.5배 증가함.**

[2012년 연령대별 ‘아토피 피부염’ 진료현황, 국민건강보험공단]

(단위: 천명, %)

구분	계	9세 이하			10대	20대	30대	40대	50대	60대	70세 이상
		소계	0-4세	5-9세							
전체	979 <100>	474 <48.5>	321 <32.8>	153 <15.7>	181 <18.5>	97 <9.9>	59 <7.1>	48 <5.2>	35 <4.6>	29 <3.0>	18 <3.3>
남성	466	247	170	78	84	39	23	19	16	14	8
여성	513	227	151	75	97	58	36	29	19	14	10



- 세계 아토피 피부염 치료제 시장 규모는 **2012년 39억 달러에서** 10년 동안 연평균 성장률(CAGR)은 3.8%로 **2022년에는 56억 달러 규모로 성장 예상.**
- 현재 아토피 피부염 시장은 초기에 진입하였던 치료제(**Elidel, Protopic**)가 **장기가 사용에 따른 부작용에도 불구하고** 대등한 치료제가 없어 **시장을 장악하고 있으며 전**



량 수입에 의존하고 있어 국가 의료재정에 손실을 가짐.

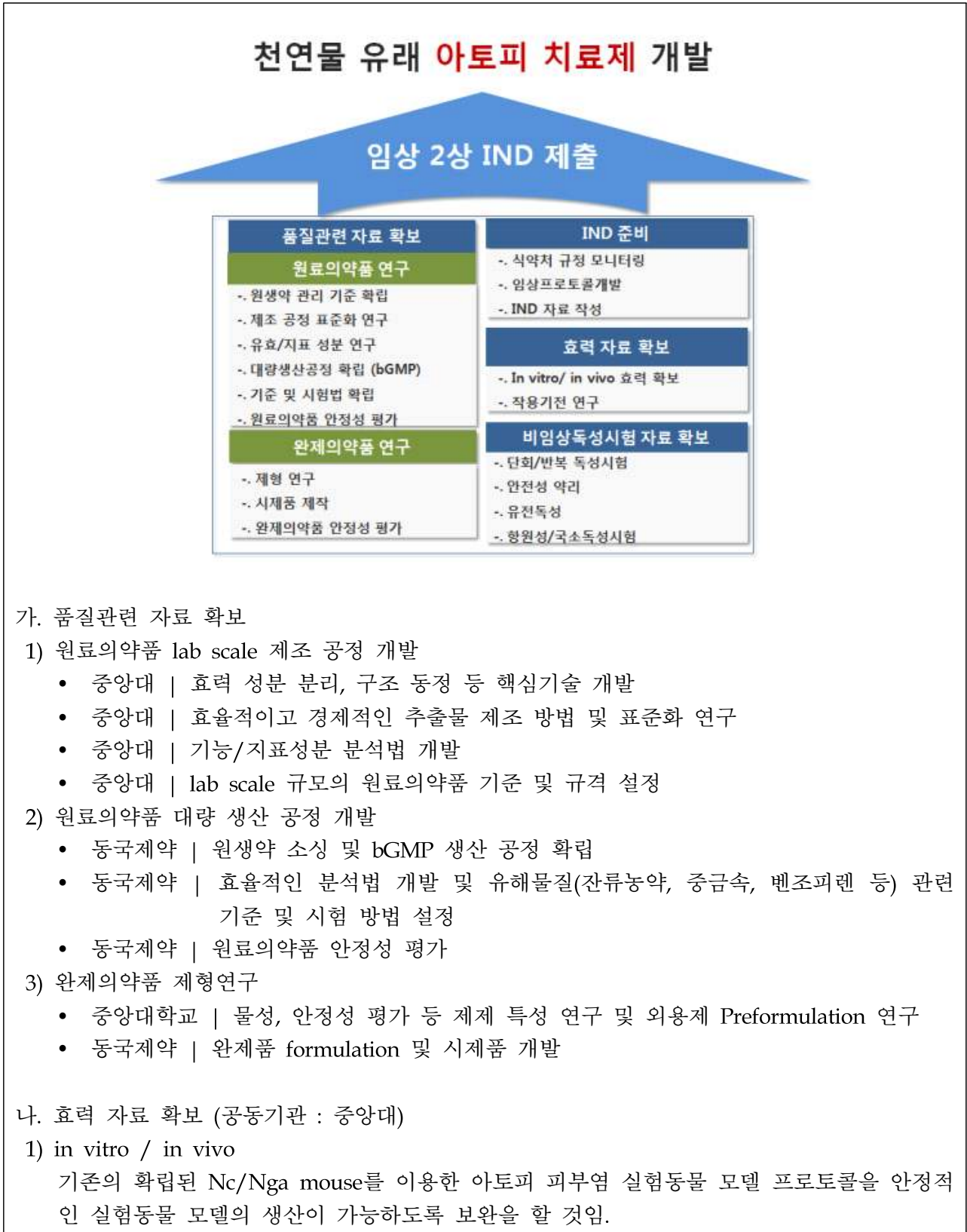
- 이에 따라 천연물 유래 소재를 활용한 아토피 피부염 치료제는 장기간 사용에 따른 부작용이 없어 안전하게 사용할 수 있을 것으로 천연물 유래 치료제 개발이 중요하며 국가 차원에서 하루빨리 개발되어야 할 영역 이라고 판단됨.

3) 기술적 중요성

- 현재 아토피피부염의 피부장벽 기능 개선을 위한 보습제 사용은 가려움증을 완화하는 유익한 효과를 갖고 있음이 밝혀지고 있어 장벽기능과 가려움증은 서로 밀접하게 관련되어 있음이 확인되었음.
- 아토피성 피부염의 치료 및 관리를 위해 대부분의 피부과 진료 시 피부 표면의 수분을 유지시켜 주는 보습제와 함께 염증 반응을 호전시키기 위한 스테로이드 호르몬, 즉, 국소피질호르몬 제제를 동시에 처방하는 것이 일반적임.
- 그러나 국소 부신피질호르몬을 장기간 사용할 경우 피부 위축, 혈관 확장, 색소 소실 및 팽창선조의 발생 등 다양한 피부 부작용을 야기 시킨다는 문제점이 있음. 따라서 이러한 부작용을 나타내지 않으면서 항염증 효능을 보이는 아토피 치료제 원료나 제약 개발 필요성이 제기되고 있음.
- 현재 국내의 아토피 피부질환 치료제로써 판매되고 있는 제품의 경우 외국의 효능 원료를 수입판매하고 있기 때문에 외국 기술에 전적으로 의존하고 있어 그에 따른 원료수입에 따른 비용 문제를 고려하였을 때 국내 기술을 이용한 제품의 개발이 필요한 시점임.
- 따라서 본 과제를 통해 과학적인 효력 검증, 일관적인 품질관리 기준 확립, 비임상 독성시험을 통한 안전성 및 임상적 유효성을 확보하여 FTA 시대와 고환율시대에 국가적 이익을 창출할 수 있는 천연물 의약품을 개발할 예정임.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 연구개발 추진 전략 및 방법



## 2-2. 연구개발 추진 체계

### ○ 추진 체계



### ○ 편성도

주 관 기 관	참여연구원	담당기술내용
동국제약(주)	총괄책임자(이계완) 외 7명	-유연물질/불순물 분석 -독성시험용 시료 제조 -대량생산 -공정확립 (원료/완제) -비임상 독성시험 -기준 및 시험방법 확립 -안정성 시험 -임상프로토콜개발 -IND 자료 작성/제출
참 여 기 관 (수행기간:17.05.01 ~ 19.04.30) 중앙대학교 산학협력단	참 여 연 구 원 개발책임자(이민원) 외 14명	
담당 기술개발 내용		
- 원생약 품질관리 기준 설정 - 원료의약품 제조공정 확립 (lab scale) - 원료의약품 유효(지표) 성분 분리 및 구조 동정 - 원료의약품 품질동등성 확보를 위한 성분 프로파일 설정 - 원료의약품 기준 및 시험방법 설정 - 동물모델별 in-vivo 효능평가 및 기전연구 - 다양한 외용기제 처방 연구 - 피부 적합성 및 경피 전달능 평가 평가 - 임상 프로토콜 개발		

### 2-3. 연구개발 추진 일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	원생약관리기준 확립				■	■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	이민원 (중앙대산학 협력단)
2	Lab scale 제조공정 확립				■	■	■	■	■	■	■	■	■	5,000	
2.1	유효/지표성분 분리				■	■	■	■	■	■	■	■	■	5,000	
2.2	유효/지표성분 구조 동정 및 도출							■	■	■	■	■	■	5,000	
2.3	유효/지표성분 확립										■	■	■	2,500	
2.4	제조 공정 표준화				■	■	■	■	■	■	■	■	■	2,500	
2.5	기준 및 시험방법 설정 (분석법 MV)					■	■	■	■	■	■	■	■	5,000	
2.6	성분프로파일 연구											■	■	5,000	
2.7	지역별 원생약 확보 및 분석									■	■	■	■	76,000	이계완 (동국제약)
3	대량생산 공정											■	■	15,000	
4	효력/작용기전 연구 (in vitro/ in vivo)				■	■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	이민원 (중앙대산학 협력단)
4.1	in vitro model 효능 (항산화 능력)					■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	
4.2	in vitro model 효능 (비만세포 활성화 능력)							■	■	■	■	■	■	10,000	
4.3	in vitro model 효능 (Th1&Th2 사이토카인)								■	■	■	■	■	10,000	
4.4	기능성 외용제 (f-DDS) 의 설계 및 평					■	■	■	■	■	■	■	■	10,000	
5	비임상독성시험/ CRO 선정 및 식약처 미팅										■	■	■	-	이계완 (동국제약)

2차 년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	원생약관리기준 확립														25,000	이민원 (중앙대산학 협력단)
2	Pilot scale up 연구														25,000	
3	대량생산공정 확립														5,000	이계완 (동국 제약)
3.1	bGMP 생산														20,000	
3.2	기준 및 시험방법 확립														5,000	
3.3	유연물질분석 (벤조피렌 등)														2,000	
3.4	원료의약품 안정성 평가														2,000	
4	비임상독성시험														93,000	
4.1	CRO 선정														-	
4.2	단회 투여독성시험														-	
4.3	반복 투여독성시험														-	
4.4	유전독성 시험														-	
4.5	항원성 시험														-	
4.6	국소독성시험														-	
5	in-vivo 효능 확인 (model 쥐 구축 및 SCORAD 및 TWEL 수치 분석)														46,000	이민원 (중앙대산학 협력단)
6	in-vivo 효능 확인 (사이토카인 분석)														46,000	
7	외용제 내 리포좀 시스템 도입														20,000	
8	제형별 약물 방출 및 경피 전달능 비교 분석														26,000	

3차 년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	대량생산공정 재현성 확보														14,000	이민원 (중앙대산학 협력단)
2	성분 프로파일 연구														7,000	
2.1	계질별 원생약 확보 및 분석														7,000	
3	시제품의 제제특성 평가														24,000	
3.1	독성검사 (LDH & MTT 분석)														24,000	
3.2	독성검사 (hERG 분석)														24,000	
3.3	API 제조 (안정성 시험 및 독성 시험용)														15,000	이계완 (동국제약)
4	반복 투여독성시험 (설치류, 비설치류)														50,000	이계완 (동국제약)
4.1	설치류 반복투여 회복 시험														30,000	
4.2	비설치류 반복투여 회복 시험														12,000	
4.3	설치류/비설치류 DRF 시험														7,000	
4.4	안전성 약리														20,000	
5	원료의약품 안정성 평가														2,000	
5.1	완제의약품 안정성 평가														2,000	
6	임상프로토콜 작성														-	
6.1	임상2상 IND filing 및 제출														-	

## 2-4. 원료 의약품 표준화

### 가. Lab scale 제조공정 표준화 설정

- 1) 한약(생약)은 특성상 기원, 생육환경, 산지(야생 또는 재배 포함), 채집시기 등에 따라 구성 성분의 조성 및 함량이 변동적이며, 구성성분과 약효간의 상관관계도 명확하게 밝혀져 있지 않으므로 품질관리에 있어 화학 의약품과는 상당한 차이가 있음.
- 2) 이에 따라, 품질일관성 확보 차원에서 각 산지별 오리나무 수피를 채집하고 HPLC를 활용하여 구성성분의 분포와 지표성분의 함량 변화 등을 모니터링한 결과를 원생약 관리 기준 확립에 활용함.
- 3) 제조공정 표준화 설정 연구를 위하여 추출용매 (Methanol, Prethanol-A 등), 추출 온도 (room temperature, 70°C 등), 추출 시간(3시간, 3일 등), 추출 횟수(1~3회), 추출 방법(침지, 환류 등) 및 분획 여부 (ethyl acetate 등)을 달리하여 추출 결과를 비교하여 batch별 동등성, 제조 재현성 및 제조 경제성 등을 고려하였을 때, 70% Prethanol 용매를 이용한 70°C에서의 환류추출이 가장 적합한 추출 공정으로 판단되어 조건을 확립함.

표 1. 용매 조건별 오리나무 추출물의 최종 수율 (%)

	H <sub>2</sub> O	100% MeOH	50% Prethanol	70% Prethanol	100% Prethanol	70% Prethanol 환류
오리나무 가지	3.5	10.8	8.9	10.5	8.1	12.4
오리나무 잎	5.9	32.2	37.2	34.9	25.2	35.4

표 2. 오리나무추출물에 포함된 지표성분의 함량 (%)

	compound	100% MeOH	50% Prethanol	70% Prethanol	100% Prethanol	70% Prethanol 환류
오리나무 가지	oregonin	15.2	7.8	10.1	11.3	8.4
	hirsutenone	1.81	2.01	1.49	1.63	1.48
오리나무 잎	oregonin	6.3	3.1	3.0	6.4	4.0
	hirsutenone	0.7	0.81	0.47	0.94	0.42

- 4) 또한 지역별 (충청, 경남) 원생약을 확보하였음. 이를 최적화된 추출공정을 통해 추출한 후 원물 대비 수율을 구하고, HPLC를 통해 지표성분의 함량평가를 진행하여 비교 및 분석함.

표 3. 지역별 물오리나무 추출물의 수율 및 지표성분의 함량 (%)

산지	부위	추출조건	수율	oregonin 함량	hirsutenone 함량
국내산	물오리나무 끓은 가지	70% Prethanol	8.88	13.53	1.57
경남 (함양)	물오리나무 잎	70% Prethanol	18.02	6.97	0.29
	물오리나무 가지	70% Prethanol	8.61	8.85	0.65
	물오리나무 잎	70% Prethanol	10.78	15.51	0.32
충청 (제천)	물오리나무 잎	70% Prethanol 환류	22.44	14.58	0.64
	물오리나무 가지	70% Prethanol	7.47	15.87	0.56
	물오리나무 가지	70% Prethanol 환류	10.73	15.49	0.63

나. 지표 식물 소재 대체 소재 연구

- 1) 지표 식물 소재의 대체 소재 연구를 위해 오리나무와 물오리나무의 비교 연구를 실시함. 오리 나무는 생태학적 요인으로 인해 자생력이 약하고 개체수가 적기 때문에 이용 가치가 낮으므로 사업화 소재로는 적합하지 않음. 따라서 같은 동속 식물인 물오리나무의 대체 가능성을 평가함.
- 2) 확립된 TLC 및 HPLC 분석조건을 이용해 지표성분의 함량 및 선행연구를 통해 분리한 보유 화합물을 비교한 결과 오리나무를 물오리나무로 대체하는 것에 문제가 없음을 확인함.



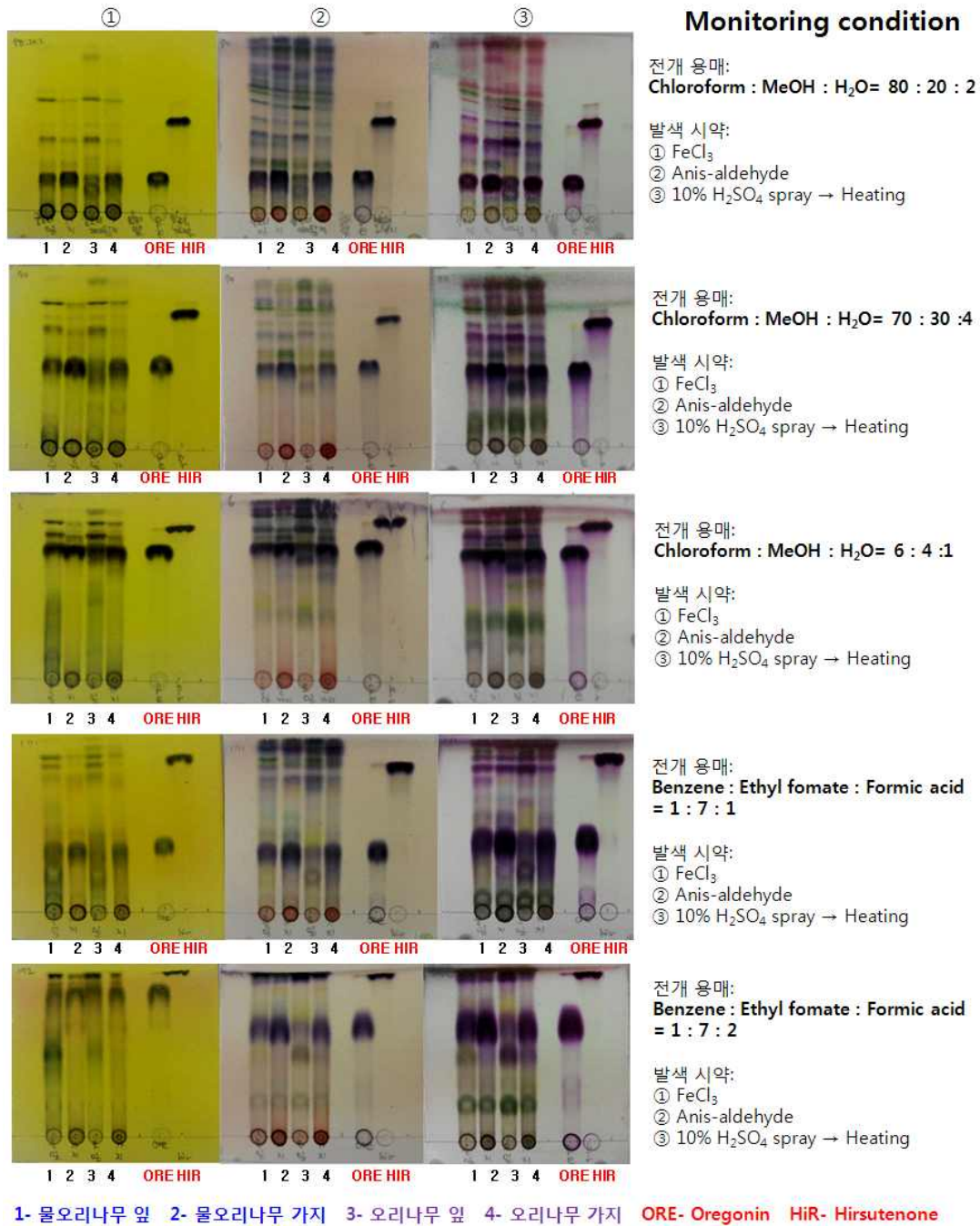
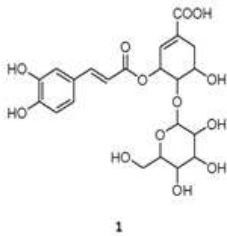


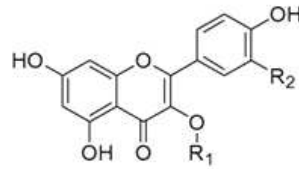
그림 1. 물오리나무와 오리나무 및 지표성분(oregonin, hirsutenone)의 비교 TLC

3) 원료 표준화 연구의 일환으로 선행연구를 통해 규명된 물오리나무 내 단일 화합물 20종을 비교하여 대체 식물로써의 가능 여부를 확인하였으며 생태적으로 다수의 균락을 이루고 국내에 많이 자생하는 물오리나무가 오리나무를 대체할 수 있는 식물 자원 소재임을 확인하였음.

Caffeoyl shikimate

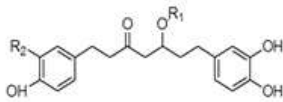


Flavonoid



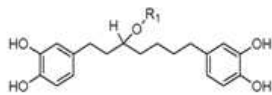
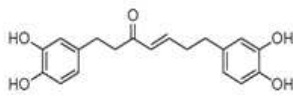
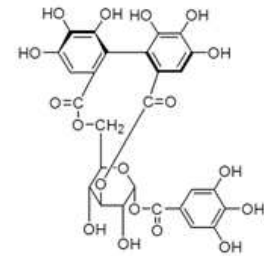
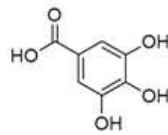
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
11	Coumaroyl rhamnose	H
12	H	OH
13	Rhamnose	OH
14	Gal	OH
15	GlcUA	OH
16	GlcUA-methyl ester	OH

Diarylheptanoid



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
2	(2,3-digalloyl)-xylose	OH
3	Xylose	OH
5	H	OH
9	Xylose	O
10	Xylose-2-MeBu	OH

Hydrolysable tannin



	R <sub>1</sub>
6	H
7	Glucose
8	Xylose

그림 2. 물오리나무로부터 분리된 단일 화합물의 구조

다. 지표성분의 분리와 구조 동정 및 확립

- 1) 물오리나무 추출물을 Sephadex LH-20 컬럼에 로딩한 후 TLC chromatography로 분석하여 fraction 별로 나누는 후 다시 MCI gel CHP 20P 컬럼에 로딩하여 지표성분인 oregonin (3) 과 hirsutenone (4)을 분리함.

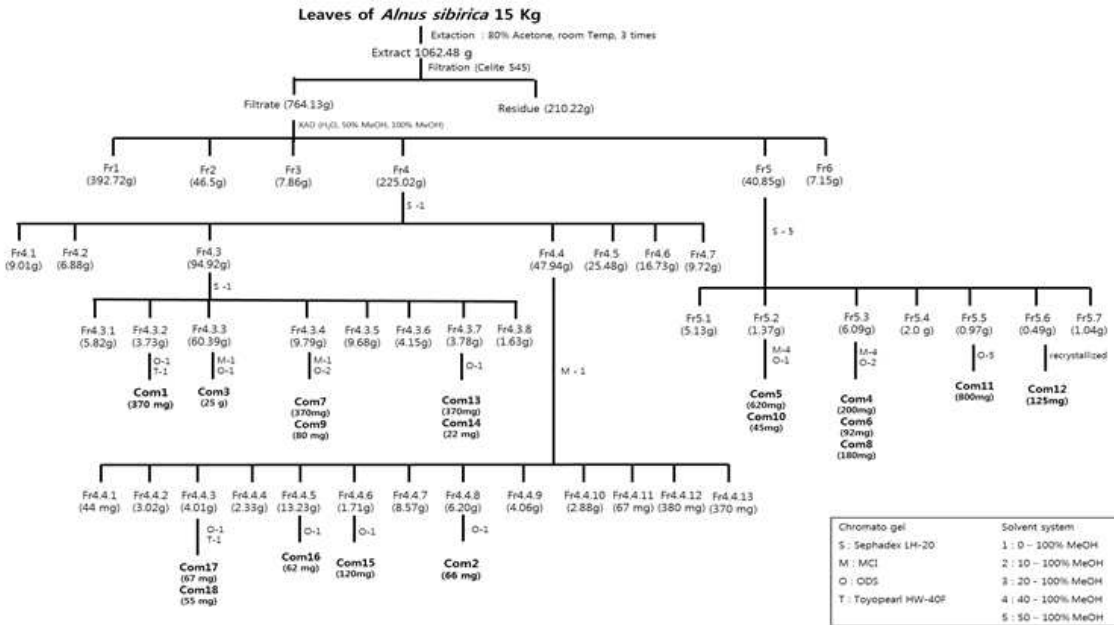


그림 3. 물오리나무의 분리 flow chart

- 2) <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR을 이용하여 분리한 성분을 분광학적 분석법으로 분석하여 구조를 동정함.

(가) Oregonin(3)

- ① <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) : δ 6.74-6.71 (4H in total, H-2', 2'', 5', 5''), 6.53-6.50 (2H in total, m, H-6'', 6'), 4.31 (1H, d, J=7.8Hz, xyl-1), 4.14(1H, m, H-5), 3.86 (1H, dd, J=11.4, 6.1Hz, xyl-5), 3.54 (1H, m, xyl-4), 2.83-2.52 (8H in total, H-1, 2, 4, 7), 1.80-1.76 (2H in total, m, H-6).

- ② <sup>13</sup>C-NMR (75MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) : 표 4 참조

(나) Hirsutenone(4)

- ① <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) : δ 6.92-6.85 (1H in total, m, H-5), 6.78-6.74 (4H in total, m, H-2', 2'', 5', 5''), 6.57-6.53 (2H in total, m, H-6', 6''), 6.11 (1H, d, J=16.0Hz, H-4), 2.84-2.45 (8H in total, m, H-1, 2, 6, 7).

- ② <sup>13</sup>C-NMR (75MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) : 표 4 참조

표 4. <sup>13</sup>C-NMR data of oregonin and hirsutenone

Carbon number	Oregonin	Hirsutenone
Heptane moiety		
C-1	29.7	29.9
C-2	46.1	42.0
C-3	210.6	210.3
C-4	48.2	131.1
C-5	76.1	147.5
C-6	38.3	34.8
C-7	31.4	34.0
Diphenyl moiety		
C-1'	133.9	133.4
C-1''	134.9	133.7
C-2'	116.1	115.9
C-2''	116.2	116.0
C-3'	145.9	145.6
C-3''	145.9	145.6
C-4'	144.0	143.8
C-4''	144.3	143.9
C-5'	116.4	116.1
C-5''	116.5	116.1
C-6'	120.5	120.3
C-6''	120.4	120.2
Sugar moiety		
C-1	104.0	
C-2	74.6	
C-3	77.5	
C-4	70.8	
C-5	66.6	
C-6	xyl	

라. 원료의약품 기준 및 시험 방법 설정

- 1) Thin layer chromatography를 통해 지표성분을 확인함. Silica gel이 coating된 plate에 추출물을 spotting한 후 chloroform : MeOH : H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4 비율의 전개용매에 전개한 후 FeCl<sub>3</sub>, anis-aldehyde, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 발색시약을 이용하여 각각의 발색 양상을 확인함.
- 2) 또한 HPLC를 이용하여 함량 및 순도 시험의 분석조건 가이드라인을 확립함. C18 column을 이용하였으며 0.2% Acetic acid in water와 Acetonitrile을 이동상으로 280nm 파장에서 detection함. 이를 통해 함량 및 순도 분석을 진행함.

표 5. HPLC 분석 조건

HPLC conditions			
Mobile phase	A) 0.2% Acetic acid in water		
	B) Acetonitrile		
Gradient profile	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	90	10
	10.0	90	10
	12.0	25	75
	24.0	40	60
	45.0	100	0
Flow rate	1 mL/min		
Column temp.	24 °C		
Injection vol.	10.0 µL		
Oregonin RT	21.9min		
Hirsutenone RT	30.7min		

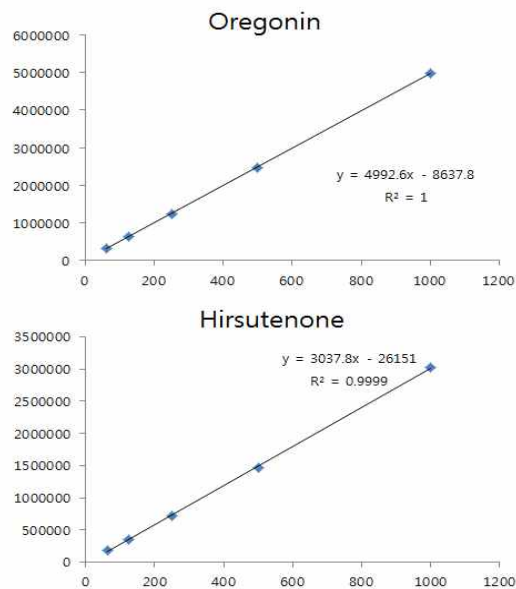


그림 4. 지표 성분의 직진성

- 3) Oregonin 및 Hirsutenone에 대하여 추가적으로 LC/MS 분석 예정이며, 이들 성분 이외에 성분프로파일의 핵심 성분으로 선정하였던 hyperoside(1), irsutanonol(3), rubranoside B(4) 성분에 대하여 LC/MS 및 NMR 분석을 통하여 일정한 프로파일링 확보할 수 있도록 추가 연구 예정임

3) 최종 원료 의약품 기준 및 시험방법 확립(별첨 규격)

**물오리나무 70%에탄올건조엑스(15~25→1)**

*Alnus sibirica Fisch. ex Turcz 70% Ethanol Extract*

이 약은 물오리나무 *Alnus sibirica Fisch. ex Turcz* (자작나무과 Betulaceae)의 가지(별규)를 정선하여, 70% 에탄올로 추출한 건조엑스이다. 이 약은 정량할 때 건조물에 대하여 오레고닌 (C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub> : 478.495) 13.5% 이상을 함유한다.

**제조방법**

이 약은 물오리나무 *Alnus sibirica Fisch. ex Turcz*의 가지를 정선한 후, 원생약 중량 대비 6 배량의 70% 에탄올을 사용하여 70℃에서 3시간 환류 추출한 다음 감압여과한다. 잔사에 70% 에탄올을 원생약 중량 대비 6 배량을 가하여 70℃에서 3시간 환류 추출한 다음 감압여과한다. 여액을 모두 합하여, 감압 농축하고 건조한다. 이 약 1 g은 원생약 15.2 ~ 25 g에 해당 한다 (수율 : 4.0 ~ 6.6%).

**확인시험**

1) 박층크로마토그래프법

이 약 5 mg을 달아 50% 에탄올 1 mL에 녹인 액을 검액으로 한다. 아하 별첨규격 「오리나무 가지」의 확인시험법 중 박층크로마토그래프법에 따라 시험하고 검액에서 얻은 여러 개의 반점 중 1개의 반점은 표준액에서 얻은 보라색반점과 색상 및 R<sub>f</sub> 값이 같다.

2) 액체크로마토그래프법

아래의 정량법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

**pH**

이 약 1.0 g을 물 100 mL에 녹여 대한민국약전 일반시험법 중 「pH 측정법」에 따라 시험할 때 4.3 ~ 4.9 이다.

**순도시험**

- 1) 중금속 이 약 1.0g을 달아 대한민국약전 일반시험법 「중금속시험법」 제 3법에 따라 시험할 때 30 ppm 이하이다.
- 2) 비소 이 약 1.0 g을 정확하게 취해 대한민국약전 일반시험법 「비소시험법」 제 3 법에 따라 검액을 만들고 시험할 때 2 ppm 이하이다.
- 3) 잔류용매 대한민국약전 「의약품잔류용매기준지침」에 따라 잔류 에탄올 양은 5000 ppm 이하이다.

**건조감량**

이 약 1.0 g을 달아 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 건조감량에 따라 시험할 때 10 % 이하이다. (1.0 g, 105 °C, 6 시간)

회분시험

이 약 1.0 g을 달아 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 회분에 따라 시험할 때 5.2 % 이하이다.

미생물한도시험

대한민국약전 일반시험법 중 「미생물한도시험법」에 따라 시험할 때 대한민국약전 외 일반시험법 별표 2의 기준에 적합하여야 한다.

정량법

이 약 100 mg을 정밀하게 달아 100 mL 용량플라스크에 넣고 50 % 메탄올 90 mL를 넣어 초음파 용해 한 후 다시 50 % 메탄올로 정확히 100 mL로 하고 여과하여 검액으로 한다. 따로 오레고닌표준품 10 mg을 정밀하게 달아 50 % 메탄올에 녹여 정확하게 100 mL로 하여 표준액으로 한다. 검액과 표준액은 10 µL취하여 아래 분석조건에서 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액 및 표준액의 피크 면적 At 및 AS를 구한다.

$$\text{오레고닌(C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{10} : 478.495)\text{의 함량 (\%)} = \frac{\text{At} \times \text{Ws}}{\text{As} \times \text{Wt}} \times \text{Ps}$$

- At : 검액 중 주성분의 피크면적
- As : 표준액 중 주성분의 피크면적
- Wt : 검액 제조시 사용한 이 약의 중량 (mg)
- Ws : 표준액 제조시 사용한 표준품의 중량 (mg)
- Ps : 표준품의 순도 (%)

<조 건>

컬 럼 : Capcellpak UG120 C18 (5µm, 4.6 mm × 250 mm)

이 동 상 : 이동상 A - 0.1% 인산용액  
이동상 B - 아세트니트릴

주 입 량 : 10 µL

검 출 기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)

유 속 : 1.0 ml/분

컬럼온도 : 25 °C

측정범위 : 70 분

농도 구배

Time(min)	A(%)	B(%)
0	90	10
5	90	10
35	65	35
45	55	45
45.1	40	60
50	40	60
50.1	10	90
65	10	90
65.1	90	10
70	90	10

마. 지역별 원생약 확보 및 분석

1) 3개 지역 (충북 제천, 경남 거창, 강원 춘천)의 원생약을 확보하여 3일간 음건하고 잘게 분쇄함. 1차년도에 진행한 '제조 공정 표준화 설정'에서 선정된 최적화된 추출 공정 조건으로 추출하여 감압 농축하여 추출물을 얻고 원물 대비 수율을 구함. HPLC를 통해 지표성분의 함량평가를 진행함.

- 검액은 추출물 5mg을 취해 70% MeOH 1mL에 녹여 sample로 이용함.
- 표준용액은 확보한 oregonin과 hirsutenone을 각각 2mg을 취해 70% MeOH에 녹여 stock solution을 조제한 후 이를 희석하여 사용함.
- Oregonin의 농도는 2000, 1000, 500, 250µg/mL, hirsutenone의 농도는 1000, 500, 250, 125, 62.5µg/mL로 조제하였으며 확립한 분석조건(표 6)으로 각 시료에 대한 함량분석을 실시함.
- 지표성분의 함량분석을 통해 linear regression equation ( $y = ax + b$ ,  $y = \text{peak 면적}$ ,  $x$  : 시료 농도,  $a$  : 직선의 기울기,  $b$  :  $y$  절편)을 구하였으며 상관계수(R<sup>2</sup>)의 값을 통해 직선성을 확인함.
- R<sup>2</sup>의 값이 0.999 이상인 경우 지표성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용함.
- 함량분석 결과 검량선 모두 R<sup>2</sup>가 0.999 이상으로 나타나 높은 직선성을 보임을 확인하였으며(그림 5) 이를 활용하여 각 산지별 수율 및 함량을 구함(표 7).

표 6. 함량분석의 HPLC 분석 조건

System	Waters 600 system (USA)
Detector	Waters 112 UV/VIS (280nm)
Column	Hector C18 HPLC Column (5 µm, 250 X 4.6 mm)
Mobile phase	0.2% acetic acid in H <sub>2</sub> O : ACN = 95 : 5 (0min) → 75 : 25 (20min) → 60 : 40 (35min) → 0 : 100 (38min) → 0 : 100 (48min)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection	10 µL

표 7. 추출물에서의 지표성분의 함량 (%)

	Oregonin (%)	Hirsutenone (%)
제천 가지 환류	15.49	0.63
제천 가지 환류 용매분획물(E.A.)	50.29	1.32

- 2) 3개 지역(제천, 거창, 춘천)의 원생약을 확보하였고, 그 중 원생약 확보 용이성, 수율, 지표성분 함량 등을 고려하여 최종 제천으로 원료의 산지를 확정하였음.
- 3) 물오리나무 대량 수급을 위하여 국립산림과학원과 협의 중에 있으며, 임상 2상 시험이 성공적으로 끝날 경우 제천 재배 농가와 계약 재배 등의 논의가 진행 될 예정임.



바. Pilot scale up 연구

- 1) 최적화된 추출조건으로 확보한 물오리나무 수피 추출물로부터 지표성분을 일정량 포함하는 활성분획물 생산시스템 확립 및 지표성분 분리
  - (1) 1차년도에 진행한 '제조공정 표준화 설정'에서 선정된 최적화된 추출 공정 조건으로 확보한 물오리나무 수피 추출물 250g을 물에 녹인 후 ethyl acetate (E.A.)를 이용하여 분획함. 그 중 E.A. 층을 감압 농축하여 60.88g을 얻음으로서 활성 분획물을 확보함.
  - (2) 약 10g은 함량평가 및 활성평가에 이용하고 나머지 50g을 Sephadex LH-20 컬럼에 로딩하고 MeOH : H<sub>2</sub>O = 20 : 80 ~ 100 : 0 용매 비율로 흘려준 후 TLC로 분석하여 fraction 1 ~ fraction 17로 나눔. 그 중 fraction 7을 MCI CHP 20P 컬럼에 로딩하여 MeOH : H<sub>2</sub>O = 40 : 60 ~ 100 : 0 용매 비율로 흘려주어 fraction 7-7에서 compound 1 (6.56g)을 얻음. 그리고 fraction 10을 MCI CHP 20P 컬럼에 로딩하여 MeOH : H<sub>2</sub>O = 40 : 60 ~ 100 : 0 용매 비율로 흘려주어 compound 2 (623mg)을 얻음(그림 6).

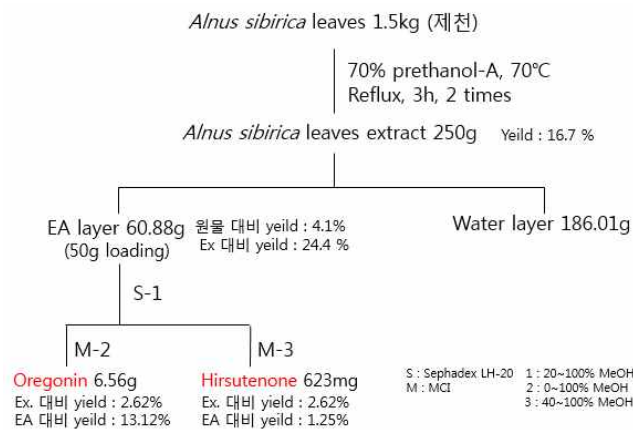


그림 6. 물오리나무 가지로부터 oregonin과 hirsutenone의 분리 flow chart

- (3) 1H 및 13C-NMR을 이용해 compound 1과 compound 2의 구조를 분석하여 각각 oregonin과 hirsutenone으로 구조 동정함.

① Oregonin

- ⑦ 1H-NMR (600MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) : δ 6.66(1H, d, J=8.4Hz, H-5'), 6.56(1H, d, J=8.4Hz, H-5''), 6.65(2H, d, J=1.8Hz, H-2', 2''), 6.46(2H, dd, J=8.4, 1.8Hz, H-6', 6''), 4.26(1H, d, J=7.8Hz, xyl-1), 4.10-4.06(1H, m, H-5), 3.81(1H, dd, J=11.4, 6.1Hz H-xyl-5a), 3.49(1H, m, H-xyl-4), 3.35(1H, t, J=9Hz, xyl-3), 3.21-3.09 (2H in total, m, H-xyl-5b, xyl-2), 2.84-2.43(8H in total, H-1,2,4,7), 1.75-1.69(2H in total, m, H-6)

② Hirsutenone

- ⑦ 1H-NMR (600MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) : δ 6.84(1H, dt, J=16.2, 5.4, H-5), 6.69-6.66(4H in total, m, H-2', 2'', 5', 5''), 6.49-6.47(2H in total, m, H-6', 6''), 6.07(1H, d, J=16.0Hz, H-4), 2.77-2.40(8H in total, m, H-1,2,6,7)

- (4) Oregonin과 hirsutenone의 수율은 확보한 추출물 대비 각각 2.62%, 0.25%이며, E.A. 추출물 대비 각각 12.12%, 1.25%임. 이로써 지표성분인 oregonin과 hirsutenone의 최적 분리시스템을 확보함.

- (5) 최적화된 추출 공정조건으로 확보한 물오리나무 수피 추출물 및 E.A. 추출물에서 지표성분의 함량을 분석하기 위해 HPLC를 이용하여 함량평가를 진행함. 검액은 추출물 5mg을 취해

70% MeOH 1mL에 녹여 sample로 이용함. 표준용액은 확보한 oregonin과 hirsutenone을 각각 2mg을 취해 70% MeOH에 녹여 stock solution을 조제한 후 이를 희석하여 사용함. Oregonin의 농도는 2000, 1000, 500, 250 $\mu$ g/mL, hirsutenone의 농도는 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu$ g/mL로 조제하였으며 확립한 분석조건(표 6)으로 각 시료에 대한 함량분석을 실시함. 지표성분의 함량분석을 통해 linear regression equation ( $y = ax + b$ ,  $y = \text{peak 면적}$ ,  $x$  : 시료 농도,  $a$  : 직선의 기울기,  $b$  : y 절편)을 구하였으며 상관계수( $R^2$ )의 값을 통해 직선성을 확인함.  $R^2$ 의 값이 0.999 이상인 경우 지표성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용함. 함량분석 결과 검량선 모두  $R^2$ 가 0.999 이상으로 나타나 높은 직선성을 보임을 확인함. Oregonin의 함량은 추출물 및 E.A. 추출물 대비 각각 15.49%, 50.29%이며 hirsutenone의 함량은 추출물 및 E.A. 추출물 대비 각각 0.63%, 1.32%로 확인됨(그림 7).

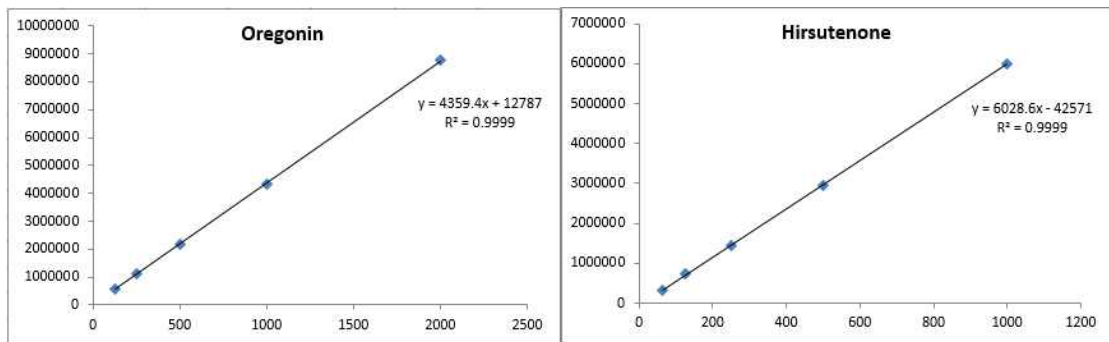


그림 7. 지표성분의 직선성 및 상관계수 ( $R^2$ )

- 2) 물오리나무 수피 추출물을 효소 가수분해한 후 컬럼크로마토그래피를 이용하여 지표성분 분리
  - (1) 물오리나무 수피 추출물 23.27g을 Fungamyl super AX 효소와 증류수 비율 1 : 3 : 1로 섞은 후 실온에서 3일 방치하여 반응시킴. Ethyl acetate(E.A.)로 효소와 증류수 층을 제거한 후 E.A.층만을 감압 농축하여 9.3g을 얻음. 이를 Sephadex LH-20 컬럼에 로딩하고 MeOH : H<sub>2</sub>O = 20 : 80 ~ 100 : 0 용매비율로 흘려준 후 TLC로 분석하여 fraction 1 ~ fraction 8로 나눔. 그 중 비당체가 있는 fraction을 ODS gel 및 MCI CHP 20P 컬럼에 다시 로딩하고 일정 용매비율로 흘려주어 compound 1-4를 얻음(그림 8).

Chromato-gel	Solvent system
O : ODS gel	1 : 0% - 100% MeOH
M : MCI gel CHP 20P	2 : 20% - 100% MeOH
S : Sephadex LH-20	3 : 40% - 100% MeOH
	4 : 60% - 100% MeOH

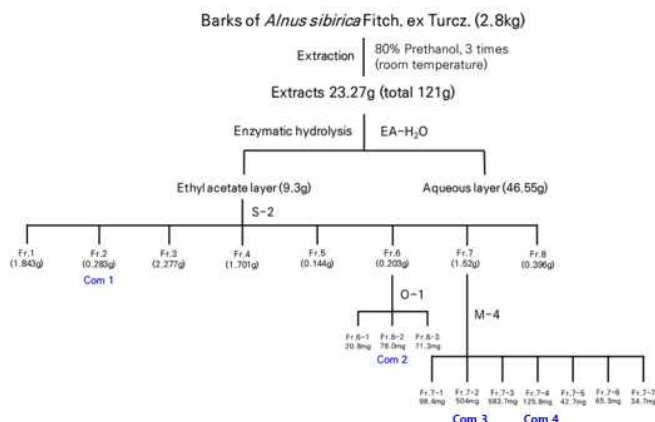


그림 8. 효소분해 물오리나무 가지 추출물의 분리 flow chart

(2) 얻은 compound 1-4를 1H 및 13C-NMR을 이용하여 구조를 분석하여 각각 hirsutanonol, hirsutenone, rubranol, muricarpone B로 구조 동정함.

① Hirsutanonol (1)

① 1H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 6.59 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-5'), 6.57 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-5''), 6.52 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 6.52 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2''), 6.37 (1H, dd, J = 7.2, 2.1 Hz, H-6'), 6.36 (1H, dd, J = 7.2, 2.1 Hz, H-6''), 3.36 - 3.32 (1H in total, m, H-5), 2.67 - 2.30 (8H in total, m, H-1, 2, 4, 7), 1.56 - 1.45 (2H in total, m, H-6).

② Hirsutenone (2)

① 1H-NMR (300 MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 7.37 (1H, dt, J = 13.2, 6.6 Hz, H-5), 7.19 - 7.11 (4H in total, m, H-2', 2'', 5', 5''), 6.94 - 6.90 (2H in total, m, H-6', 6''), 6.57 (1H, d, J = 13.2 Hz, H-4), 3.25 - 2.89 (8H in total, m, H-1, 2, 6, 7).

③ Rubranol (3)

① 1H - NMR (300MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 6.71 - 6.66 (4H in total, m, H-2', 2'', 5', 5''), 6.51 (1H, dd, J = 6.3, 2.1 Hz, H-6'), 6.45 (1H, dd, J = 6.3, 2.1 Hz, H-6''), 3.57 - 3.51 (1H in total, m, H-5), 2.68 - 2.42 (4H in total, m, H-1, 7), 1.69 - 1.42 (8H in total, m, H-2, 3, 4, 6).

④ Rubranol (4)

① 1H-NMR (600 MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 6.68 (1H, d, J = 7.2, H-5'), 6.67 (1H, d, J = 7.2, H-5''), 6.66 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 6.64 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2''), 6.45 (1H, dd, J = 7.2, 2.1 Hz, H-6'), 6.44 (1H, dd, J = 7.2, 2.1 Hz, H-6''), 2.67 - 2.61 (4H in total, m, H-1, 2), 2.42 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-4), 2.40 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7), 1.49 (4H, m, H-5, 6).

① 13C-NMR (150 MHz, Acetone-d<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 210.40(C-3), 144.82 (C-3''), 144.74 (C-3'), 143.09 (C-4''), 142.86 (C-4'), 133.78 (C-1''), 132.80 (C-1'), 119.31 (C-6''), 119.20 (C-6'),

115.32 (C-2''), 115.28 (C-2'), 115.10 (C-5''), 114.01 (C-5'), 44.05(C-2), 42.12(C-4), 34.68 (C-7), 31.01 (C-5), 25.12(C-1), 23.08 (C-6).

(3) 물오리나무 수피추출물 효소분해물에서의 지표성분의 함량을 분석하기 위해 HPLC를 이용하여 함량평가를 진행함. 검액은 추출물 5mg을 취해 70% MeOH 1mL에 녹여 sample로 이용함. Hirsutanonol (1), hirsutenone (2), rubranol (3) muricarpon B (4)를 70% MeOH에 녹여 stock solution을 조제함. Hirsutanonol 표준용액의 농도는 2300, 1150, 575, 287.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 조제하였으며, 나머지 화합물들의 표준용액의 농도는 1000, 500, 250, 125  $\mu\text{g/mL}$ 로 조제함. 확립한 분석조건(표 6)으로 각 시료에 대한 함량분석을 실시함. 함량분석 결과 검량선 모두 R2가 0.999 이상으로 나타나 높은 직선성을 보임을 확인함(그림 9). Chromatogram 비교 결과 추출물과 효소분해물에서 배당체형태인 oregonin이 분해되고 비당체 형태의 성분들이 증가하거나 새로 생긴 것을 확인함(그림 10). 함량은 표 8과 같음. 이로써 oregonin이 분해되고 hirsutanonol과 hirsutenone의 peak가 증가한 것을 확인함.

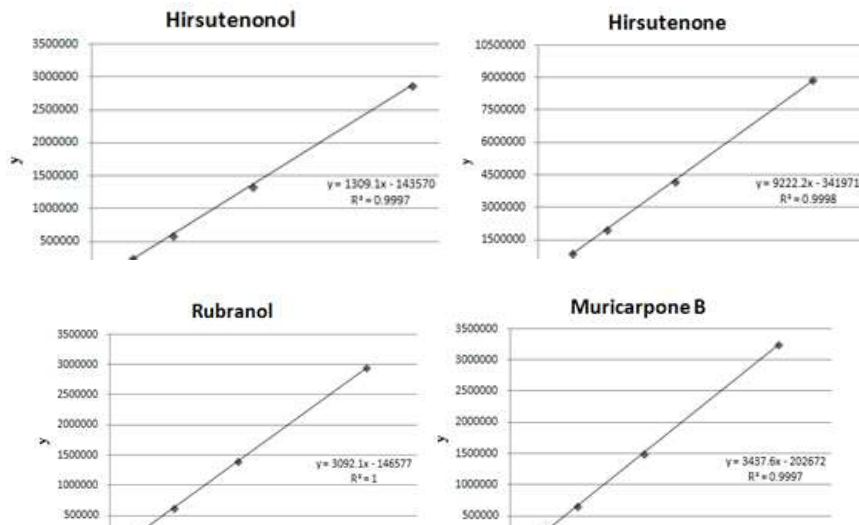


그림 9. 효소분해물로부터 분리된 화합물들의 직선성 및 상관계수 (R2)

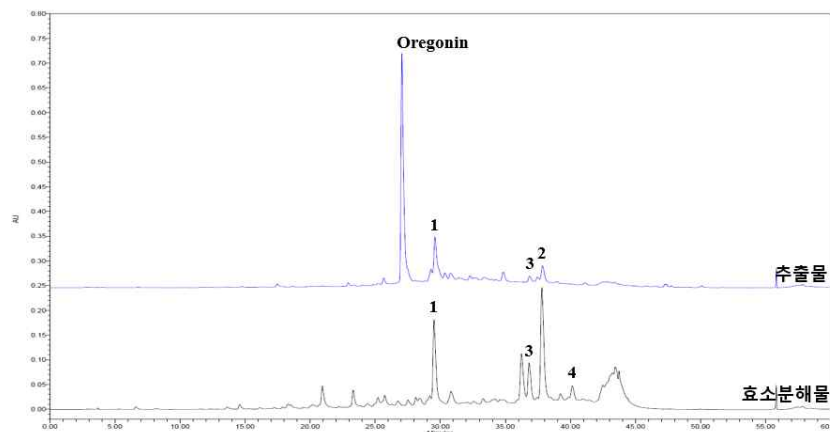
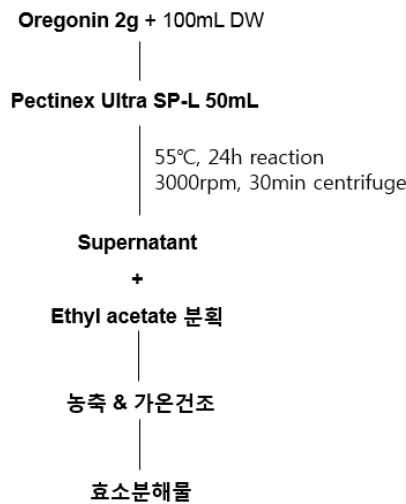


그림 10. 추출물과 효소분해물의 비교 chromatogram

표 8. 효소분해물에서의 지표성분의 함량 분석

	Hirsutanonol (%)	Hirsutenone (%)	Rubranol (%)	Muricarpone B (%)
효소분해물	27.43	6.99	5.78	2.72

- 3) 물오리나무 수피에 배당체 형태로 다량 함유된 oregonin을 효소 가수분해와 가온건조를 통해 hirsutenone 생산 시스템을 확립함.
- (1) 물오리나무 수피 추출물의 효소분해를 통해 oregonin이 효소분해되어 비당체로 변하는 것을 확인함. 이 부분을 응용하여 확보된 oregonin 2g을 Pectinex super 효소 50mL와 증류수 100mL로 섞은 후 55°C에서 24시간 동안 반응시켜 효소 가수분해한 후 TLC를 통해 oregonin 스팟이 사라지고 hirsutanonol 밴드가 진하게 생기고 hirsutenone 밴드가 희미하게 생긴 것을 확인함. 이는 배당체 형태인 oregonin이 효소에 의해 당이 분해되고 비당체 형태인 hirsutanonol과 hirsutenone을 생산함을 알 수 있음.
  - (2) E.A.를 이용하여 효소와 증류수 층을 제거한 후 E.A.층만을 감압 농축 및 가온건조하여 hirsutanonol을 탈수시킴. 이 때 hirsutenone 스팟이 진해지고 hirsutanonol 스팟이 희미해짐을 확인함. 이로서 물오리나무 수피에 배당체 형태로 다량 함유된 oregonin을 효소 가수분해와 가온건조하여 hirsutenone 생산 시스템을 확립함.



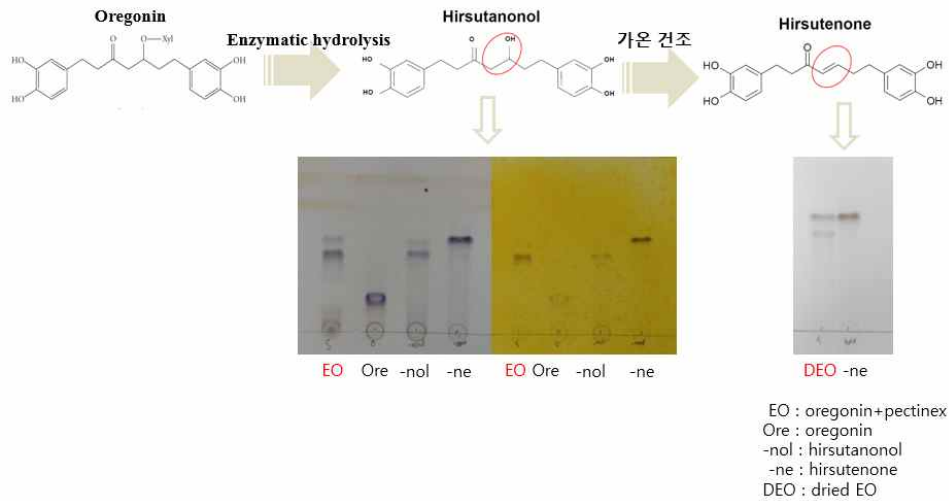


그림 11. Oregonin 효소분해를 통한 hirsutenone 생산 시스템 확립 과정

사. 성분 프로파일을 통한 동등성 확인(성분프로파일 첨부)

- 1) 물오리나무 추출물의 품질 일관성을 확립하기 위해 식품의약품안전처에서 발간한 “한약(생약) 제제의 성분프로파일 설정 가이드라인”에 따라 성분프로파일 분석조건을 설정함.
  - (1) 특이성 : 불순물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분리대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력
  - (2) 정확성 : 측정값이 이미 알고있는 참값이나 표준값에 근접한 정도
  - (3) 정밀성 : 균일한 검체로부터 여러번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성
  - (4) 성분 프로파일 분석을 위한 특이성은 크로마토그램 상각 피크의 특징 UV, IR, Mass spectrum 등이 특이적으로 확보되는 것을 확인하는 정도로 가능함.
- 2) HPLC 등에서는 다양한 원인에 의해서 피크 유지시간 변동 (retention time shift)이 발생할 수 있으며 이는 성분프로파일의 확인 및 평가에 영향을 미칠 수 있어, 반복성과 실험실 내 정밀성은 크로마토그램 상의 피크면적 뿐 아니라 피크 유지시간에 대해서도 밸리데이션이 수행되어야 함. 이 때 각각의 항목에 대해 상대표준편차 (RSD)는 5% 이하가 되도록 하는 것이 바람직함. 필요한 경우 내부 표준물질을 사용하여 정밀성을 확보할 수 있음.
- 3) 2차년도에 지역별 원생약 확보 및 분석 결과를 기반으로 원생약의 생산지를 제천으로 결정하였고 가이드라인에 따라 hyperoside(1), oregonin(2), hirsutanonol(3), rubranoside B(4), hirsutenone(5)를 5개의 피크로 선정하여 성분프로파일을 진행함(그림 12,13 / 표 9).

- 1) 유효성과 관련 있는 중요한 성분이 알려져 있는 경우에는 면적비와 관계없이 가능한 이들 피크는 선택한다.
  - 단일제의 경우 최대한 많은 수의 피크가 고려되어야 하고, 가능한 크로마토그램 상 전체 피크면적의 합 대비 1 % 이상의 값을 갖도록 하고, 특정 성분의 피크가 과도하게 큰 면적을 차지하지 않도록 한다.
  - 복합제의 경우 각 주성분별로 1개 이상의 특정 피크가 포함되어야 한다.
- 2) 크로마토그램 상에서 반복성, 실험실내 정밀성이 확보되는 (RSD < 5 %) 피크들을 선택한다. 이 때, 이들 면적의 합은 전체 피크면적 합을 50 % 이상인 것이 바람직하다.
- 3) 최종 선정된 피크들의 면적은 표준시료 간 RSD 25 % 이내 인 것이 바람직하다. 단, 표준성분프로파일과 비교하여 피크의 생성 또는 피크의 소멸 등 크로마토그램 패턴의 변화가 없어야 한다.
- 4) 성분프로파일에 선택된 피크들에 대해서는 각각의 특성을 나타낼 수 있는 UV 스펙트럼 또는 분자량 등에 대한 정보가 제시되어야 한다.

그림 12. 성분프로파일을 구성하는 피크 선택 시 고려사항

표 9. 성분 프로파일 HPLC 분석 조건

System	Water 600 system(USA)
Column	Kromasil C18 HPLC Colum(Varian C18-HL, 5u, 250X4.6mm)
Mobile phase	0.2% acetic acid in H <sub>2</sub> O : ACN = 95 : 5 (0min) → 75 : 25 (20min) → 60 : 40 (35min) → 0 : 100 (38min)
Wavelength	280nm
Flow rate	1.0mL/min
Sample	2.5mg/mL (70% MeOH)

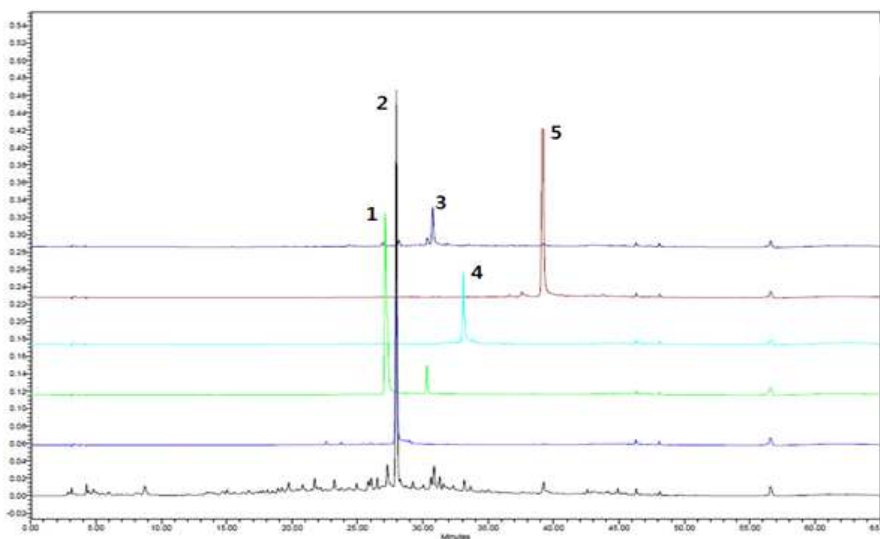


그림 13. 선정된 피크의 크로마토그램

4) 특이성 확인 결과, 각 피크에서 특이성을 확인할 수 있는 UV 스펙트럼을 확보하였으며 다른 로트의 크로마토그램에서도 동일함을 확인함(그림 14).

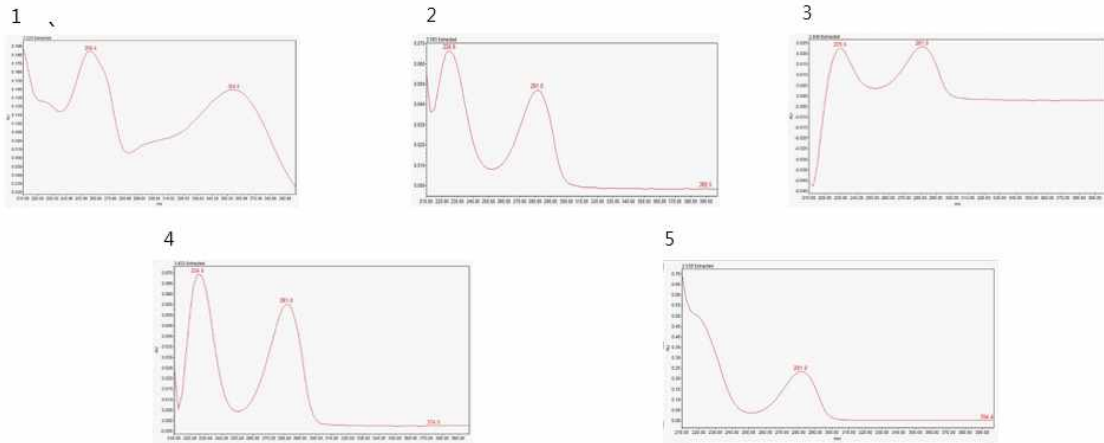


그림 14. 표준 성분프로파일 확보를 위해 선정된 피크들의 UV 스펙트럼

5) 반복성 확인 결과, 측정값(유지시간, 피크면적)과 상대값(상대유지시간, 상대피크면적) 모두에 대해서 상대표준편차를 확인한 결과(RSD < 5%) 반복성을 가지는 것으로 확인함(표 10, 11).

peak	Retention time						Avg	Stdv	%RSD
	1회	2회	3회	4회	5회	6회			
1	27.046	27.020	27.003	26.992	26.986	27.040	27.009	0.023	0.084
2	27.831	27.815	27.805	27.798	27.794	27.821	27.809	0.013	0.047
3	30.712	30.701	30.468	30.688	30.683	30.710	30.650	0.087	0.283
4	33.076	33.073	33.064	33.066	33.056	33.077	33.067	0.007	0.022
5	39.047	39.041	39.026	39.015	39.002	39.058	39.026	0.019	0.049

peak	Relative Retention time						Avg	Stdv	%RSD
	1회	2회	3회	4회	5회	6회			
1	0.972	0.971	0.971	0.971	0.971	0.972	0.971	0.000	0.039
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
3	1.104	1.104	1.096	1.104	1.104	1.104	1.102	0.003	0.272
4	1.188	1.189	1.189	1.190	1.189	1.189	1.189	0.000	0.028
5	1.403	1.404	1.404	1.404	1.403	1.404	1.403	0.000	0.020

표 10. 유지시간 및 RRT의 반복성

peak	Peak Area						Avg	Stdv	%RSD
	1회	2회	3회	4회	5회	6회			
1	375934	371999	370355	375253	376502	380440	375081	3249	0.866167
2	2060605	2058518	2072402	2087184	2094299	2112651	2080943	19202	0.922732
3	164609	165880	160880	166909	167035	166876	165365	2176	1.315834
4	61391	61569	61080	61299	62394	61400	61522	416	0.676633
5	96089	96462	96489	97408	98027	98426	97150	866	0.891415



peak	Relative Peak Area						Avg	Stdv	%RSD
	1회	2회	3회	4회	5회	6회			
1	0.182	0.181	0.179	0.180	0.180	0.180	0.180	0.001	0.635
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
3	0.080	0.081	0.078	0.080	0.080	0.079	0.079	0.001	1.189
4	0.030	0.030	0.029	0.029	0.030	0.029	0.030	0.000	0.997
5	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.000	0.237

표 11. 피크면적 및 RPA의 반복성

- 6) 실험실 내 정밀성 확인 결과, 측정값(유지시간, 피크면적)과 상대값(상대유지시간, 상대피크면적) 모두에 대해서 상대표준편차를 확인한 결과 (RSD < 5%) 정밀성을 가지는 것으로 확인함 (표 12, 13)

Peak	Retention time			Avg	Stdv	%RSD
	1일	3일	5일			
1	27.412	27.567	27.365	27.448	0.086	0.314
2	28.013	28.089	28.066	28.056	0.032	0.113
3	30.919	30.988	30.113	30.673	0.397	1.295
4	33.177	33.211	33.254	33.214	0.032	0.095
5	39.362	39.465	39.331	39.386	0.057	0.145

Peak	Relative Retention time			Avg	Stdv	%RSD
	1일	3일	5일			
1	0.979	0.981	0.975	0.978	0.003	0.267
2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
3	1.104	1.103	1.073	1.093	0.014	1.317
4	1.184	1.182	1.185	1.184	0.001	0.091
5	1.405	1.405	1.401	1.404	0.002	0.124

표 12. 유지시간 및 RRT의 실험실 내 정밀성

Peak	Peak Area			Avg	Stdv	%RSD
	1일	3일	5일			
1	446334	422178	410991	426501	14749	3.458
2	2218342	2204657	2177410	2200136	17013	0.773
3	187654	197113	184945	189904	5216	2.747
4	77831	71636	70629	73365	3184	4.340
5	101845	101468	100835	101383	417	0.411

Peak	Relative Peak Area			Avg	Stdv	%RSD
	1일	3일	5일			
1	0.201	0.191	0.189	0.194	0.005	2.756
2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
3	0.085	0.089	0.085	0.086	0.002	2.541
4	0.035	0.032	0.032	0.033	0.001	3.705
5	0.046	0.046	0.046	0.046	0.000	0.364

표 13. 피크면적 및 RPA의 실험실 내 정밀성

7) 표준성분프로파일 확립 결과, 각 피크별 유지시간의 상대표준편차 (RSD < 1%)는 비교적 일정하게 관찰되었으며 피크면적의 경우 RSD < 15%로 관찰되었음(표 14, 15).

		Retention time				
		peak 1	peak 2	peak 3	peak 4	peak 5
1lot	sample1	27.599	28.22	31.09	33.405	39.519
	sample2	27.479	28.089	30.971	33.318	39.469
	sample3	27.516	28.146	31.026	33.365	39.47
2lot	sample1	27.653	28.233	31.123	33.417	39.619
	sample2	27.489	28.147	31.032	33.379	39.469
	sample3	27.49	28.145	31.028	33.372	39.464
3lot	sample1	27.25	28.015	30.855	33.293	39.261
	sample2	27.254	28.014	30.136	33.292	39.267
	sample3	27.276	28.023	30.862	33.29	39.27
avg		27.445	28.115	30.903	33.348	39.423
stdv		0.142	0.080	0.284	0.047	0.120
%RSD		0.516	0.283	0.920	0.142	0.305

표 14. 표준시료 유지시간의 평균값

		Peak Area				
		peak 1	peak 2	peak 3	peak 4	peak 5
1lot	sample1	54660	2654854	94870	41179	111490
	sample2	46716	2510699	86717	41492	106398
	sample3	50168	2565081	83297	41430	110455
2lot	sample1	66970	1982805	85753	48309	83812
	sample2	70624	2523062	95830	43450	103449
	sample3	71679	2558588	107124	43369	104645
3lot	sample1	48446	2089122	91135	55916	99548
	sample2	56787	2112651	54583	55141	98426
	sample3	61645	2072402	94203	57132	96489
avg		58633	2341029	88168	47491	101635
stdv		9001	252551	13613	6403	7949
%RSD		15.352	10.788	15.440	13.483	7.822

표 15. 표준시료 피크 면적의 평균값

8) 동등 대상 시료의 성분프로파일 평가는 다른 지역의 원생약을 가지고 진행함. 실험 결과 pearson 상관계수가 0.9987로 높은 값을 나타냄을 확인함(표 16).

	peak 1	peak 2	peak 3	peak 4	peak 5	r value
standard	10409	2929226	206189	78904	213377	
sample	58633	2341029	88168	47491	101635	0.9987
	-82.25	25.13	133.86	66.15	109.95	

표 16. 표준성분프로파일과 비교 대상 시료의 피크면적 및 동등상관계수 확보

자. 계절별 원생약 확보 및 분석

- 1) 품질일관성 확보 차원에서 각 계절별 물오리나무 수피를 확보하여 음건하고 잘게 분쇄함. 최적화된 추출공정에 따라 추출함. 이를 감압 농축하여 추출물을 얻어 원물 대비 수율을 구하고 HPLC를 통해 지표성분의 함량평가를 진행함. 검액의 제조는 추출물 5mg을 취해 70% MeOH 1mL에 녹여 sample로 이용함. 표준용액은 확보한 oregonin과 hirsutenone을 각각

1mg을 70% MeOH에 녹여 stock solution을 조제하였고, 이를 희석하여 oregonin의 농도를 2000, 1000, 500, 250, 125 $\mu$ g/mL, hirsutenone은 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 $\mu$ g/mL로 조제함.

분석조건은 표 16(Ki Hoon Yoon. 2016. "Radical scavenging Activities and Inhibitory Activity on Nitric Oxide Production of Diarylheptanoids from Fermented Stems of *Alnus sibirica* Fitch. ex Turcz." Master. The Graduate School Chung-Ang University.)과 같은 조건으로 각 시료에 대한 함량분석을 실시 함. 유효(지표) 성분의 함량분석을 통해 linear regression equation ( $y=ax+b$  y: peak 면적, x: 시료 농도 a: 직선의 기울기, b: y절편)을 구하였으며 상관계수(R<sup>2</sup>)의 값을 통해 직선성을 확인함.

R<sup>2</sup>의 값이 0.999이상인 경우 지표성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용함. 함량분석 결과 검량선 모두 R<sup>2</sup> 가 0.999 이상으로 나타나 높은 직선성을 보이고 있음을 확인. 각 계절별 수율 및 함량은 표 1과와 같음. Oregonin과 Hirsutenone 모두 봄의 함량이 가장 적었고 겨울이 가장 많은 것을 확인함.

System	Water 600 system(USA)
Column	Kromasil C18 HPLC Colum(Varian C18-HL, 5 $\mu$ , 250X4.6mm)
Mobile phase	0.2% acetic acid in H <sub>2</sub> O : ACN = 95 : 5 (0min) → 75 : 25 (20min) → 60 : 40 (35min) → 0 : 100 (38min)
Wavelength	280nm
Flow rate	1.0mL/min
Sample	2.5mg/mL (70% MeOH)

표 17. 계절별 함량평가 HPLC 분석 조건

	수율(%)	oregonin extract 함량	oregonin original plant 함량	hirsutenone extract 함량	hirsutenone original plant 함량
봄	5.98	11.22	0.67	0.50	0.03
여름	6.91	13.27	0.92	0.55	0.04
가을	5.81	16.34	0.95	0.96	0.06
겨울	10.23	17.37	1.78	0.87	0.09

표 18. 계절별 물오리나무 수피의 수율 및 지표성분의 함량(%)

아. 대량생산 공정 확립

- 1) 2차년도에 확립된 대량생산시스템의 재현성 확인을 위해 주관기관이 대량공정 (약 100kg scale)한 추출물로부터 지표성분인 oregonin을 분리함. 추출물을 ethyl acetate 분획 및 대형 컬럼크로마토그램 (Sephadex LH-20, MCI CHP 20P gel 등)을 이용하여 지표성분을 분리하고, 이를 pilot scale과 수율, 함량 등을 비교 분석하여 대량생산공정 재현성을 확보함.
- 2) 주관기관이 물오리나무 수피를 대량공정하여 제공한 추출물 603.73g을 물에 녹인 후 ethyl acetate(E.A.)를 이용하여 분획하고 그 중 E.A.층만을 감압 농축하여 270.35g을 얻음. E.A. 분획물을 물에 녹인 후 Celite 545로 여과하고 감압 농축하여 147.47g을 얻음. 이를 Sephadex

LH-20 컬럼에 로딩하고 MeOH : H<sub>2</sub>O = 20 : 80 ~ 100 : 0 용매 비율로 흘려준 후 TLC로 분석하여 fraction 1 ~ fraction 14로 나눔. 그 중 fraction 8을 MCI CHP 20P 컬럼에 로딩하여 MeOH : H<sub>2</sub>O = 0 : 100 ~ 100 : 0 용매 비율로 흘려주고 TLC로 분석하여 fraction 8-1 ~ 8-6으로 나눔. fraction 8-1을 ODS 컬럼에 로딩하여 MeOH : H<sub>2</sub>O = 0 : 100 ~ 100 : 0 용매 비율로 흘려주어 fraction 8-1-3서 지표성분인 oregonin (54.58g)을 얻음.

Oregonin의 수율은 추출물 대비 9.04%, E.A. 추출물 대비 20.19% 및 filtrate 대비 37.01%임 (그림 12). 이로써 2차년도에 확립한 대량생산시스템의 재현성을 확인함.

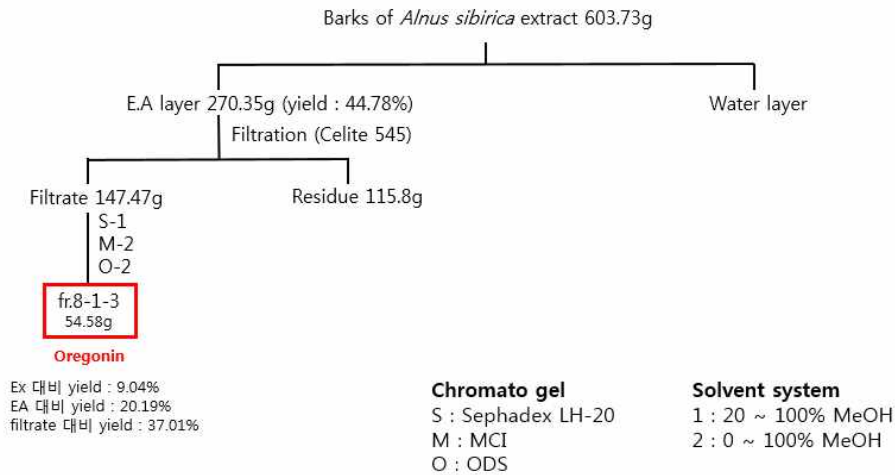
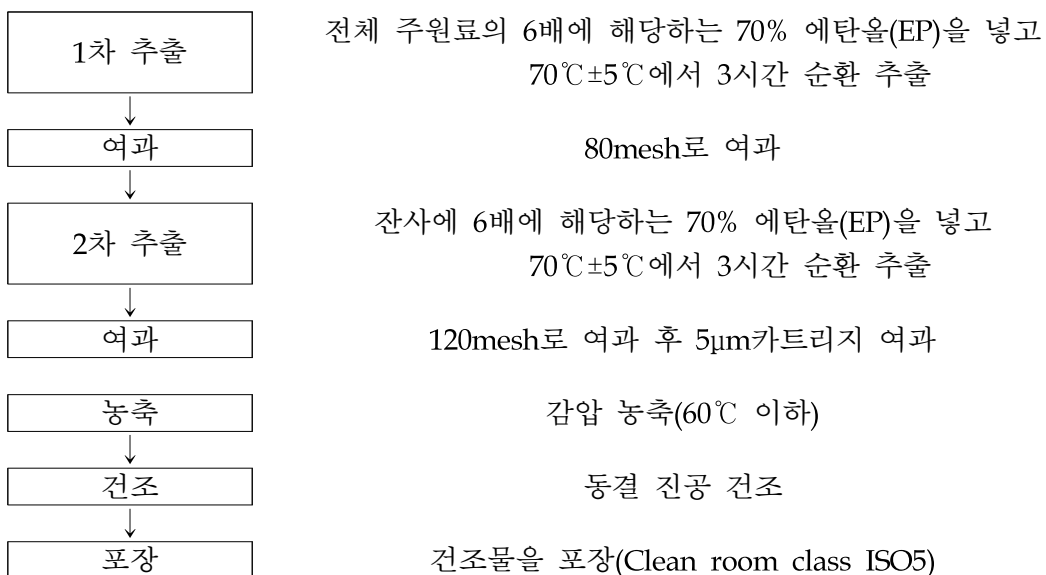


그림 12. 물오리나무 수피 추출물로부터 oregonin 대량생산 시스템 flow chart

### 3) 최종 API 제조 방법 확립

이 약은 물오리나무 (*Alnus sibirica* Fisch. ex Turcz.)의 가지울 정선한 후, 원생약 중량 대비 6배량의 70% 에탄올을 사용하여 70°C에서 3시간 환류 추출한 다음 감압 여과한다. 잔사에 70% 에탄올을 원생약 중량 대비 6 배량을 가하여 70°C에서 3시간 환류 추출한 다음 감압 여과한다. 여액을 모두 합하여, 감압 농축하고 건조한다. 이 약 1 g은 원생약 15.2 ~ 25 g에 해당 한다 (수율 : 4.0 ~ 6.6%).



(가) API 시험 성적서

완 제 품 시 험 성 적 서

품 명	DKB120			제조단위	3.9 kg
				제조공정	동결건조
코드번호	DKS03	시험규격	별규	제조구분	수탁(동국제약)
제조번호	APK190424	제조일자	2019.04.05	시험의뢰번호	F-90424
접수일자	2019.04.11	시험번호	QF-90424	검체채취장소	별내실
검체채취일	2019.04.11	검체채취량	100g	검체채취자	진병선
작성[개정]일자	2018.05.28	작성자	전인제 / 수 2018.05.28	승인자	박명훈 / 수 2018.05.28
시 험 항 목	시 험 기 준	시 험 결 과	항목판정	시험일	시험자
1. 성상	이 약은 황색의 고운 가루로 흡습성이 있고, 맛은 약간 쓰고 떫다.	이 약은 황색의 고운 가루로 흡습성이 있고, 맛은 약간 쓰고 떫다.	☑ / 부	2019.04.11	이서영주
2. 확인시험					
1) TLC	검액에서 얻은 여러 개의 반점 중 1개의 반점은 표준액에서 얻은 보라색반점과 색상 및 Rf값이 같다.	Rf: 0.5 색상: 보라색	☑ / 부	2019.04.22	진사강
2) HPLC	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	주요는 표준액과 같은 유지시간에서 커브를 나타냄	☑ / 부	2019.04.18 ~2019.04.19	김주연
3. pH	4.3 ~ 4.9	4.6	☑ / 부	2019.04.22	진사강
4. 순도시험					
1) 중금속	30 ppm 이하 (비교액보다 연함)	30ppm 이하 (비교액보다 연함)	☑ / 부	2019.04.22	이서영주
2) 비소	2 ppm 이하 (표준액보다 진하지 않음)	2ppm 이하 (표준액보다 진하지 않음)	☑ / 부	2019.04.22	진사강
3) 잔류용매	5.000 ppm 이하	592 ppm	☑ / 부	2019.04.19	김주연
시험연료일	2019.04.24	판정년월일	2019.04.24	판정결과	
비 고 :			결	확 인 자	판 정 자
			재	진병선	이서영주

ORIGINAL

양식YBQ-219-06(01)-DKS03(00)

(주)케이씨씨에본

페이지1/12

## 완 제품 시험 성적서

품 명	DKB120			제조단위	3.9 kg	
				제조공정	동결건조	
코드번호	DKS03	시험규격	별규	제조구분	수탁(동국제약)	
제조번호	APK190424	제조일자	2019.04.05	시험의뢰번호	F - 90424	
접수일자	2019.04.17	시험번호	QF - 90424	검체채취장소	본쇄실	
검체채취일	2019.04.17	검체채취량	100g	검체채취자	권병선	
작성[개정]일자	2018.05.28	작성자	전인제/2018.05.28	승인자	박영문/2018.05.28	
시 험 항 목	시 험 기 준	시 험 결 과		항목판정	시험일	시험자
5. 건조감량	10.0 % 이하	4.9	%	합 / 부	2019.04.18	이성주
6. 회분	5.2 % 이하	3.6	%	합 / 부	2019.04.24	이성주
7. 미생물한도						
1) 총호기성미생물수	1 x 10 <sup>5</sup> CFU이하/1mL or 1g	0	cfu/g	적 / 부	2019.04.17 ~2019.04.22	박영문
2) 총진균수	1 x 10 <sup>2</sup> CFU이하/1mL or 1g	0	cfu/g	적 / 부	2019.04.17 ~2019.04.24	박영문
3) 특정미생물						
① 대장균	불검출	불검출		적 / 부	2019.04.17 ~2019.04.22	박영문
② 살모넬라	불검출	불검출		적 / 부	2019.04.17 ~2019.04.24	박영문
③ 녹농균	불검출	불검출		합 / 부	2019.04.17 ~2019.04.24	박영문
④ 황색포도상구균	불검출	불검출		적 / 부	2019.04.17 ~2019.04.24	박영문
8. 정량						
1) 오레고닌	13.0 % 이상	14.9	%	합 / 부	2019.04.18 ~2019.04.19	김정호

**ORIGINAL**

양식YBQ-219-06(01)-DKS03(00)

KSC 예본 (주)케이지씨예본

페이지2/12

자. 시험법 밸리데이션 수행

분석법 밸리데이션은 DKB120의 주성분인 oregonin의 함량시험을 결정하기 위한 액체크로마토그래피 시험법을 밸리데이션 하고자 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성의 밸리데이션 파라미터를 설정하였고 그에 따른 평가결과는 아래 표와 같음.

Parameters		허용범위	결과	판정
특이성 Specificity		특이적이고 식별성이 있다.	oregonin의 유지시간에 어떠한 피크도 확인되지 않음. 시험용액과 표준용액의 머무름 시간과 스펙트럼 패턴이 일치함.	적합
정밀성 Precision	반복성 Repeatability	RSD 2.0% 이내 95% 신뢰구간	oregonin	적합
			80% 피크면적 : 0.31% 100% 피크면적 : 0.09% 120% 피크면적 : 0.03% 95% 신뢰구간 이내	
정확성 Accuracy		회수율 90.0 ~ 110.0% 95% 신뢰구간	80% 회수율 : 102.9% 100% 회수율 : 100.1% 120% 회수율 : 99.7% 95% 신뢰구간 이내	적합
직선성 Linearity		상관계수(R2) 0.99이상 95% 신뢰구간	Test-1 : 0.997 Test-2 : 0.994 Test-3 : 0.995 평균 : 0.996 95% 신뢰구간 이내	적합

모든 항목에 대한 결과가 허용기준 내에서 적합하였다. 따라서, 이와 같은 시험을 DKB120(Ointment)의 주성분인 oregonin의 함량시험의 시험법은 밸리데이션 되었음.

차. 원료의약품 안정성 시험

현재 물오리나무 70%에탄올건조엑스(15~25→1)에 대한 안정성시험은 진행 중이다. 현재까지 가속안정성시험( $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 75 \pm 5 \text{ \% RH}$ )은 완료하였음. 가속시험조건에서 6개월 동안 안정성 시험을 진행하였으며, 함량시험의 경우 시험기간 동안 유의적 변화는 없었으며, 시험항목 모두 기준에 적합하였음. 장기보존시험 조건 ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C} / 60 \pm 5 \text{ \% RH}$ ) 하에 실시되고 있으며, 지금까지 장기6개월 안정성 시험 결과는 함량시험의 경우 유의적 변화가 없었으며, 그 외의 모든 시험항목에서 기준에 적합하였음.

<가속 안정성 시험>

제품명	물오리나무 70%에탄올건조엑스(15~25→1)										
보관조건	온도	습도				포장					비고
	$40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$75 \pm 5 \text{ \% RH}$				1차 : PE bag					
제조번호	제조일자	시험기간									
		0	1M	3M	6M						
APK190424	2019. 04. 05	V	V	V	V						[안정성 시험 결과 보고서 참조]



JSQ30-0009-F

개정번호(Revision No.): 신규

시행일자(Effective date): 신규

Page 1 / 1



Dongkook  
Pharmaceutical Co., Ltd.

Protocol No: APK190424 19-A01		안정성 시험 결과 보고서 The report for stability study	
제품명 Product Name	물오리나무 70%에탄올건조엑스(15~2 5→1)	사용기간/제품보관조건 Shelf life / Storage condition	36개월 / 실온보관(1~30℃), 밀폐용기
시험구분 Study type	가속 시험	안정성보관조건 Storage condition of stability chamber	40℃ ± 2℃ / 75% ± 5%
포장형태 Packaging	PE bag	시험기간 Test period	2019.07~2019.10
개월수 Status	6개월	결과 Result	적합
시험사유 Reason for Stability Study	<input checked="" type="checkbox"/> 신제품 New product : 1Lot <input type="checkbox"/> 변경 Change/validation <input type="checkbox"/> 기타 Etc.		
결론 Final Conclusion	<p>가속 시험 조건에서 6개월 동안 안정성 시험을 진행하였다.            함량 시험의 경우 시험 기간 동안 유의적 변화는 없었으며 시험 항목 모두 기준에            적합하였다.            Stability test is conducted during 6months' testing at Accelerated storage condition.            Significant change in assay is not occurred during test period.            Test items are complied with the acceptance criteria.</p>		
첨부자료 Attachment	Stability table (Accelerated test – APK190424)		
승인 Approval	직책 Responsibility	성명 Name	서명/서명일 Signature/Sign.Date
	작성자 Preparation by / date	박유화(YH.PARK)	/ 2019.10.22
	시험확인자 Checked by / date	정현일(HI.JUNG)	/ 2019.10.22
	시험책임자 Responsibility by / date	김도훈(DH.KIM)	/ 2019.10.22
승인자 Approved by / date	이계완(KW.LEE)	/ 2019.10.22	

동국제약주

몰오리나부 70%에탄올건조엑스(15-25→1) : 가속시험

제조번호 : APK190424  
 보관조건 : 40 ± 2°C / 75 ± 5% RH  
 보관용기 : PE bag  
 시험기간 : 36개월

제조일자 : 2019.04.05  
 제조수량 : 79KG  
 제조처 : (주)KGC에본  
 시험기간 : 2019.04 - 2019.10

시원일	성상	확인		함량	pH	순도시험			건조감량	회분	미생물인도		
		TLC	HPLC			중금속	비소	잔류용매			총포기성미생물수	총진균수	특정미생물시험
기준 개월	이약은 황색의 고운 가루로 흡습성이 있고, 맞은 약간 쓰코 띤다.	표준액에서 얻은 보리채반질과 색상 및 Rf 값(0.5)이 동일	표준액에서 얻은 투르크의 슈지시칸과 동일	Oregonin 13.5% 이상	3.6-5.6	30ppm 이하	2ppm 이하	5,000ppm 이하 (에탄올)	10% 이하	5.2% 이하	100,000CFU/g 이하	100 CFU/g 이하	불검출
Initial 2019/04	동일	동일	동일	14.9%	4.6	30ppm 이하	2ppm 이하	592	4.9	3.6	0CFU/g	0CFU/g	불검출
1 2019/05	동일	동일	동일	15.2%	4.5	30ppm 이하	2ppm 이하	601-	4.9	3.7	0CFU/g	0CFU/g	불검출
3 2019/7	동일	동일	동일	15.6%	4.5	30ppm 이하	2ppm 이하	585	5.0	3.7	0CFU/g	0CFU/g	불검출
6 2019/10	동일	동일	동일	14.7%	4.6	30ppm 이하	2ppm 이하	580	5.6	3.9	0CFU/g	0CFU/g	불검출

<장기보존시험>

제품명	물오리나무 70%에탄올건조엑스(15~25→1)										
보관조건	온도	습도				포장					비고
	25 ± 2 °C	60 ± 5 % RH				1차 : PE bag					
제조번호	제조일자	시험기간									
		0	3M	6M	9M	1 2 M	1 8 M	2 4 M	3 6 M		
APK190424	2019. 04. 05	V	V	V							[안정성 시험 결과 보고서 참조]

JSQ30-0009-F

개정번호(Revision No.) : 신규  
 시행일자(Effective date) : 신규  
 Page 1 / 1



Dongkook  
 Pharmaceutical Co., Ltd.

Protocol No: APK190424 19-L01		안정성 시험 결과 보고서 The report for stability study	
제품명 Product Name	물오리나무 70%에탄올건조엑스(15-2 5→1)	사용기간/제품보관조건 Shelf life / Storage condition	36개월 / 실온보관(1~30℃), 밀폐용기
시험구분 Study type	장기 시험	안정성보관조건 Storage condition of stability chamber	25℃ ± 2℃ / 60% ± 5%
포장형태 Packaging	PE bag	시험기간 Test period	2019.04 ~ 2022.04
개월수 Status	6개월	결과 Result	적합
시험사유 Reason for Stability Study	<input checked="" type="checkbox"/> 신제품 New product : 1Lot <input type="checkbox"/> 변경 Change/validation <input type="checkbox"/> 기타 Etc.		
결론 Final Conclusion	장기 시험 조건에서 6개월 동안 안정성 시험을 진행하였다. 함량 시험의 경우 시험 기간 동안 유의적 변화는 없었으며 시험 항목 모두 기준에 적합하였다. Stability test is conducted during 6 months' testing at Long term storage condition. Significant change in assay is not occurred during test period. Test items are complied with the acceptance criteria.		
첨부자료 Attachment	Stability table (Long term test – APK190424)		
승인 Approval	직책 Responsibility	성명 Name	서명 / 서명일 Signature/Sign.Date
	작성자 Preparation by / date	박유화(YH.PARK)	/ 2019.10.22
	시험확인자 Checked by / date	정현일(HI.JUNG)	/ 2019.10.22
	시험책임자 Responsibility by / date	김도훈(DH.KIM)	/ 2019.10.22
	승인자 Approved by / date	이계완(KW.LEE)	/ 2019.10.22

동국제약㈜

물오리나무 70%에탄올전조엑스(15-25→1) : 광기 시험

제조번호 : APK190424  
 보관조건 : 25 ± 2°C / 60 ± 5% RH  
 보관용기 : PE bag  
 시험기간 : 36개월

제조일자 : 2019.04.05  
 제조수량 : 7.9Kg  
 제조처 : (주)KGC에본  
 시험기간 : 2019. 04 - 2022. 04

	시험일	성상	확인		함량	pH	순도시험			건조감량	회분	미생물한도		
			TLC	HPLC			중금속	비소	잔류용매			총조기성미생물수	추진균수	특정미생물시험
기준 개월	년월	이약은 황색의 고운 가루로 흡습성이 있고, 맛은 약간 쓰고 쓴다.	표준액에서 얻은 보라색반점과 생성 및 Rf 값(0.5)이 동일	표준액에서 얻은 주피크의 유지시간과 동일	13.5% 이상	3.6-5.6	30ppm 이하	2ppm 이하	5,000ppm 이하 (에탄올)	10% 이하	5.2% 이하	100,000CFU/g 이하	100 CFU/g 이하	불검출
Initial	2019/04	동일	동일	동일	14.9%	4.6	30ppm 이하	2ppm 이하	592	4.9	3.6	0CFU/g	0CFU/g	불검출
3	2019/07	동일	동일	동일	15.2%	4.5	-	-	-	4.9	-	-	-	-
6	2019/10	동일	동일	동일	15.6%	4.5	-	-	-	5.0	-	0CFU/g	0CFU/g	불검출
9	2020/01													
12	2020/04													
18	2020/10													
24	2021/04													
36	2022/04													

## 2-5. 비임상 효력 시험

### <요약>

DKB120은 100~300PPM 농도에서 용량의존적인 항산화 활성의 증가를 보였고, 1% 제형으로 마리당 100mg을 4주간 처치시 DNCB(1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) 유도 아토피 피부염 마우스 동물 모델과 HDM(House dust mite ointments) 유도 아토피 피부염 마우스 동물모델에서 혈액 및 피부조직 내 염증관련 Cytokines발현을 감소시키고 피부의 표피층 두께와 림프구 침윤 및 비만세포 증식을 저하시켜 피부염증상의 완화와 가려움증을 개선시켜 약물대조군인 0.1 % Hydrocortisone 과 유사한 아토피 피부염 개선효력을 보였음.

DKB120 연고의 효력시험에 대한 자료

시험구분	실험재료	제목	시험기관
in-vitro (항산화 활성, 세포독성)	Human dermal fibroblast(HDF) 및 mouse macrophage(RAW264.7)세포	아토피 유사 피부염 관련 인자들에 미치는 시험물질( <i>Alnus sibirica</i> extracts, AS)의 영향	중앙대학교 의과대학
in-vivo-1 (아토피피부염 동물모델)	BALB/c mice	아토피 유사 피부염 관련 인자들에 미치는 시험물질( <i>Alnus sibirica</i> extracts, AS)의 영향: DNCB 유도 아토피피부염 동물 모델	중앙대학교 의과대학
in-vivo-2 (아토피피부염 동물모델)	NC/Nga mice	아토피 유사 피부염 관련 인자들에 미치는 시험물질( <i>Alnus sibirica</i> extracts, AS)의 영향: House dust mite(HDM, <i>Dermatophagoides farina</i> ) 유도 아토피피부염 동물 모델	중앙대학교 의과대학

### 가. *In vitro*

#### 1) 항산화 활성

##### (1) 시험물질(*Alnus sibirica* extracts; AS) 구성

No	Substrate
AS 1	Barks, Songrim, Korea
AS 2	Leaves, Hamyang, Korea
AS 3	Leaves, Jacheon, Korea
AS 4	Barks, Hamyang, Korea
AS 5	Barks, Jacheon, Korea
AS 6	Barks, reflux extraction, Jacheon, Korea
AS 7	Leaves reflux extraction, Jacheon, Korea
AS 8	Barks, reflux extraction and E.A. fraction, Jacheon, Korea
AS 9	Leaves, reflux extraction and E.A. fraction, Jacheon, Korea

표1. 물오리나무 추출물(AS)의 분류

(2) DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능 측정

- 생체에서 염증반응이 진행되면, NO 및 superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등 일련의 반응산소 중간물질(reactive oxygen species, ROS)이 대량 생산되어 산화적 스트레스가 가중되어 염증반응을 더욱 촉진시킴. 이에 근거하여 시험물질 *Alnus sibirica* extracts (AS)의 항산화 능력 시험을 실시함. 대조군으로는 ascorbic acid (vitamin C)를 사용하였음. 시험물질은 0.2mM DPPH 용액과 시험물질을 1:9 로 혼합한 후 30분 실온에 방치함. 시험물질의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타냄. DPPH 라디칼 소거능 = 100-((시험물질첨가의 흡광도/무첨가군 흡광도)×100)를 적용하였으며, 517nm에서 흡광도를 측정함.
- 시험물질의 항산화 능력은 양성대조군인 ascorbic acid와 비교하였을 때 전체 AS의 30 ppm에서 유의한 변화를 보이지 않았지만, 100 ppm부터 점차 증가하는 경향을 보였음. AS 2, 8, 9의 300 ppm이 양성대조군에 준하는 유의한 항산화 효과를 보였음. 이와 가치를 비교를 위하여 AS 4, 환류 방식 비교를 위하여 AS 6 까지 추가하여 총 다섯 가지로 in vitro 실험을 진행함.

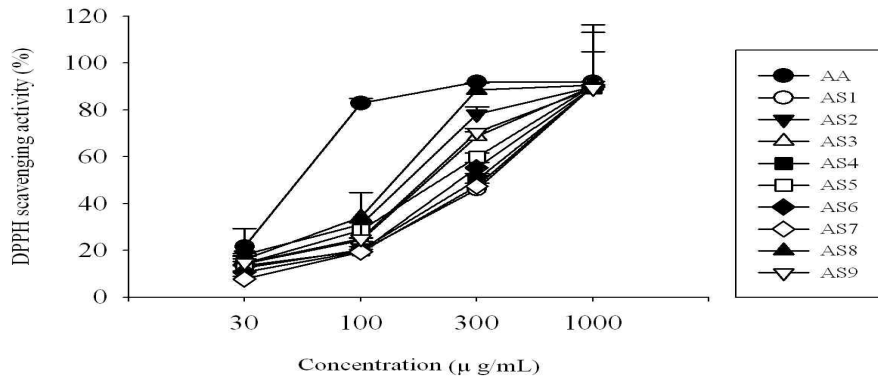


그림1. AS의 DPPH 라디칼 소거능을 통한 항산화 효과

2) 세포독성

(1) 세포

- ① HDF (Human Dermal Fibroblasts): 인간 섬유아세포
- ② RAW264.7 cells (Mouse Macrophages): 마우스 대식세포

(2) MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Assay

- MTT-assay는 살아있는 세포의 mitochondria 활성을 측정함으로써 세포의 viability나 proliferation을 판단하는 방식으로 시험 방법은 대사활성을 통한 세포의 생존능력측정에 기반을 두고 있음. 노란색의 수용성 MTT는 살아있는 세포에서 청보라색의 불용성 formazan으로 바뀌어 대사적으로 감소됨. 살아있는 세포의 수는 formazan을 알코올에 녹인 후 광도를 측정하여 얻은 색상 강도와 관련됨. 생존율이 공시험액의 70 % 미만(<70 %)으로 감소되는 경우, 이는 잠재적으로 세포독성이 있는 것으로 판단함.
- 시험물질(AS 2, 4, 6, 8, 9)은 300ppm 및 1000 ppm의 농도에서 HDF 세포에는 세포독성이 나타나지 않았고, 농도의존적으로 세포증식 효과를 나타냄. 반면에 RAW264.7 cell에는 일부 시험물질 (AS 2, 4)에서 세포독성을 나타냈고, 특히 세포증식을 보인 1000ppm에 비하여 300ppm 농도 12/24시간 처치에서만 증식 억

제를 나타냄.

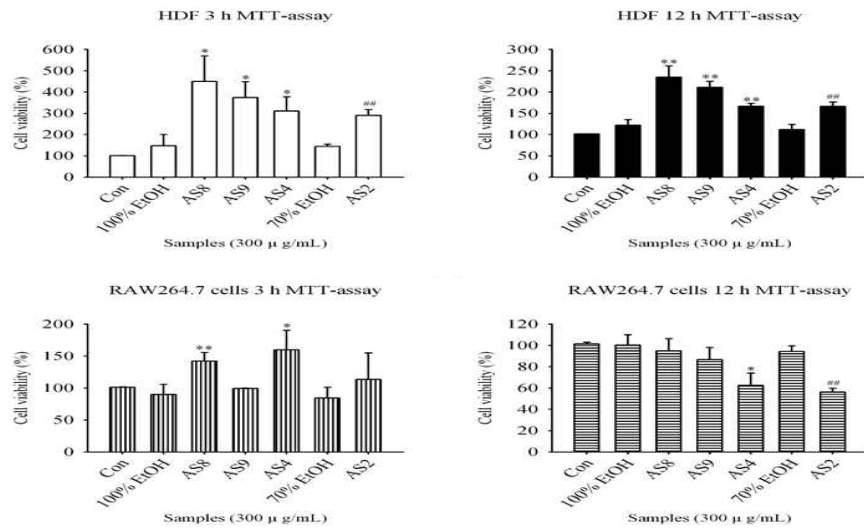


그림2. HDF와 RAW264.7 cell에서 나타나는 AS 2, 4, 8, 9의 MTT-assay 결과

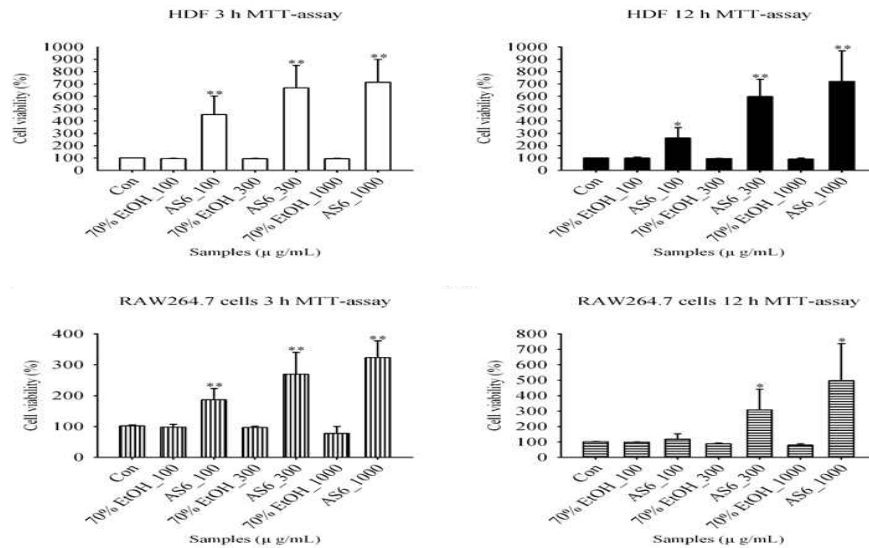


그림3. HDF와 RAW264.7 cell에서 나타나는 AS 6의 MTT-assay 결과

### (3) LDH (Lactase Dehydroganase) Assay

- Lactate dehydrogenase (LDH)는 세포질에 존재하며 glycolysis마지막 단계에서 lactate fermentation에 관여하는 효소임. 세포가 죽으면서 세포막이 전투과성이 되면 LDH가 세포질에서 세포 밖으로 빠져나감. LDH는 세포질에 존재하는 효소로 통상은 세포막을 통과하지 않으나 세포막이 손상되면 세포 외부(배지 중)로 방출됨. 방출된 LDH는 젖산의 탈수소화를 촉매 작용해 pyruvate와 NADH를 생성함. 이 NADH는 diaphorase의 촉매에 의해 테트라졸리움염(INT)을 환원시켜 490 nm의 흡수를 갖는 적색의 formazan 색소를 형성함. 따라서, 생존율이 공시험액의 40% 초과(>40%)로 증가되는 경우, 이는 잠재적으로 세포독성이 있는 것으로 판단함.
- 시험물질(AS 6)은 40% 미만의 효과를 나타냈으므로 세포독성에 영향을 미치지 않는 것이 관찰됨.



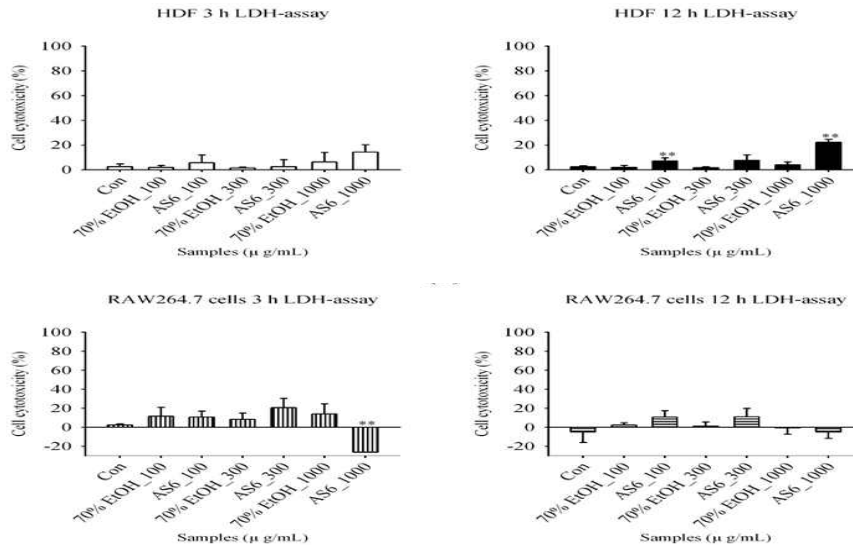


그림4. HDF와 RAW264.7 cell에서 나타나는 AS 6의 LDH-assay 결과

(4) 염증유도

<i>Stimulus</i> (Pro-inflammatory cytokines)	Concentration	Duration
LPS (lipopolysaccharide)	100 ng/ml	3h
IFN- $\gamma$ (interferon gamma)	10 ng/ml	12h
TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha)	10 ng/ml	12h

표2. 세포에 염증을 유도한 자극원(inflammatory stimulant)

(5) 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR; reverse transcription polymerase chain reaction)

- HDF 및 RAW264.7 cells에 pro-inflammatory cytokines를 처리하여 염증 상태를 유도한 세포모델에서 AS 2, 4, 6, 8, 9의 처리가 미치는 염증 완화 효과를 평가하기 위하여 역전사중합효소연쇄반응을 실시함.
- Pro-inflammatory cytokines로 염증이 유도된 HDF에서는 전반적인 inflammatory cytokines의 발현이 증가하는 것이 관찰됨. 이는 시험물질(AS 2, 4, 6, 8, 9)에 의하여 거의 억제되는 것이 관찰됨. 특히, AS 2, 4, 6의 억제 효과가 뛰어남. RAW264.7 cells에서는 일부 cytokine를 제외하고는 LPS에서 HDF와 비슷하게 나타남

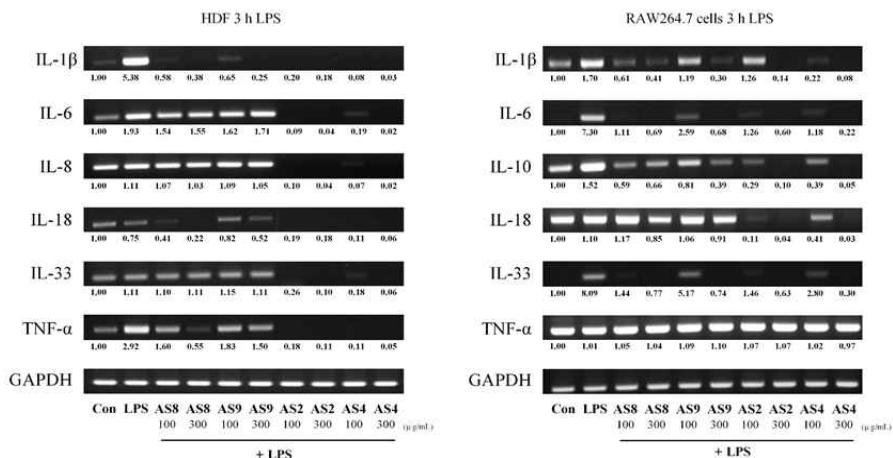


그림5. LPS 유도 HDF와 RAW264.7 cell에서 나타나는 AS 2, 4, 8, 9의 효과

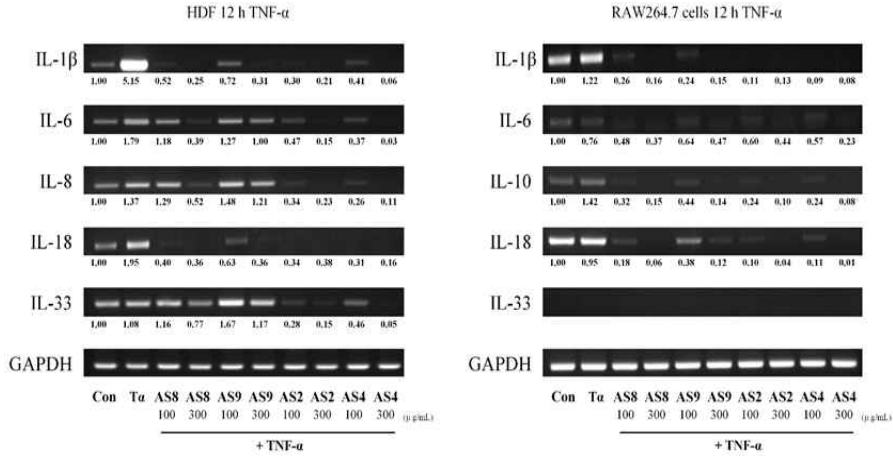


그림6. TNF- $\alpha$  유도 HDF와 RAW264.7 cell에서 나타나는 AS 2, 4, 8, 9의 효과

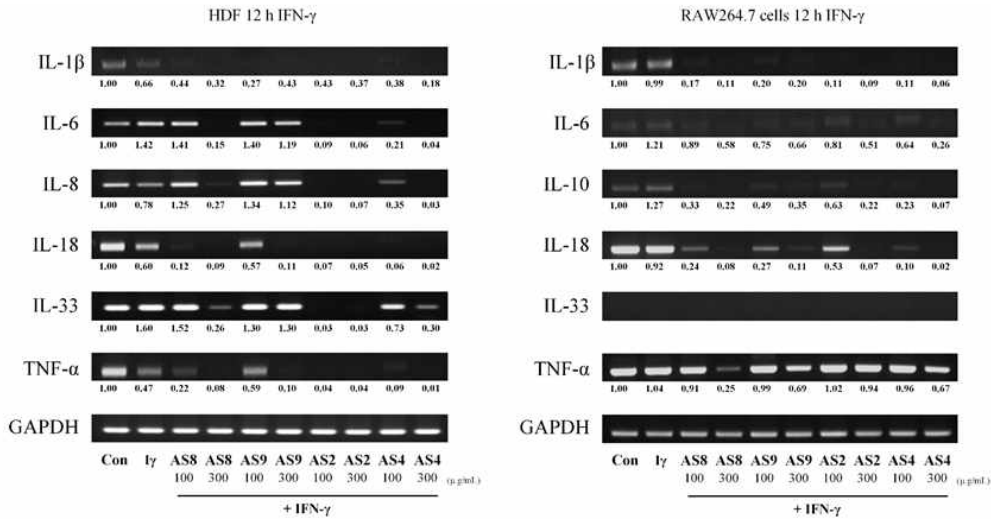


그림7. IFN- $\gamma$  유도 HDF와 RAW264.7 cell에서 나타나는 AS 2, 4, 8, 9의 효과

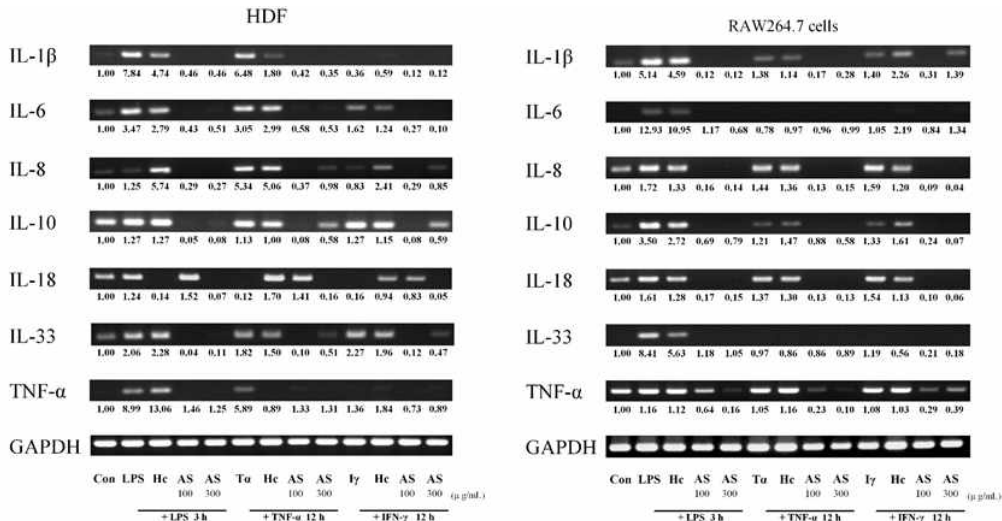


그림8. Inflammatory stimulants 유도 HDF와 RAW264.7 cell에서 나타나는 AS 6의 효과

나. *In vivo*

- 1) 아토피 유사 피부염 관련 인자들에 미치는 시험물질(AS)의 영향  
: DNCB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) 유도 아토피피부염 동물 모델

(1) 시험군 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	처리	투여량
G1	F	6	1-6	정상대조군	-
G2	F	6	1-6	양성대조군	DNCB 200 uL/head
G3	F	6	1-6	약물대조군	Cream 100mg/head
G4	F	6	1-6	부형제대조군	Cream 100mg/head
G5	F	6	1-6	시험물질투여군1(AS6 1%)	Cream 100mg/head
G6	F	6	1-6	시험물질투여군2(AS6 3%)	Cream 100mg/head
G7	F	6	1-6	시험물질투여군3(AS8 1%)	Cream 100mg/head
G8	F	6	1-6	시험물질투여군4(AS8 3%)	Cream 100mg/head

표3. DNCB 유도 BALB/c 모델 마우스 실험의 군(group)분리

(2) 아토피-유사 피부염 모델 제작

- 본 시험법은 6주령이 된 BALB/c mice의 등을 귀 하단부에서부터 꼬리 상단부까지 전체를 제모하고 24시간 방치 후 1%의 DNCB 용액 200 uL를 제모부위에 도포하여 주 2회 반복함. 1% DNCB의 도포 1주후 0.5% DNCB 용액 200uL를 도포하고 주 2회 반복함. 일련의 과정을 총 8주간 반복함. DNCB의 처리 5주차부터는 부형제(cream base) 또는 약물(0.1% Hc) 또는 시험물질(1 또는 3% AS)을 정해진 시간에 100 mg씩 쥐의 등 부위에 도포하여, 주 3/총 4주간 투여한다.

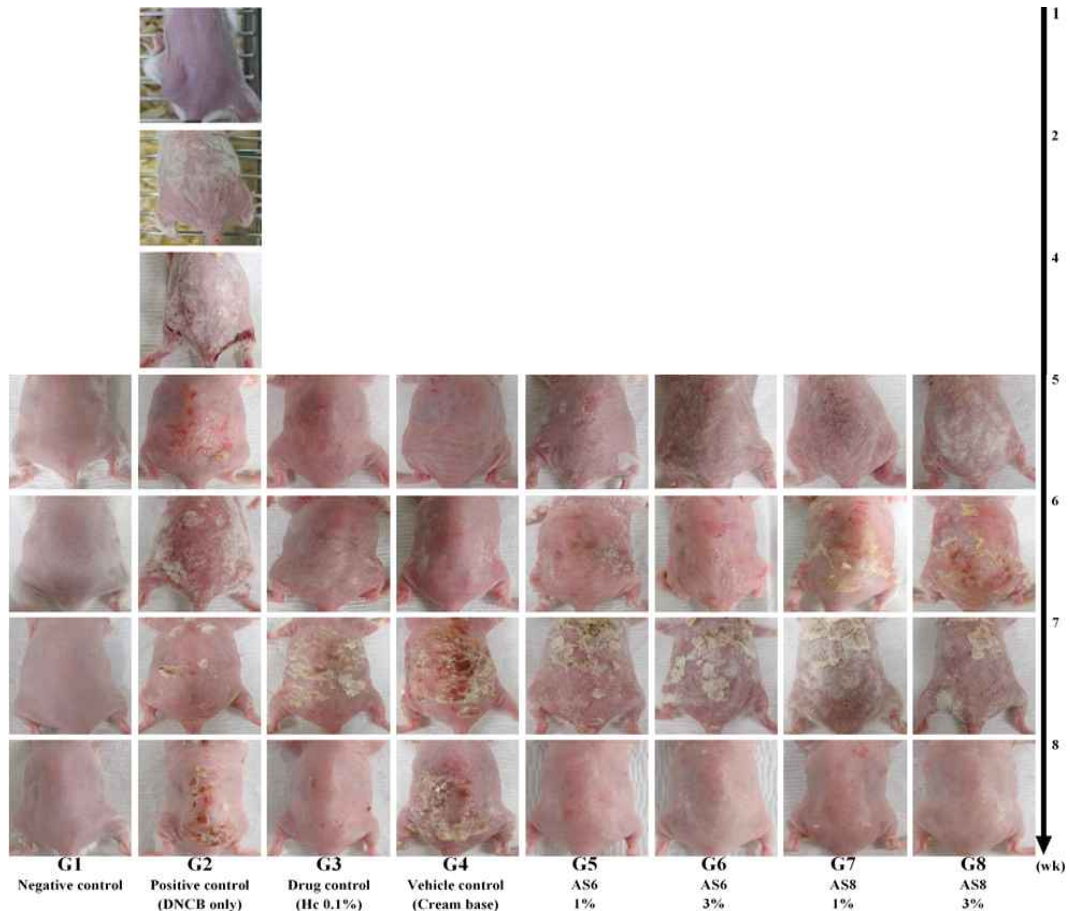


그림9. DNCB 유도 BALB/c 모델 마우스의 임상적 관찰

### (3) 조직병리학적 검사

- 아토피-유사 피부염이 유도된 마우스의 피부에서 AS 6, 8의 효과를 조직학적으로 분석함. 아토피-유사 피부염 발생에 따른 다양한 염증세포의 피부조직 침윤을 관찰을 위해 마우스로부터 피부조직을 분리한 후 조직을 고정하고 H&E (haematoxylin and eosin) 및 TB (toluidine blue)를 이용하여 염색함. 이 염색법을 통하여 시험물질이 염증 반응 및 세포침윤을 감소시키는지 평가함. H&E staining은 전체적인 피부층의 두께 및 lymphocyte infiltration을 분석하며, TB staining을 통하여 염색된 mast cell의 개수로 병변 및 시험물질의 효과를 판별함.

#### ① H&E (haematoxylin and eosin) Staining

- 부검시 등쪽 피부를 적출하고 전자현미경을 이용하여 H&E 염색된 skin layer를 검경함. Leica Software로 얻은 각 배율(x100/x200/x400)의 이미지에서 ROI(region of interest)를 지정해 염색상을 나타내는 면적 내의 임상적 양상을 분석함.
- 시험물질 투여 후에 양성대조군(G2)의 경우 정상대조군(G1)에 비하여 epidermis가 두꺼워지고 lymphocyte infiltration도 확연하게 증가됨. 반면, 스테로이드 약물인 hydrocortisone을 처치한 약물대조군(G3)의 lymphocyte infiltration 및 epidermis thickening이 감소됨. 시험물질투여군(G5-G8)의 경우 epidermis 및 dermis thickening 및 병변이 유의하게 회복되었으며, lymphocyte infiltration이 감소되어 있는 것을 확인함. 상기 결과를 통해 물오

리나무추출물이 스테로이드제에(G3) 준하여 효과적으로 epidermis를 회복하는 것으로 보임.

② TB (toluidine blue) Staining

- TB로 염색된 등쪽 skin layer에 분포된 mast cells를 검경함. Leica Software로 얻은 x100 배율의 이미지에서 ROI(region of interest)를 지정해 염색상을 나타내는 면적 내의 mast cells 합계를 구함.
- TB staining 결과, G1과 비교하여 G2에서 침윤된 mast cell의 수가 급격하게 증가함. 반면에, G2와 비교하여 G3 및 G5-8 (AS 6, 8 1/3%)에서 침윤된 mast cell이 현저하게 감소되었고, 그 정도는 G2과 G5-8이 동등한 수준으로 나타남.

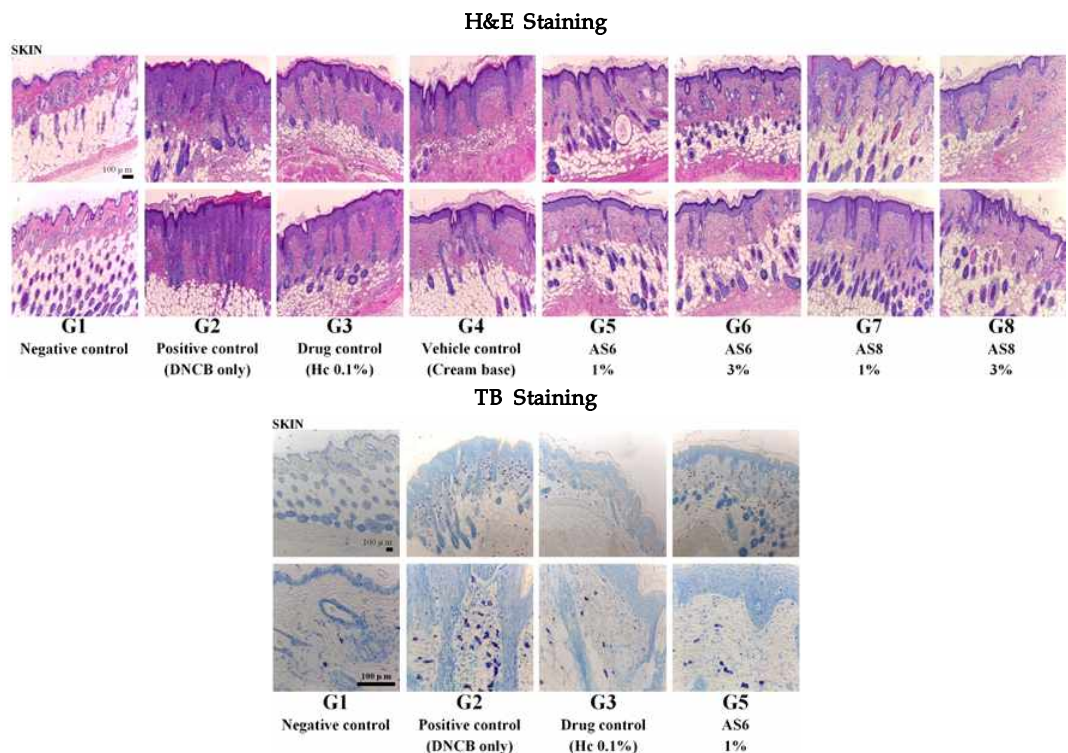


그림10. DNCB 유도 BALB/c 모델 마우스의 조직병리학적 관찰

(4) 혈청학적 검사

- ① Immunoglobulin E (IgE)
- ② Interleukin (IL) 4
- ③ IFN- $\gamma$

- ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)는 항원-항체반응을 이용하여 항원이나 항체를 정성, 정량할 수 있는 감도가 우수한 실험법으로 항체에 효소를 결합시켜 항원항체반응을 확인하는데 기반을 둔. 외인성 자극에 의해 아토피-유사 피부염이 발생한 마우스의 경우 혈중 IgE 농도가 급격하게 증가됨. 또한 염증 정도에 따라 마우스의 혈중 cytokine의 농도 변화를 나타냄. 부검시 채혈하고, ELISA kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA)로 혈액 내 Immunoglobulin E level을 측정하여 시험물질효과를 평가함.
- 정상대조군과 비교하여 모든 시험군에서 IgE의 발현양이 현저하게 증가하였고,

G5-8은 G2 및 G3와 비교하여 개선되는 경향을 나타내었으며 그 정도는 G3 대비 유사한 우수한 효과를 나타냄. 혈중 IL-4 및 IFN- $\gamma$  발현량을 확인한 결과, G1 과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았지만 G2 및 G3에서 IL-4 및 IFN- $\gamma$  발현량이 증가함. 반면에 G3 및 G5-8에서 IL-4 및 IFN- $\gamma$  발현량이 정상수준으로 회복되는 경향을 나타냄.

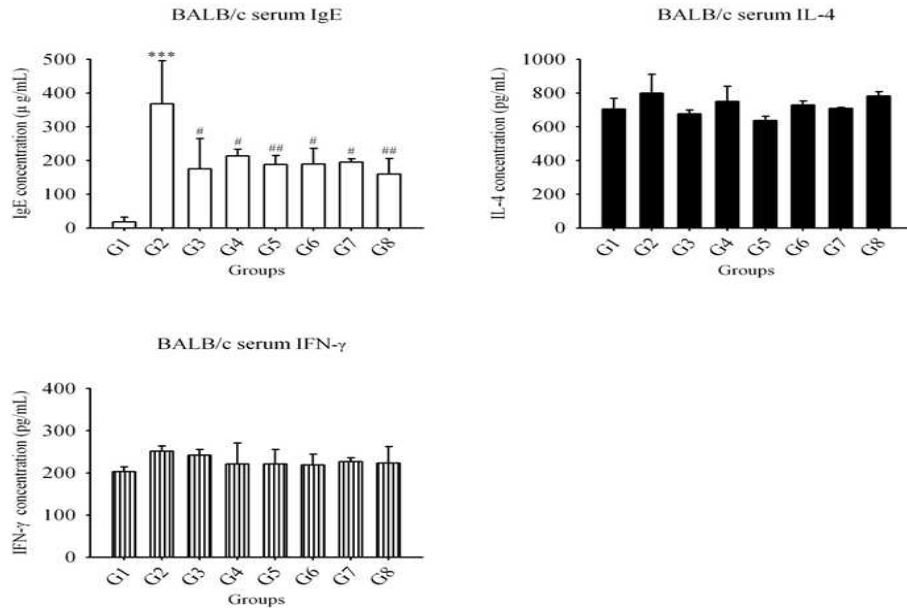


그림11. DNCB 유도 BALB/c 모델 마우스의 혈청학적 관찰

(5) 역전사중합효소연쇄반응

- DNCB 유도 아토피-유사 피부염 모델 마우스의 등쪽 피부조직에서 발현하는 cytokines level을 분석하기 위해 RT-PCR을 수행.
- 마우스 모델의 피부병변조직에서 발현하는 cytokine은 대체로 유의한 변화를 보이지 않음. 다만, G2과 비교할 때, G5-G8에서 발현된 cytokines를 억제하는 경향을 보임.

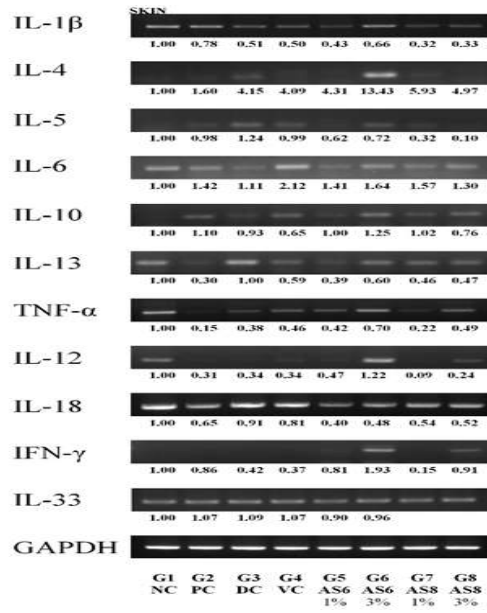


그림12. DNCB 유도 BALB/c 모델 마우스의 분자생물학적 관찰

2) 아토피 유사 피부염 관련 인자들에 미치는 시험물질(AS)의 영향

: HDM (House dust mite ointment; Dermatophagoides farina extracts) 유도 아토피피부염 동물 모델

(1) 시험군 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	처리	투여량
G1	F	6	1-6	정상대조군	-
G2	F	6	1-6	양성대조군	HDM 100 mg/head
G3	F	6	1-6	약물대조군	Cream 100 mg/head
G4	F	6	1-6	시험물질투여군(AS 6 1%)	Cream 100 mg/head

표4. 두 번째 모델 마우스 실험의 군(group)분리

(2) 아토피-유사 피부염 모델 제작

- 본 시험법은 9주령이 된 NC/Nga mice의 목, 귀 등 인접부위를 제모제를 사용하여 깨끗하게 제모한 후(최초 제모시에만 제모제를 사용함), 100 mg의 HDM을 도포함. 이후 도포에서는 효과적인 피부염유도를 위해 제모기기로 제모 후 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) 수용액을 제모 부위에 분사하여 피부의 지방성분 제거 및 큐티클 barrier를 파괴하고, 100 mg의 HDM을 1주일 2회 총 8주간 제모한 피부에 도포하여 아토피-유사 피부염을 유발함. HDM유도 5주차부터 약물(Hc 0.1%) 또는 시험물질(AS 6 1%)을 정해진 시간에 100 mg씩 쥐의 귀와 등부위에 주5회/총 4 주간 투여하였다.

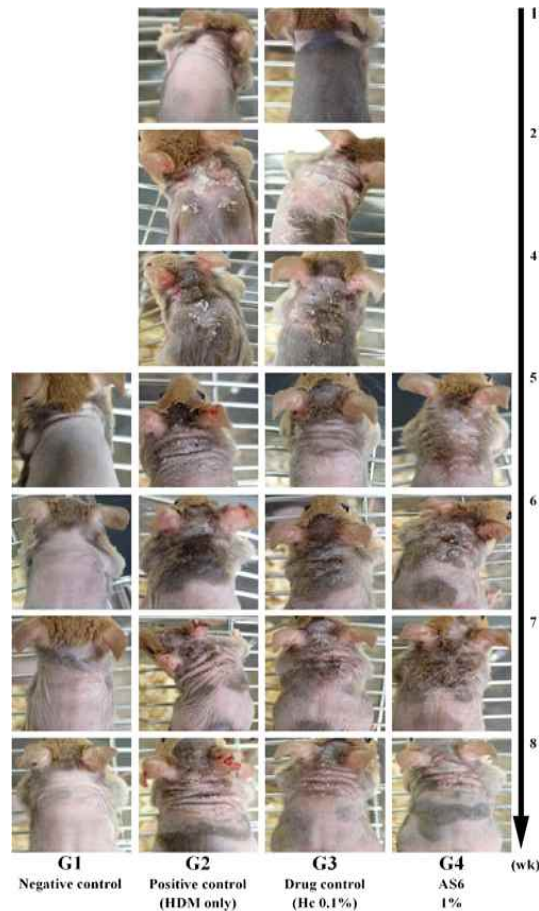


그림13. HDM 유도 NC/Nga 모델 마우스의 임상적 관찰



(3) 조직병리학적 검사

① H&E staining

- 부검시 귀 주변부와 등쪽 피부를 적출하고 전자현미경을 이용하여 H&E 염색된 skin layer를 검경함. Leica Software로 얻은 각 배율(x100/x200/x400)의 이미지에서 ROI(region of interest)를 지정해 염색상을 나타내는 면적 내의 임상적 양상을 분석함.
- H&E staining 결과, 양성대조군(G2)의 경우 정상대조군(G1)에 비하여 epidermis thickening, lymphocyte infiltration이 확연하게 증가됨. 반면, 약물대조군(G3; 스테로이드제제)의 epidermis thickening, lymphocyte infiltration이 감소됨. 시험물질투여군(G4; AS6 1%)의 경우에서도 epidermis 및 dermis thickening, 병변이 유의하게 회복되었으며, lymphocyte infiltration이 감소되어 있는 것을 확인함. 상기 결과를 통해 시험물질인 물오리나무추출물이 약물대조군(G3)에 준하여 효과적으로 epidermis를 회복하는 것으로 보임.

② TB staining

- 부검시 귀 주변부와 등쪽 피부를 적출하고 Toluidine blue로 염색된 skin layer에 분포된 mast cells를 검경함. Leica Software로 얻은 x100 배율의 이미지에서 ROI (region of interest)를 지정해 염색상을 나타내는 면적 내의 mast cells 합계를 구함.
- TB staining 결과, G1과 비교하여 G2에서 침윤된 mast cell의 수가 상대적으로 증가함. 반면에, G2과 비교하여 G3 및 G4에서 침윤된 mast cell이 현저하게 감소되었고, 그 정도는 G3과 G4이 동등한 수준으로 나타남.

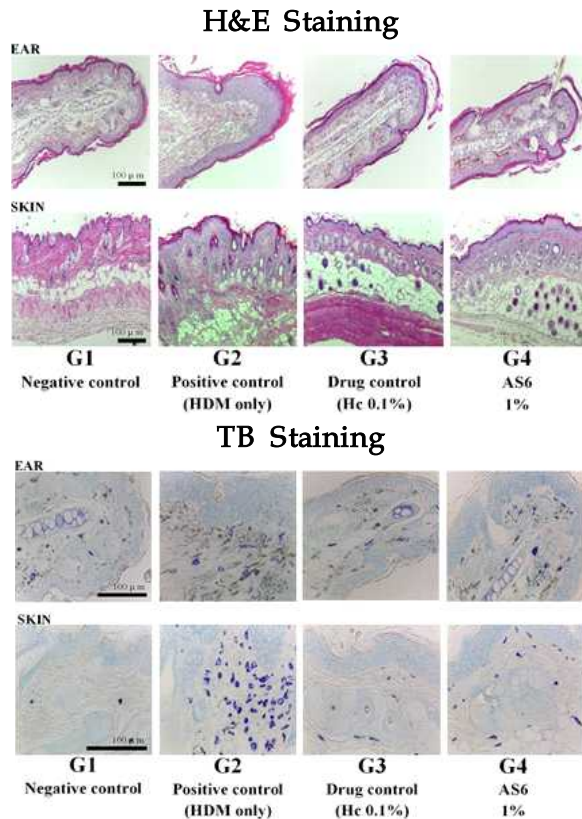


그림14. HDM 유도 NC/Nga 모델 마우스의 조직병리학적 관찰

(4) Scratching Behavior counting Test (SBT) 검사

- 긁는 행동의 관찰을 위해 사육상자와 같은 재질의 플라스틱 상자에 넣어 환경에 적응할 수 있도록 안정시킨 후, 약 15분간 행동을 녹화 및 관찰함. 긁는 행동은 초기, HDM 유도 4 주 후에 실시하였고, 시험물질 적용 후 1회/주 측정함.
- 임상증상 평가를 위하여 scratching behavior 측정결과, 피부염증을 유발한 4주차에 모든 시험군에서 병변부를 긁는 횟수가 G1과 비교하여 유의적으로 증가함. 시험물질투여 기간동안 자연회복에 따라 전체적으로 긁는 횟수가 줄었으나 G3 및 G4에서 G2와 비교하였을 때 긁는 횟수가 유의하게 감소하였거나 일정 수준 감소한 경향을 나타냄.

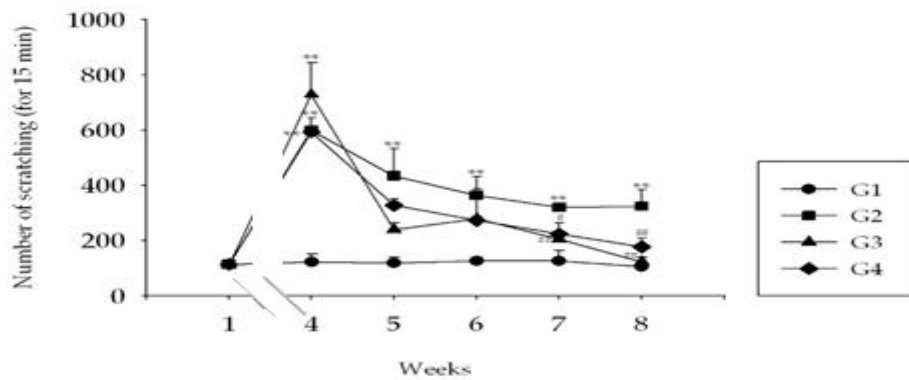
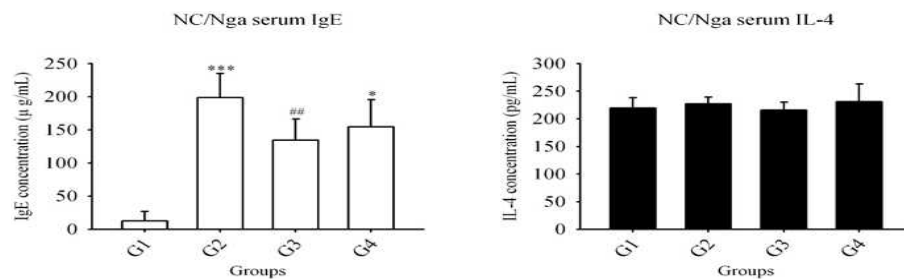


그림15. HDM 유도 NC/Nga 모델 마우스의 임상적 긁기행동 관찰

(5) 혈청학적 검사

- ① IgE
- ② IL-4
- ③ IL-12
- ④ IFN- $\gamma$

- 부검시 채혈하고, ELISA kit를 이용하여 IgE, IL-14, IL-12, and IFN- $\gamma$  level을 측정함.
- 혈중 IgE는 G1과 비교하여 모든 시험군에서 IgE의 발현양이 현저하게 증가하였고, G4는 양성대조군과 비교하여 개선되는 경향을 나타내었으며 그 정도는 G3 대비 우수한 효과를 나타냄. 혈액내 IL-4 및 IFN-gamma 발현양을 확인한 결과, G1과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았지만 IL-12는 G1과 비교하여 양성대조군에서 IL-12의 발현량이 현저하게 증가하였고, G4은 G2와 비교하여 개선되는 경향을 나타내었으며 그 정도는 G3 대비 우수한 효과를 나타냄.



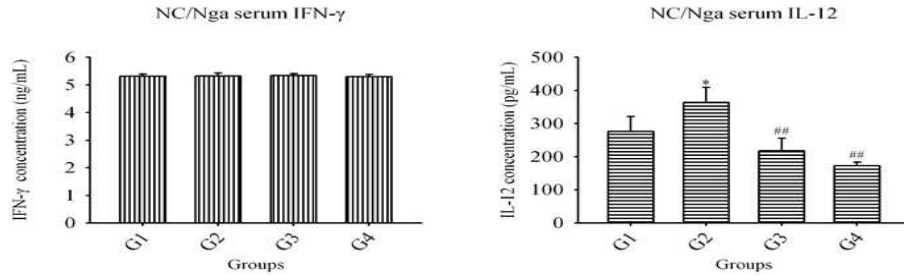


그림16. HDM 유도 NC/Nga 모델 마우스의 혈청학적 관찰

(6) 역전사중합효소연쇄반응

- 모델 마우스의 귀주변부조직 및 등쪽피부조직에서 발현하는 cytokines의 mRNA 변화를 분석하기 위해 RT-PCR을 수행함.
- 등쪽 피부에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았으나, 상대적으로 지방층이 적고 피부 자체의 변화를 관찰이 용이한 귀주변부조직에서 Th2 cytokines와 일부 Th1 cytokines (IL-12, IFN-γ)의 유의한 변화가 관찰됨. G1과 비교하였을 때 G2에서 cytokines의 발현이 증가하였고, G2와 비교하였을 때 G3, G4에서 억제되는 경향을 보임.

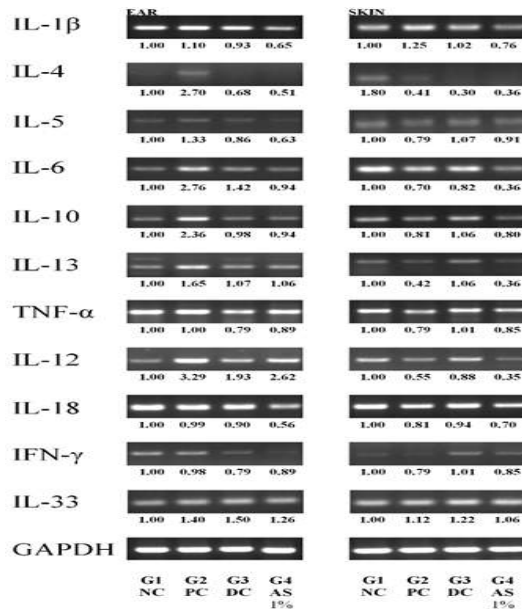


그림17. HDM 유도 NC/Nga 모델 마우스의 분자생물학적 관찰

참조: 효력시험자료 요약

약리 효력시험-항산화 및 세포독성 자료 요약서

시험제목	아토피-유사 피부염 관련 인자들에 미치는 시험물질(Alnus sibirica extract, AS)의 영향																																																																		
자료의 적합성	<input type="checkbox"/> 허가당시제출자료 ( ) <input type="checkbox"/> 전문학회지(Sci) <input checked="" type="checkbox"/> 국내외기관																																																																		
시험기관	중앙대학교																																																																		
시험기간	2017년 5월 ~ 2019년 5월																																																																		
시험목적	시험물질의 in vitro 항산화능 평가 및 Human dermal fibroblast (HDF) 및 mouse macrophage (RAW264.7)세포에서의 세포독성 평가																																																																		
시험물질	성분명 (Code 명)	물오리나무 70% 에탄올건조엑스(DKB120)																																																																	
시험계	1. DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능 측정 2. Human dermal fibroblast (HDF) 및 mouse macrophage (RAW264.7)세포에서의 세포독성																																																																		
시험방법	1. 시험물질 Alnus sibirica extracts (AS)의 항산화 능력 시험을 실시하였다. 대조군으로는 ascorbic acid (vitamin C)를 사용하였다. 시험물질은 0.2mM DPPH 용액과 시험물질을 1:9 로 혼합한 후 30분 실온에 방치하였다. 시험물질의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타냈다. DPPH 라디칼 소거능 = $100 - \left\{ \frac{\text{시험물질첨가의 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}} \times 100 \right\}$ 를 적용하였으며, 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 2. Human dermal fibroblast (HDF) 및 mouse macrophage (RAW264.7)세포에서의 세포독성 측정																																																																		
시험결과	1. 시험물질의 항산화 능력은 AS 100 ppm부터 300 ppm까지 점차 증가하는 경향을 보였다.(DKB120:AS6) <table border="1"> <caption>DPPH Radical Scavenging Activity (%)</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (ppm)</th> <th>ascorbic acid</th> <th>오리가지</th> <th>오리알</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>4</th> <th>8</th> <th>9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>30</td> <td>~20</td> <td>~15</td> <td>~12</td> <td>~10</td> <td>~8</td> <td>~7</td> <td>~6</td> <td>~5</td> <td>~4</td> <td>~3</td> <td>~2</td> <td>~1</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>~80</td> <td>~35</td> <td>~30</td> <td>~25</td> <td>~20</td> <td>~18</td> <td>~15</td> <td>~12</td> <td>~10</td> <td>~8</td> <td>~6</td> <td>~4</td> </tr> <tr> <td>300</td> <td>~90</td> <td>~65</td> <td>~55</td> <td>~45</td> <td>~35</td> <td>~30</td> <td>~25</td> <td>~20</td> <td>~18</td> <td>~15</td> <td>~12</td> <td>~10</td> </tr> <tr> <td>1000</td> <td>~95</td> <td>~85</td> <td>~75</td> <td>~65</td> <td>~55</td> <td>~45</td> <td>~35</td> <td>~25</td> <td>~20</td> <td>~15</td> <td>~12</td> <td>~10</td> </tr> </tbody> </table>		Concentration (ppm)	ascorbic acid	오리가지	오리알	1	2	3	5	6	7	4	8	9	30	~20	~15	~12	~10	~8	~7	~6	~5	~4	~3	~2	~1	100	~80	~35	~30	~25	~20	~18	~15	~12	~10	~8	~6	~4	300	~90	~65	~55	~45	~35	~30	~25	~20	~18	~15	~12	~10	1000	~95	~85	~75	~65	~55	~45	~35	~25	~20	~15	~12	~10
Concentration (ppm)	ascorbic acid	오리가지	오리알	1	2	3	5	6	7	4	8	9																																																							
30	~20	~15	~12	~10	~8	~7	~6	~5	~4	~3	~2	~1																																																							
100	~80	~35	~30	~25	~20	~18	~15	~12	~10	~8	~6	~4																																																							
300	~90	~65	~55	~45	~35	~30	~25	~20	~18	~15	~12	~10																																																							
1000	~95	~85	~75	~65	~55	~45	~35	~25	~20	~15	~12	~10																																																							
시험자 결론	시험물질(DKB120:AS6)은 100~300 ppm 농도에서 항산화능이 있으며 세포독성은 없는 것으로 판단되었다.																																																																		

## 약리 효력시험-생체내 효력시험 요약서 I

시험제목	아토피-유사 피부염 관련 인자들에 미치는 시험물질( <i>Alnus sibirica extract</i> , AS)의 영향	
자료의 적합성	<input type="checkbox"/> 허가당시제출자료 ( ) <input type="checkbox"/> 전문학회지(Sci) <input checked="" type="checkbox"/> 국내외기관	
시험기관	중앙대학교	
시험기간	2017년 5월 ~ 2019년 5월	
시험목적	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)-유도 아토피-유사 피부염 BALB/c mice 모델에서 시험물질의 효능 확인	
시험물질	성분명 (Code 명)	물오리나무 70% 에탄올건조엑스 (DKB120)
시험계	특정병원체 부재(Specific Pathogen Free) 6주령 암컷 마우스, Crlj: BALB/c	
시험방법	DNCB로 피부염을 유발 한 후 1 회/일, 2 주간 시험물질(1% 및 3% 크림제, 100mg) 및 대조물질(0.1% Hydrocortisone 크림제, 100mg)을 군당 6마리씩 처치 한 후 조직병리학적 검사(피부층 두께, Lymphocyte 침윤, Mast cell 개수) 및 혈중 IgE, Cytokine(IL4, INF- $\gamma$ ) 측정	
시험결과	<p>1. 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다. 임상증상 관찰결과 모든 시험물질 처리군(AS 6 1% 및 3%)에서 DNCB로 유발된 아토피 유사 피부염의 증상을 개선시켰고 개선의 정도는 Hydrocortisone 0.1%와 동등 수준이었다.</p> <p>2. 조직병리학 검사결과 모든 시험물질 처리군(AS 6 1% 및 3%)에서 DNCB로 유발된 Epidermis의 두께와 림프구 침윤을 Hydrocortisone 0.1%와 유사한 수준으로 회복시켰으며 AS 6 1%에서는 Mast cell의 감소 또한 Hydrocortisone 0.1%와 유사한 수준으로 관찰되었다.</p> <p>3. 모든 시험물질 처리군(AS 6 1% 및 3%)에서 혈중 IgE의 감소를 보였으며 혈중 INF-gamma 및 IL-4는 약물대조군인 Hydrocortisone 0.1%와 유사한 수준으로 나타났다.</p>	
시험자 결론	DNCB-유도 아토피 피부염 동물모델에서 AS 6 1% 및 3%를 반복 경피 투여 하였을 때, 피부염에 대한 개선효과를 보였으며 이 중 AS 6 1%에서 가장 우수한 개선효과가 있는 것으로 판단되었다	

## 약리 효력시험-생체내 효력시험 요약서 II

시험제목	아토피-유사 피부염 관련 인자들에 미치는 시험물질( <i>Alnus sibirica</i> extract, AS)의 영향	
자료의 적합성	<input type="checkbox"/> 허가당시제출자료 ( ) <input type="checkbox"/> 전문학회지(Sci) <input checked="" type="checkbox"/> 국내외기관	
시험기관	중앙대학교	
시험기간	2017년 5월 ~ 2019년 5월	
시험목적	HDM(House Dust Mite)-유도 아토피-유사 피부염 NC/Nga mice 모델에서 시험물질의 효능 확인	
시험물질	성분명 (Code 명)	물오리나무 70% 에탄올건조엑스 (DKB120)
시험계	특정병원체 부재(Specific Pathogen Free) 9주령 암컷 마우스, NC/Nga mice	
시험방법	HDM으로 피부염을 유발 한 후 1 회/일, 4 주간 시험물질(1% 크림제, 100mg) 및 대조물질(0.1% Hydrocortisone 크림제, 100mg)을 군당 6마리씩 처치 한 후 육안적 피부 반응 평가, 행동(가려움) 검사, 조직병리학적 검사(피부층 두께, Lymphocyte 침윤, Mast cell 개수) 및 혈중 IgE, Cytokine(IL4, IL-12, INF- $\gamma$ ) 측정	
시험결과	<p>1. 육안적 피부평가 결과, DKB-120 투여군은 음성대조군 대비 아토피 피부염 증상이 개선되었고 약물대조군인 0.1 % Hydrocortisone 과 비교하였을 때 동등의 개선효과를 나타내었다.</p> <p>2. Scratching behavior counting test 결과, 약물대조군인 0.1 % Hydrocortisone 에 미치지지는 못하지만 음성대조군에 비해 유의한 개선효과를 나타내었다.</p> <p>3. 혈중 IgE 및 IL-12 는 음성대조군과 비교하여 발현양이 유의하게 (<math>p &lt; 0.05</math>) 감소했고 그 수준은 약물대조군인 0.1 % Hydrocortisone 과 동등한 효과를 나타내었다.</p> <p>4. 병변이 유발된 피부조직(귀 주변조직)에서 염증관련 유전자 발현 정도를 확인한 결과, 시험물질 처리군과 약물대조군인 0.1 % Hydrocortisone 처리군에서 급성 피부염증관련 cytokines 의 발현감소 경향이 관찰되었다.</p> <p>5. 조직병리학적 검사 결과에서 DKB-120 투여부위는 epidermis 두께, lymphocyte infiltration 및 mast cell 수 감소에서 약물대조군인 0.1 % Hydrocortisone 과 동등한 수준의 효과를 보였다.</p>	
시험자 결론	HDM-유도 아토피 피부염 동물모델에서 DKB-120(AS 6 1%)를 마리당 100mg용량으로 매일 4주간 반복경피투여 하였을 때, 육안적 피부 병변의 회복, 혈액 및 피부조직 내 염증관련 cytokines의 감소, 가려움 증상의 개선, 조직병리에서 피부병변의 회복 및 mast cell을 효과적으로 감소시키는 결과를 보이므로 아토피성 피부염 개선에 효과가 있는 것으로 판단되고 그 효력은 약물대조군인 0.1 % Hydrocortisone과 유사하다고 판단된다.	

다. 작용기전

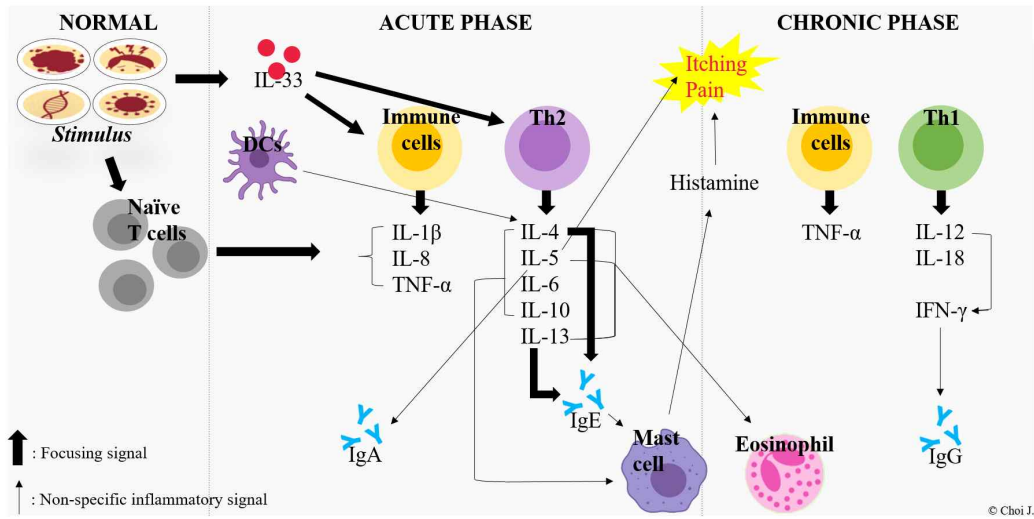


그림18. *In vitro* 및 *in vivo*에서의 염증 진행-심화에 따른 작용 기전

이상의 결과, 물오리나무 추출물은 아토피 피부염이 유발된 마우스의 면역세포로부터 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  mRNA 전사를 억제하고, Th2형에서 생산되는 IL-4, IL-6, IL-10 및 IL-13 mRNA의 전사를 억제함으로써 IgE 생성을 감소시키며, Th1형 세포에서 생산되는 INF- $\gamma$  및 IL-12의 증가로 IgG 우위의 면역반응을 자극하여 염증 및 아토피 반응을 줄이는 기전으로 작용함을 시사해 주고 있다.

## 2-6. 비임상 독성 시험

시험약(DKB120: 물오리나무70%에탄올 건조엑스)에 대한 독성시험은 랫드를 이용한 단회투여독성시험, 반복투여독성시험, beagle dog을 이용한 반복투여독성시험(비설치류), 기니픽을 이용한 피부 감작성 시험, 토끼를 이용한 피부자극시험, 안점막 자극시험을 각각 실시하였으며, 그 결과는 아래와 같음.

<요약>

독성시험 결과 DKB-120를 SD(Sprague-Dawley) 랫드에 단회 경피적용시 개략의 치사량은 2000 mg/kg을 상회 하였으며 4주간 반복 적용시에는 투여부위에서 가피형성과 착색이 관찰되었으나 조직침투에 따른 전신독성은 관찰되지 않아 무독성량 (No observed adverse effect level, NOAEL)은 1000 mg/kg/day로 관찰되었으며 국소적인 투여부위의 소견 또한 회복 2주간 회복되어짐을 보였음.

비설치류 Beagle Dog에서 DKB-120을 4주간 반복하여 경피적용 하였을 때 유의할 만한 독성은 관찰되지 않았고, 무독성량은 1000 mg/kg/day로 관찰되었음.

유전독성시험에서 DKB-120은 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 체외 염색체 이상시험에서 양성반응을 보였으나 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험에서는 복귀돌연변이를 유발하지 않았으며 SD 랫드를 이용한 생체 소핵시험에서는 소핵을 유발하지 않았음.

Hartley계 기니픽을 이용한 피부감작성시험에서 DKB-120은 20% 농도에서 20%의 감작율로 약한 감작성 물질로 판정되었음. New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험에서는 약한자극성 물질로 안점막자극시험에서 세안군은 무자극물, 미세안군은 약 자극물로 평가되었음.

그리고, SD랫드에 단회 경피투여 하였을 때 2000 mg/kg 까지의 용량에서는 중추신경계 및 호흡기계에 미치는 영향이 관찰되지 않았으며 Beagle Dog에 단회 경피투여 하였을 때 1000 mg/kg 까지는 심혈관계에 미치는 영향 또한 관찰되지 않았음. hERG potassium channel에 대한 심혈관계 안전성 약리시험 결과에서 DKB-120의 영향은 관찰되지 않았으며 IC50 값은 200 µg/mL을 상회하는 것으로 관찰되었음.

<물오리나무 70%에탄올건조엑스의 독성시험에 대한 자료>

시험구분	실험재료	결과	시험기관
단회투여독성시험 (1)	Sprague-Dawley 랫드	LD50; 2,000 mg/kg 상회 판단	(주) 캡은 전임상 연구센터
반복투여독성시험 (비설치류)	Beagle dog	NOAEL: 1,000 mg/kg/day	(주) 캡은 전임상 연구센터
반복투여독성시험 (설치류)	Sprague-Dawley 랫드	NOAEL: 1,000 mg/kg/day	(주) 캡은 전임상 연구센터
복귀돌연변이시험	세균	복귀돌연변이 유발 없음	(주) 캡은 전임상 연구센터
소핵시험	ICR 마우스	마우스골수세포 소핵 유발 없음	(주) 캡은 전임상 연구센터
체외염색체이상시험	ATCC #CRL-1935	CHL 세포에 대사활성계 적용 및 비적용의 6시간 시험물질 처리 조건에서 염색체이상을 유발하는 것(양성)으로 판단	(주) 캡은 전임상 연구센터



피부감작성 시험	Hartley계 기니픽	피부감작성은 '약함 (II등급)'으로 판정	(주) 케온 전임상 연구센터
피부자극 시험	New Zealand White계 수컷 토끼	1차 피부자극지수(P. I. I.)가 1.0으로 약한자극성 물질로 평가	(주) 케온 전임상 연구센터
안점막 자극 시험	New Zealand White계 수컷 토끼	세안군은 무자극물, 미세안군은 약 자극물로 평가	(주) 케온 전임상 연구센터

가. 단회투여 독성 시험

DKB120의 급성독성을 평가하기 위해 “의약품등의 독성시험기준(제2017-71호, MFDS, 2017년 08월 30일)과 OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG402(24 Feb 1987) ‘Acute Dermal Toxicity’”에 준하여 시험을 실시하였다(시험기관: (주)케온, 시험번호: 17-RA-0885).

시험방법은 Sprague-Dawley 암·수 랫드에 멸균주사용수로 희석한 DKB120을 500, 1000 및 2000 mg/kg으로 경피투여한 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하여 독성반응을 평가하였다.

1. 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 시험기간 중 일반증상 관찰 결과, 2000 mg/kg 투여군 암컷에서 소상 및 가피형성이 관찰되었다.
3. 시험기간 중 체중을 측정한 결과, 모두 정상적인 체중변화를 보였다.
4. 부검소견 관찰 결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 Sprague-Dawley 랫드에 DKB120을 2000 mg/kg으로 투여한 후 2주간 관찰하였을 때, 소상 및 가피형성이 2000 mg/kg 투여군 암컷에서 관찰되었고, 개략의 치사량은 암수 모두에서 2000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

참조 : 단회투여독성시험자료 요약

나. 반복투여 독성 시험(설치류)

DKB120의 반복투여독성을 평가하기 위하여 “의약품등의 독성시험기준(제2017-71호, MFDS, 2017년 08월 30일), 한약[생약]제제 비임상시험 가이드라인(MFDS, 2017년 08월) 및 OECD Guideline for Testing of chemicals, TG410(12 May 1981) ‘Repeated Dose Dermal Toxicity:21/28-day study’”에 준하여 실시하였다(시험기관: (주)케온, 시험번호: 17-RR-0887).

시험방법으로는 DKB120을 250, 500 및 1000 mg/kg/day로 Sprague-Dawley 랫드의 경피에 4주간 반복투여한 후 독성을 검사하고, 2주간의 회복기간을 두어 회복성 여부 및 독성변화를 평가하였으며 결과는 아래와 같다.

1. 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 시험기간 중 일반증상 관찰결과, 피모 착색, 소상 및 가피형성이 모든 시험물질 투여군에서 관찰되었다.
3. 체중변화, 사료/음수 섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량측정 결과에서 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다.

4. 부검소견에서 모든 시험물질 투여군은 가피형성 및 착색이 관찰되었으나 회복기간에 회복되었다.
5. 조직병리학적 평가 결과, 모든 시험물질 투여군에서 투여부위의 괴사성 조직괴편 및 궤양이 관찰되었으나 회복기간에 회복되었다.

이상의 결과로 보아, Sprague-Dawley 랫드에 DKB120을 4주간 반복하여 경피투여 하였을 때 무독성량은 암·수 모두 확인할 수 없었으며 표적장기는 투여부위로 판단한다. 다만 투여부위를 제외한 전신 변화를 고려했을 때 무독성량(No observed adverse effect level, NOAEL)은 1000 mg/kg/day로 판단하며 표적장기는 관찰되지 않았다.

참조 : 반복투여독성시험자료 요약

다. 반복투여 독성 시험(비설치류)

DKB120의 반복투여독성을 평가하기 위하여 “의약품등의 독성시험기준(제2017-71호, MFDS, 2017년 08월 30일)과 한약[생약]제제 비임상시험 가이드라인(MFDS, 2017년 08월)”에 준하여 실시하였다(시험기관: (주)캠온, 시험번호: 17-DR-889).

시험방법으로는 DKB120을 62.5, 250 및 1000 mg/kg/day로 Beagle Dog의 경피에 4주간 반복투여한 후 독성을 검사하고, 2주간의 회복기간을 두어 회복성여부 및 독성변화를 평가하였으며 결과는 아래와 같다.

1. 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 시험기간 중 일반증상 관찰 결과, 투여부위의 피부발진(Eruption), 사료남김(remaining of food), 구토(vomiting), 연변(soft stool), 설사(diarrhea)는 부형제대조군에서도 관찰되었거나, 용량-반응 상관성이 없거나, 비글견을 이용한 실험에서 관찰될 수 있는 자연스러운 변화로 시험물질 투여와 관련된 독성학적 변화로는 판단되지 않는다.
3. 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리학적 검사에서 일부 통계적으로 유의성 있는 변화( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )가 인정되었으나 용량-반응 상관성이 없거나, 비글견을 이용한 실험에서 관찰될 수 있는 자연스러운 변화로 시험물질 투여와 관련된 독성학적 변화로는 판단되지 않는다.

이상의 결과로 보아 Beagle Dog에 DKB120을 4주간 반복하여 경피투여 하였을 때, 모든 시험군에서 유의할 만한 독성은 관찰되지 않았고, 무독성량은 암·수 모두 1000 mg/kg/day로 판단한다.

참조 : 반복투여독성시험자료 요약

라. 박테리아를 이용한 복귀돌연변이 시험

DKB120의 돌연변이 유발성 유무를 평가하기 위해 “OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG471(21 July 1997) ‘Bacterial Reverse Mutation Test’와 한약[생약]제제 비임상시험 가이드라인(안내서-0290-02, MFDS, 2017년 08월)에 준하여 실시하였다(시험기관: (주)캠온, 시험번호: 17-VG-0891).

시험방법으로는 Salmonella typhimurium의 히스티딘 요구성 4균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 E.Coli의 트립토판 요구성 균주(WP2uvrA)에 DKB120을 50, 150, 500, 1500 및 5000  $\mu$

g/plate로 처리하였고, 시험군은 대사활성계 적용(S9+) 및 비적용(S9-)하에 음성 및 양성대조군과 함께 시험을 수행하였다.

시험결과 TA100, TA1535, TA98, TA1537 및 WP2uvrA의 5개 균주에서 대사활성계 적용 및 비적용 시 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가가 나타나지 않았다.

따라서 DKB120은 본 시험 조건하에 사용한 시험 균주에 대해 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

참조 : 박테리아를 이용한 복귀돌연변이 시험자료 요약

#### 마. 체외 염색체 이상 시험

DKB120이 염색체에 구조적 혹은 수적이상을 유발하는지 평가하기 위해 “OECD Guideline for the Testing of Chemicals. TG 473(2016) ‘in vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test’와 한약[생약]제제 비임상시험 가이드라인(안내서-0290-02, MFDS, 2017년 08월)”에 준하여 실시하였다(시험기관: (주)캠온, 시험번호: 17-VG-0893).

시험방법으로 DKB120의 염색체 이상을 평가하기 위해 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포를 이용하여 대사활성계 적용(S9+) 및 비적용(S9-)하에 음성 및 양성대조군을 포함하여 시험을 수행하였고, 각 시험 군에서의 염색체 이상을 관찰 계수하였다.

시험결과, 대사활성계를 적용한 6시간 시험물질 처리군(50, 100, 190 및 200 µg/mL) 및 대사활성계 비적용한 6시간 시험물질 처리군(40, 80, 150 및 160 µg/mL)에서 염색체의 구조적 이상을 가진 중기상의 출현빈도가 음성대조군 대비 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었고, 용량 의존적으로 증가하였다.

따라서 DKB120은 CHL 세포에 대사활성계 적용 및 비적용의 6시간 시험물질 처리 조건에서 염색체이상을 유발하는 것(양성)으로 판단되었다.

참조 : 체외 염색체 이상시험자료 요약

#### 바. 소핵 시험

DKB120의 생체내 염색체 이상 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 평가하기 위해 “OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG474(2016) ‘Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test’와 한약[생약]제제 비임상시험 가이드라인(안내서-0290-02, MFDS, 2017년 08월)”에 준하여 실시하였다(시험기관: (주)캠온, 시험번호: 17-RG-0895).

시험방법으로 수컷 Sprague-Dawley 랫드에 DKB120을 500, 1000, 2000 mg/kg/day로 1일 1회 2일간 경피투여 하였고, 투여 후 24시간 후에 대퇴골에서 골수 세포를 수거하여 골수검체를 제작 후 소핵 유발빈도 및 세포독성을 평가하였다. 세포독성은 PCE(polychromatic erythrocyte):RBC 비율이 음성대조군 대비 유의한 감소가 있는지를 평가하였고, 소핵유발빈도는 동물당 4000개의 PCE를 계수하면서 그 중 소핵을 가진 다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 수를 계수하여 음성대조군 대비 유의한 증가가 나타내는지를 평가하였다.

시험결과, DKB120을 투여한 모든 시험군에서 소핵 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 또한 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 비율도 시험물질을 투여한 시험군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 따라서 DKB120은 본 시험조건 하에서 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는것으로 판단된다.

참조 : 소핵시험자료 요약

#### 사. 피부 감작성 시험

DKB120의 피부감작성을 평가하기 위해 “의약품등의 독성시험기준(제2017-71호, MFDS, 2017년 08월 30일)”에 준하여 실시하였다(시험기관: ㈜캠온, 시험번호: 17-GI-0901).

시험방법은 Hartley계 기니픽을 이용하고 DKB120을 20 % 농도로 경피에 적용하여 1회씩 3주간 3회 감작을 시켰다. 최종 감작 2주 후, 24시간 및 48시간의 피부반응 및 피부감작성을 평가하였으며 결과는 아래와 같다.

1. 시험기간 중 일반증상 관찰결과, 특이한 임상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 시험기간 중 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.
3. 시험물질 투여군 중 10례 중 2례의 야기부위에서 홍반이 관찰되었다.

따라서 Hartley계 기니픽에서 DKB120의 20 % 농도에서의 20 %의 감작율을 보여 피부감작율은 ‘약함 (II 등급)’으로 판정되었다.

참조 : 피부감작성시험자료 요약

#### 아. 피부 자극 시험

DKB120의 피부자극 반응을 평가하기 위해 “의약품등의 독성시험기준(제2017-71호, MFDS, 2017년 08월 30일)”에 준하여 실시하였다(시험기관: ㈜캠온, 시험번호: 17-BL-0902).

시험방법은 New Zealand White계 수컷 토끼를 이용하여 0.5 g의 DKB120을 비찰과피부 및 찰과 피부에 1회 24시간 적용하고, 시험물질 처리 후 24시간, 72시간째에 도포 국소부위의 홍반, 부종, 가피형성 정도를 평가하였다.

1. 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 시험기간 중 시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.
3. 시험기간 중 일반증상 관찰결과, DKB120 적용 24시간째 비찰과피부에서 grade 2인 분명한 홍반(well-defined erythema)이 관찰되었고, 찰과피부에서 grade 2인 분명한 홍반, grade 3인 약간 심한 홍반(moderate to severe erythema) 및 grade 1인 아주 가벼운 부종(very slight edema)과 grade 2인 가벼운 부종(slight edema)이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아, 본 시험조건 하에 DKB120은 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험에서 1차 피부자극지수(P. I. I.)가 1.0으로 약한자극성 물질로 평가되었다.

참조 : 피부자극 시험자료 요약

자. 안점막 자극 시험

DKB120의 안점막자극 반응을 평가하기 위해 “의약품등의 독성시험기준(제2017-71호, MFDS, 2017년 08월 30일)”에 준하여 실시하였다(시험기관: (주)켄온, 시험번호: 17-BL-0903).

시험방법은 New Zealand White계 수컷 토끼를 이용하여 0.1 g의 DKB120을 1회 적용 후, 세안군은 생리식염 주사액으로 세안하고 미세안군은 그대로 두어 7일간 관찰하면서 안구에서의 자극성을 평가하였고 결과는 아래와 같다.

1. 시험기간 동안 체중의 이상변화는 관찰되지 않았다.
2. 시험기간 동안 관찰된 결막발적, 결막부종 및 배출물은 시험물질에 의한 것으로 판단하였다.
3. 시험물질 적용 후 안반응 관찰결과, 급성 안자극지수 I.A.O.I(The index of Acute Ocular Irritation)는 세안군 0, 미세안군 9.3으로 산출되었다.

이상의 결과에서 본 시험조건 하에 DKB120의 New Zealand White계 수컷 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과, 세안군은 무자극물, 미세안군은 약 자극물로 평가되었다.

참조 : 안점막 자극 시험자료 요약

**참조: 독성시험자료 요약**  
**랫드 단회독성 시험자료 요약서**

		Study No.	17-RA-0885							
1. 시험명	DKB120의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험									
2. 시험책임자	김정우									
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소									
4. 시험기간	2018년 09월 21일 - 2018년 12월 19일									
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No									
6. 시험물질(성분명)	DKB120(물오리나무 70% 에탄올건조엑스)					Lot No.		APD180427		
7. 시험동물	종		<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타(SPF 토끼)							
	계통		Sprague-Dawley 랫드							
	동물수	수컷	20 마리				암컷	20 마리		
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피)									
9. 투여기간	1회 단회 투여									
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> colloid									
11. 투여 용량	한계용량인 2000 mg/kg을 고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비 2로 500 및1000 mg/kg을 설정하였다. 또한, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.									
12. 실험내용	실험군	(1)		(2)		(3)		(4)		
	투여농도	0mg/kg		500mg/kg		1,000mg/kg		2,000mg/kg		
	실험동물 (M/F)	M	F	M	F	M	F	M	F	
	군당 동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	
	사망동물수	-	-	-	-	-	-	-	-	
13. 평가	사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견									
14. 결과	1) 실험기간 중 시험물질 투여 후 사망동물은 관찰되지 않았다. 2) 일반증상 관찰 결과, 소상이2000 mg/kg 투여군암컷2 레에서Day 3-4에 관찰되었고, 가피형성이2000 mg/kg 투여군암컷2 레에서Day 5-9에 관찰되었다. 3) 체중변화 관찰결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 4) 부검소견 관찰 결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.									
15. 결론	DKB120을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여하였을때, 본시험조건 하에서시험물질에 의한 영향으로 소상 및 가피형성이 2000 mg/kg 투여군 암컷에서 관찰되었고, 개략의치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두에서 2000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.									

## 랫드 2주 반복 DRF 독성 시험자료 요약서

		Study No.	17-RR-0886									
1. 시험명	DKB120의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 2 주 반복 경피투여 DRF 독성시험											
2. 시험책임자	최민지											
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소											
4. 시험기간	2018년 11월 20일 - 2019년 09월 10일											
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No											
6. 시험물질 (성분명)	DKB120(물오리나무70%에탄올건조엑스)					Lot No.		APD180427				
	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타										
7. 시험동물	계 통		Sprague-Dawley 랫드									
	동물수	수 컷	25 마리				암 컷	25 마리				
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피투여)											
9. 투여기간	1회/일, 7일/주, 2주간											
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid											
11. 투여용량	한계용량 2000 mg/kg/day를 최고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비를 2로 하여 2개의 용량군으로 설정하였으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.											
12. 실험내용	투여 용량(mg/kg/day)	0		250		500		1000		2000		
	실험동물 (M/F)	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
	군당 동물수	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
13. 평가	사망을 포함한 일반증상 관찰, 체중 변화, 사료 및 물섭취량 산출, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견관찰											
14. 결과	<p>1) 일반증상 관찰 결과, 모든 시험물질 투여군 암수 전 레에서 투여부위 피모의 착색화가 관찰되었고, 암컷 250 또는 500 mg/kg/day 투여군에서 소장 및 가피형성이 관찰되었다.</p> <p>2) 체중측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.</p> <p>3) 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.</p> <p>4) 물섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.</p> <p>5) 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.</p> <p>6) 요검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.</p> <p>7) 혈액학적 검사 결과, MCHC가 250 mg/kg/day 이상 투여군 수컷에서 유의하게 감소하였고, MPV가 1000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 유의하게 증가하였다.</p> <p>8) 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.</p> <p>9) 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.</p> <p>10) 부검소견 결과, 투여부위에서 일부 가피가 부형제대조군 수컷에서 2 레, 250 mg/kg/day 투여군 수컷 2 레, 500 mg/kg/day 투여군 수컷 3 레 및 암컷 2 레, 1000 mg/kg/day 투여군 수컷 3 레 및 암컷 1 레 관찰되었고, 2000 mg/kg/day 투여군 수컷 4 레 및 암컷 1 레 관찰되었다.</p> <p>투여부위의 피모 일부 연한 갈색으로 착색 소견이 250 mg/kg/day 이상 투여군 암수 전 레에서 관찰되었다.</p>											

## 랫드 4주 반복 독성 시험자료 요약서

		Study No.	17-RR-0887							
1. 시험명	DKB120의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주간 반복 경피투여 독성시험 및 2주 회복시험									
2. 시험책임자	김선돈									
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소									
4. 시험기간	2019년 01월 09일 - 2019년 09월 10일									
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No									
6. 시험물질(성분명)	DKB120(물오리나무 70%에탄올건조엑스)					Lot No.		APD180427		
	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타								
7. 시험동물	계 통 Sprague-Dawley 랫드									
	동물수	수 컷	50 마리			암 컷	50 마리			
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피투여)									
9. 투여기간	1회/일, 7일/주, 4주간									
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid									
11. 투여용량	2주 DRF 시험을 근거로 1000 mg/kg/day를 최고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비를 2 로 하여 2개의 용량군으로 설정하였으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.									
12. 실험내용	투여 용량(mg/kg/day)	0		250		500		1000		
	실험동물 (M/F)	M	F	M	F	M	F	M	F	
	군당 동물수	15	15	10	10	10	10	15	15	
13. 평가	사망을 포함한 일반증상 관찰, 체중 측정, 사료 및 물섭취량 산출, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견 관찰, 조직병리학적 검사									
14. 결과	1) 사망동물 및 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다. 2) 일반증상 관찰 결과, 피모착색, 소상 및 가피형성이 모든 시험물질 투여군에서 관찰되었다. 3) 체중 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 4) 사료 및 물섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 5) 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 6) 요검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 7) 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 8) 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 9) 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 10) 부검소견 관찰 결과, 모든 시험물질 투여군에서 투여부위의 가피형성 및 연한 갈색 착색이 관찰되었으나, 회복기간에 회복되었다. 11) 조직병리학적 검사 결과, 모든 시험물질 투여군에서 투여부위의 괴사성 조직과편 및 궤양이 관찰되었으나, 회복기간에 회복되었다.									
15. 결론	투여부위를 제외한 전신적 영향을 고려한 본 시험조건하에서 시험물질 DKB120의 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 1000 mg/kg/day로 판단하며, 독성학적인 표적장기는 관찰되지 않았다. 투여부위에서의 독성평가에서 무독성량은 확인 할 수 없었으며 표적기관으로는 투여부위로 판단한다.									



## 비글 2주 DRF 반복 독성 시험자료 요약서

		Study No.	17-DR-0888									
1. 시험명	DKB120의 Beagle dog을 이용한 2주간 반복 경피투여 DRF 독성시험											
2. 시험책임자	차승범											
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소											
4. 시험기간	2018년 10월 10일 - 2019년 01월 10일											
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No											
6. 시험물질(성분명)	DKB120(물오리나무 70%에탄올건조엑스)					Lot No.		APD180427				
7. 시험동물	종		<input type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input checked="" type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타									
	계통		Beagle dog									
	동물수		수컷		5 마리		암컷		5 마리			
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피투여)											
9. 투여기간	1회/일, 7일/주, 2주간											
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid											
11. 투여용량	한계용량인 1000 mg/kg/day를 최고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비를 2 로 하여 3 개의 용량군으로 설정하였으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.											
12. 실험내용	실험군		(1)		(2)		(3)		(4)		(5)	
	투여 용량 (mg/kg/day)		0		125		250		500		1,000	
	실험 동물 (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	군당 동물수		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	사망동물수		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. 평가	사망을 포함한 일반증상 관찰, 체중 및 사료섭취량 측정, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견 관찰											
14. 결과	1) 사망동물은 관찰되지 않았다. 2) 일반증상 관찰 결과, 투여부위 피부의 발진이 125 mg/kg/day 투여군 수컷, 250 mg/kg/day 투여군 암컷을 제외한 모든 시험물질 투여군 암수에서 관찰되었다. 3) 체중측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 4) 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 5) 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 6) 요검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 7) 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 8) 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 9) 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 10) 부검소견 관찰 결과, 투여부위 피부의 가피가 125 mg/kg/day 투여군 암수에서 관찰되었다.											
15. 결론	시험물질에 의한 영향으로 125 mg/kg/day 투여군 수컷과 250 mg/kg/day 투여군 암컷을 제외한 모든 시험물질 투여군 암수의 일반증상에서 투여부위 피부의 발진 또는 가피가 관찰되었으며, 125 mg/kg/day 투여군 암수의 부검소견에서 투여부위 피부의 가피가 관찰되어 4주반복 투여 독성시험의 용량은 1000 mg/kg/day를 고용량군으로 설정하고, 그 아래로 공비를 2 로 하여 2 개의 군을 설정											

## 비글 4주 반복 독성 시험자료 요약서

	Study No.	17-DR-0889			
1. 시험명	DKB120의 Beagle dog을 이용한 4주간 반복 경피투여 독성시험 및 2주 회복시험				
2. 시험책임자	차승범				
3. 시험기관	(주)켄온 비임상연구소				
4. 시험기간	2019년 01월 21일 - 2019년 06월 19일				
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No				
6. 시험물질 (성분명)	DKB120(물오리나무 70%에탄올건조엑스)		Lot No.	APD180427	
7. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input checked="" type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타			
	계통	Beagle dog			
	동물수	수컷	16 마리	암컷 16 마리	
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피투여)				
9. 투여기간	1회/일, 7일/주, 4주간				
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid				
11. 투여용량	독성이 예측되는 1000 mg/kg/day를 최고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비를 4 로 하여 2개의 용량군으로 설정하였으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.				
12. 실험내용	실험군	(1)	(2)	(3)	(4)
	투여 용량(mg/kg/day)	0	62.5	250	1000
	실험동물 (M/F)	M   F	M   F	M   F	M   F
	군당 동물수	5   5	3   3	3   3	5   5
13. 평가	사망을 포함한 일반증상 관찰, 체중 및 사료섭취량 측정, 안과학적 검사, 심전도 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견, 조직병리학적 검사				
14. 결과	1) 사망동물 및 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다. 2) 체중측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 3) 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 4) 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 5) 심전도 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 6) 요검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 7) 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 8) 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 9) 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 10) 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 11) 조직병리학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.				
15. 결론	시험물질 DKB120의 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 암수 모두 1000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 확인되지 않았다.				

## 유전독성 박테리아 복귀돌연변이 시험 자료 요약서

		Study No.	17-VG-0891				
1. 시험명	DKB120의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험						
2. 시험책임자	오정자						
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소						
4. 시험기간	2019년 01월 14일 - 2019년 08월 28일						
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No						
6. 시험물질 (성분명)	DKB120(물오리나무 70%에탄올건조엑스)	Lot No.	APD180427				
7. 시험계	Salmonella typhimurium의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 E. coli의 트립토판 요구성 균주(WP2 uvrA) 대사활성계로는 Aroclor 1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보조소(cofactor)를 첨가한 것을 사용						
8. 시험방법	Direct plate incorporation 방법						
9. 물질 처리	균배양액 0.1 mL, 시험물질 용액 0.1 mL을 혼합하여 minimal glucose agar plate에 접종						
10. 투여형태	<input checked="" type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid						
11. 처리농도	최고농도균에서도 Top agar와 혼합시 침전이 생성되지 않아 50, 150, 500, 1500 및 5000ul/plate의 농도처리균을 설정하였다. (양성대조: SA, 2-AA, 2-NF, 4NQO, ICR-191, B[a]P)						
	균주명	S9	농도균(ug/plate)				
	TA strains	+/-	50	150	500	1500	5000
	W P 2 uvrA	+/-	50	150	500	1500	5000
12. 평가	시험물질 DKB120이 대사활성계 적용 및 비적용 하에 Salmonella typhimurium의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 E. coli의 트립토판 요구성 균주(WP2 uvrA)에 복귀돌연변이 유발능 평가(모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 집락수의 증가 및 포독성 관찰)						
13. 결과	1) 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 집락수의 증가는 관찰되지 않았으며, 세포독성도 관찰되지 않았다. 2) 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비해 집락수의 확실한 증가가 관찰되었다.						
14. 결론	시험물질 DKB120은 본 시험조건 하에서 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.						

## 유전독성 체외 염색체 이상 시험자료 요약서

		Study No.	17-VG-0893		
1. 시험명	DKB120의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 체외 염색체 이상시험				
2. 시험책임자	오정자				
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소				
4. 시험기간	2019년 01월 14일 - 2019년 08월 28일				
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No				
6. 시험물질 (성분명)	DKB120(물오리나무 70%에탄올건조엑스)	Lot No.	APD180427		
7. 시험계	암컷 Chinese hamster의 폐섬유아세포에서 유래한 CHL/IU 세포주 사용 대사활성계로는 Aroclor 1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보조소(cofactor)를 첨가한 것을 사용 양성대조군으로 Benzo[a]pyrene 혹은 4-Nitroquinoline-1-oxide				
8. 처리 기간	처리계열-1: 대사활성계 적용 6 시간 처리 - 18 시간 회복 처리계열-2: 대사활성계 비적용 6 시간 처리 - 18 시간 회복 처리계열-3: 대사활성계 비적용 24 시간 처리 - 0 시간 회복				
9. 투여형태	<input checked="" type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid				
10. 처리농도	RICC(Relative Increase in Cell Count) 값이 $45 \pm 5$ % 일 것으로 추정되는 높은 농도를 근거로 처리농도 설정				
	Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Positive control and dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
	1	+	6-18	0, 50, 100, 190, 200	B[a]P 20
	2	-	6-18	0, 40, 80, 150, 160	4NQO 0.4
	3	-	24-0	0, 30, 60, 110, 120	4NQO 0.4
11. 평가	활발히 증식 중인 세포를 트립신으로 분리 후, 배양액에 파종하여 약 3 일간 배양한 후 시험물질을 처리 한 후 염색체 검체를 제작하여, 플라스크당 150 개 (농도군당 300 개)의 중기상으로부터 염색체이상을 계수				
12. 결과	1) 대사활성계 적용 및 비적용의 6 시간 시험물질 처리군에서 구조적인 염색체이상을 가진 중기상의 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었고, 용량의존적으로 증가하였으며, 음성대조군의 historical control data 범위를 벗어났다. 2) Benzo[a]pyrene 혹은 4-Nitroquinoline-1-oxide를 처리한 모든 양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도가 증가하여 확실한 양성의 결과를 얻었다.				
13. 결론	DKB120은 본 시험에 사용한 CHL 세포에 대사활성계 적용 및 비적용의 6 시간 시험물질 처리 조건에서 염색체 이상을 유발하는 것으로 사료되며, 명백한 양성으로 판단된다.				

## 유전독성 랫드 체내소핵 시험 자료 요약서

	Study No.	17-RG-0895
1. 시험명	DKB120의 수컷 Sprague-Dawley 랫드 골수세포를 이용한 경피투여 체내 소핵시험	
2. 시험책임자	오정자	
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소	
4. 시험기간	2019년 02월 13일 - 2019년 08월 28일	
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
6. 시험물질(성분명)	DKB120(물오리나무 70%에탄올건조엑스)	Lot No. APD180427
7. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타
	계통	Sprague-Dawley 랫드
	동물수	수컷    30 마리    암컷    - 마리
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피투여)	
9. 투여기간	1 회/일, 약 24 시간 간격으로 2 일간 투여	
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid	
11. 투여용량	2000 mg/kg/day를 최고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비를 2 로 하여 2 개의 용량군으로 설정하였으며, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다. (양성대조군에는 Cyclophosphamide monohydrate, CPA)	
12. 실험내용	실험군	음성대조    저용량    중용량    고용량    양성대조
	투여 용량 (mg/kg/day)	0    500    1000    2000    40(CPA)
	실험 동물 (M/F)	M    M    M    M    M
	군당 동물수	6    6    6    6    6
13. 평가	최종 투여로부터 약 24 시간 후에 대퇴골에서 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가, (개체 당 4000 개의 PCE (polychromatic erythrocyte, 다염성적혈구) 중 MNPCE (micronucleated polychromatic erythrocyte, 소핵을 가진 다염성적혈구)의 수를 계수)	
14. 결과	1) 모든 시험물질 투여군에서 MNPCE의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 용량상관성이 없었으며, 음성대조군의 Historical control data범위 내에 있었다. 2) 세포독성은 PCE:RBC (red blood cell, 적혈구) 비율을 산출하여 평가하였다. 개체당 500 개의 총 적혈구로부터 세포독성을 평가한 결과, 이 비율은 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었다. 3) 양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었다.	
15. 결론	시험물질 DKB120은 본 시험조건 하에서 Sprague-Dawley 랫드의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다.	

## 기니픽 감작성 시험자료 요약서

		Study No.	17-GI-0901	
1. 시험명	DKB120의 Hartley계 기니픽을 이용한 피부감작성시험(Buehler 법)			
2. 시험책임자	길기현			
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소			
4. 시험기간	2018년 08월 30일 - 2019년 08월 28일			
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No			
6. 시험물질(성분명)	DKB120(물오리나무 70%에탄올건조엑스)		Lot No.	APD180427
7. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input checked="" type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타		
	계통	Hartley계 기니픽		
	동물수	수컷	20 마리	암컷                      - 마리
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피투여)			
9. 투여기간	감작: 주 1 회씩 3 주간 3 회 야기: 최종 감작 2주 후 1회			
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid			
11. 투여용량	수컷 기니픽 2 마리에 20 과 40 % 농도로 예비투여를 실시한 결과, 피부자극이 관찰되지 않았고, 시험물질의 피부에 착색 등의 물리적 변화를 고려하여 감작 및 야기 투여농도를 20 %로 설정하였다.			
12. 실험내용	실험군	부형제대조군	시험군	양성대조(DNCB)
	감작 용량	0	20%	0.1%
	야기 용량	20%	20%	0.1%
	군당 동물수	5	10	5
13. 평가	시험물질을 20 % 농도로 적용하여 감작 및 야기 한 후, 야기처치 제거 후 24 및 48 시간의 피부반응을 평가하여, 이를 기초로 피부감작성을 평가하였다. 피부반응 및 피부감작성을 비교 평가하기 위해 부형제대조군 및 양성대조군을 두었다.			
14. 결과	시험물질 투여군 10례 중 2 례의 야기부위에서 홍반이 관찰되었다.			
15. 결론	DKB120의 20 % 농도에서의 피부감작용은 '약함'(II 등급)으로 판정하였다.			

## 안점막 자극 시험자료 요약서

	Study No.	17-BL-0903
1. 시험명	DKB120의 New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막 자극시험	
2. 시험책임자	길기현	
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소	
4. 시험기간	2018년 08월 02일 - 2018년 08월 28일	
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
6. 시험물질(성분명)	DKB120 (물오리나무 70% 에탄올건조엑스)	Lot No.      APD180427
7. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input checked="" type="checkbox"/> 토끼 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타
	계 통	New Zealand White계
	동물수	수 컷      9 마리      암 컷      마리
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타( 안구 적용 )	
9. 투여기간	1회 적용	
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> Powder <input type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid	
11. 투여용량	Draize 방법에 따라 좌측안구내로 0.1g의 시험물질을 적용하고 세안군은 20~30 초 후 생리식염수로 세안하고 미세안군은 그대로 두었다.	
12. 실험내용	실험군	세안군      미세안군
	투여용량	0.1g      -      0.1g      -
	투여부위	L      R      L      R
	동물수	3      6
13. 평가	각막의 혼탁, 혼탁된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무	
14. 결과	1. Day 1부터 Day 3까지 미세안군의 모든 동물에서 결막발적, 결막부종 및 배출물이 산발적으로 관찰되었다. 2. 급성 안자극지수 I.A.O.I.(The Index of Acute Ocular Irritation)는 세안군 0, 미세안군 9.3으로 산출 되었다.	
15. 결론	DKB120의 New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과, 세안군은 무자극물, 미세안군은 약 자극물로 평가 되었다.	

## 피부자극 시험자료 요약서

	Study No.	17-BL-0902
1. 시험명	DKB120의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험	
2. 시험책임자	길기현	
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소	
4. 시험기간	2018년 08월 02일 - 2018년 08월 28일	
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
6. 시험물질(성분명)	DKB120 (물오리나무 70% 에탄올건조엑스)	Lot No.    APD180427
7. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input checked="" type="checkbox"/> 토끼 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타
	계 통	New Zealand White계
	동물수	수 컷    6 마리    암 컷    마리
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타( 피부적용 )	
9. 투여기간	1회 적용 후 24시간 유지	
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> Powder <input type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid	
11. 투여용량	Draize 방법에 따라 2.5 cm x 2.5 cm 크기의 제모된 찰과 피부 및 건강피부에 시험물질 0.5 g씩을 적용하였다.	
12. 실험내용	실험군	찰과부    건강부
	투여용량	0.5g    -    0.5g    -
	투여부위	L    R    L    R
	동물수	6
13. 평가	피부반응 평가(홍반과 가피의 형성 및 부종형성)	
14. 결과	1. Day 1과 Day2에 모든 동물의 시험물질 적용부위에서 홍반 및 부종이 관찰되었다. 2. 1 차 피부자극지수(Primary Irritation Index, PII)는 1.0 으로, 약한 자극성물질로 구분되었다.	
15. 결론	DKB120의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험 결과, 약한 자극성 물질로 평가하였다.	



차. 안전성 약리 시험

<요약>

시험 항목	세부항목	종 및 계통	적용 경로	투여량	결과	GLP 준수	시험번호
중추신 경계	체온, 전신행동	SD rat	경피	500, 1000, 2000 mg/kg	중추신경계(체온, 전신행동)에 미치는 영향 없음	준수	17-RS-0896
호흡기 계	호흡수, 일회·분당 호흡량,	SD rat	경피	500, 1000, 2000 mg/kg	일반증상, 호흡기계(호흡수, 호흡량) 영향 없음	준수	17-RS-0897
심혈관 계	Telemetry	Beagle Dog	경피	250, 500, 1000 mg/kg	일반증상, 혈압, 심박수, 심전도 및 체온 영향 없음	준수	17-RS-0897
	hERG	CHO-hERG-Duo cells	세포에 직접 처리	25, 50, 100, 200 µg/mL	IC50: 200 µg/mL를 상회하는 것으로 판단됨	준수	17-VS-0899

**참조: 안전성 약리 시험자료 요약**

1) 랫드 중추신경계 안전성 약리 시험

**랫드 중추신경계 안전성약리 시험자료 요약서**

		Study No.	17-RS-0896						
1. 시험명	DKB120의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 중추신경계 안전성 약리시험								
2. 시험책임자	한수연								
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소								
4. 시험기간	2018년 11월 28일 - 2019년 01월 15일								
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No								
6. 시험물질(성분명)	DKB120(물오리나무 70% 에탄올건조엑스)			Lot No.	APD180427				
7. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타(SPF 토끼)							
	계통	Sprague-Dawley 랫드							
	동물수	수컷	32 마리	암컷	- 마리				
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피)								
9. 투여기간	단회 투여								
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> colloid								
11. 투여 용량	2000 mg/kg을 고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비 2로 500 및1000 mg/kg을 설정하였다. 또한, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.								
12. 실험내용	실험군	(1)		(2)		(3)		(4)	
	투여농도	0mg/kg		500mg/kg		1000mg/kg		2,000mg/kg	
	실험동물 (M/F)	M		M		M		M	
	군당 동물수	8		8		8		8	
13. 평가	시험물질 투여 전과 투여 후 30, 60, 120, 240 및 360 분에 체온 및 전신행동 평가								
14. 결과	1) 체온 측정 결과, 시험물질과 관련된 이상 변화는 관찰되지 않았다. 2) 전신행동 측정 결과, 시험물질과 관련된 이상 변화는 관찰되지 않았다.								
15. 결론	시험물질 DKB120을 2000 mg/kg 이하의 용량으로 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여하였을 때, 시험물질이 중추신경계에 미치는 영향은 없는 것으로 판단한다.								

2) 랫드 호흡기계 안전성 약리 시험

**랫드 호흡기계 안전성약리 시험자료 요약서**

		Study No.	17-RS-0897						
1. 시험명	DKB120의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 호흡기계 안전성 약리시험								
2. 시험책임자	한수연								
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소								
4. 시험기간	2018년 11월 27일 - 2019년 01월 15일								
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No								
6. 시험물질(성분명)	DKB120 (물오리나무 70% 에탄올 건조엑스)		Lot No.	APD180427					
7. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니피 <input type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타 (SPF 토끼)							
	계통	Sprague-Dawley 랫드							
	동물수	수컷	32 마리		암컷	- 마리			
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피)								
9. 투여기간	단회 투여								
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> colloid								
11. 투여 용량	2000 mg/kg을 고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비 2로 500 및1000 mg/kg을 설정하였다. 또한, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.								
12. 실험내용	실험군	(1)		(2)		(3)		(4)	
	투여농도	0mg/kg		500mg/kg		1000mg/kg		2,000mg/kg	
	실험동물 (M/F)	M		M		M		M	
	군당 동물수	8		8		8		8	
13. 평가	시험물질 투여 전과 투여 후 30, 60, 120, 240 및 360 분에 호흡수(respiration rate), 일회 호흡량(tidal volume), 분당 호흡량(minute volume)을 10 분간 측정								
14. 결과	<p>1) 일반증상 관찰 결과, 시험물질과 관련된 이상 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>2) 호흡수 측정 결과, 시험물질과 관련된 이상 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>3) 일회 호흡량 측정 결과, 시험물질과 관련된 이상 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>4) 분당 호흡량 측정 결과, 시험물질과 관련된 이상 변화는 관찰되지 않았다.</p>								
15. 결론	시험물질 DKB120을 2000 mg/kg 이하의 용량으로 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여하였을 때, 시험물질이 호흡기계에 미치는 영향은 없는 것으로 판단한다.								

3) 비글독 심혈관계 안전성 약리 시험

### 비글견 심혈관계 안전성약리 시험자료 요약서

		Study No.	17-DS-0900		
1. 시험명	DKB120의 Beagle Dog에서 Telemetry system을 이용한 단회 경피투여 심혈관계 안전성 약리시험				
2. 시험책임자	한수연				
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소				
4. 시험기간	2018년 11월 05일 - 2019년 01월 04일				
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No				
6. 시험물질(성분명)	DKB120(물오리나무 70% 에탄올건조엑스)	Lot No.	APD180427		
7. 시험동물	종	<input type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input checked="" type="checkbox"/> 비글견 <input type="checkbox"/> 원숭이 <input type="checkbox"/> 기타 (SPF 토끼)			
	계통	Beagle dog			
	동물수	수컷	4 마리	암컷 - 마리	
8. 투여경로	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 피하 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 복강 <input type="checkbox"/> 근육 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(경피)				
9. 투여기간	각 용량별 1회씩 총 4회 투여				
10. 투여형태	<input type="checkbox"/> solution(용해상태) <input checked="" type="checkbox"/> suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> colloid				
11. 투여 용량	한계용량인 1000 mg/kg을 고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비 2로 500 및 1000 mg/kg을 설정하였다. 또한, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다.				
12. 실험내용	실험군	(1)	(2)	(3)	(4)
	투여농도	0mg/kg	250mg/kg	500mg/kg	1,000mg/kg
	실험동물 (M/F)	M	M	M	M
	군당 동물수	4	4	4	4
13. 평가	일반증상, 혈압, 심박수, 심전도 및 체온				
14. 결과	1) 일반증상 관찰결과, 시험물질과 연관된 이상변화는 관찰되지 않았다. 2) 혈압 측정결과, 수축기, 이완기 및 평균혈압에서 시험물질과 연관된 이상변화는 관찰되지 않았다. 3) 심박수 측정결과, 시험물질과 연관된 이상변화는 관찰되지 않았다. 4) 심전도 측정결과, 시험물질과 연관된 이상변화는 관찰되지 않았다. 5) 체온 측정결과, 시험물질과 연관된 이상변화는 관찰되지 않았다.				
15. 결론	KB120이 심혈관계에 미치는 영향은 없는 것으로 판단한다.				

4) hERG 안전성 약리 시험

### hERG 안전성약리 시험자료 요약서

		Study No.	17-VS-0899
1. 시험명	DKB120의 CHO hERG cells를 이용한 hERG potassium channel에 대한 심혈관계 안전성약리시험		
2. 시험책임자	김선돈		
3. 시험기관	(주)캠온 비임상연구소		
4. 시험기간	2019년 01월 15일 - 2019년 09월 24일		
5. GLP 준수여부	<input checked="" type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No		
6. 시험물질(성분명)	DKB120(물오리나무 70%에탄올건조엑스)	Lot No.	APD180427
7. 시험계	Whole-cell patch clamp 기법을 사용하여 CHO cells에 발현된 hERG potassium channel의 current에 미치는 영향을 관찰함으로써 시험물질이 심혈관계에 미치는 영향을 평가		
8. 투여형태	<input checked="" type="checkbox"/> Solution(용해상태) <input type="checkbox"/> Suspension(현탁상태) <input type="checkbox"/> Colloid		
9. 처리농도	물질의 용해성을 기반으로 200 µg/mL을 최고농도군으로 두고, 아래로 공비 2로 100, 50 및 25 µg/mL 시험군을 설정(양성대조: E-4031, 0.1µM)		
10. 평가	hERG channel currents를 대조군과 비교		
11. 결과	<p>1) DKB120에 의한 hERG channel currents의 영향 DKB120을 25, 50, 100 및 200 µg/mL 의 용량으로 세포에 처리하였을 때, 억제율 [Compensated suppression rate, (%) ]은 각각 1.08, 11.45, 22.05, 44.97로 통계적으로 유의한 차이를 보였다.</p> <p>2) E-4031에 의한 hERG channel currents의 영향 양성대조물질인 0.1 µM E-4031에 의한 hERG channel currents의 억제율은 81.31 %를 나타내었다. 또한, 부형제대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다.</p>		
12. 결론	시험물질 DKB120을 200 µg/mL 이하의 용량으로 Whole-cell patch clamp 기법을 사용하여 hERG channel currents에 미치는 영향을 평가하였을 때, 시험물질에 의한 영향은 없는 것으로 판단하고, IC50 값은 200 µg/mL을 상회하는 것으로 판단한다.		

## 2-7. 완제 의약품 제형 연구

가. 약물 전달에 최적화된 외용제 제형(연고, 크림, 겔) 연구

1) 리포솜 시스템의 설계 및 분산 된 외용제의 경피 투과 시험

- Cholesterol을 이용한 CL(일반리포솜)과 Tween 80을 이용한 EL(탄성리포솜)을 제조함. 아래 표1과 같이 Size는 각각 140nm, 130nm를 가졌고 표면전하는 -3.6mV, -9.3mV를 나타냄. 봉입률은 13000g, 10분 동안 원심분리하여 리포솜으로부터 분리된 봉입되지 않은 약물량을 분석하여 아래의 식을 통해 계산함.

$$\text{봉입율}(\%) = (\text{가한 약물량} - \text{원심분리 상층액의 약물량}) / \text{가한 약물량} \times 100$$

- 가변성 평가를 위해 extruder를 이용하여 리포솜이 인공장벽을 투과하는 정도에 대해 측정하였음. 2.5bar의 압력을 받은 리포솜 현탁액을 membrane에 통과하게 한 후 나온 리포솜 현탁액의 양을 측정하고 membrane을 통과한 리포솜의 입자크기를 측정. 아래 식으로 계산하였고 그 결과는 CL 대비 EL의 가변성이 약 4배 증가되었음

$$\text{가변성} = \text{통과한 리포솜의 양} \times (\text{extrusion 후 리포솜의 입자크기} / \text{membrane의 기공 크기})$$

- Franz cell을 이용하여 시간대 별 오레고닌 (ORG)의 피부 투과량을 평가한 결과 Flux값이 CL과 EL에서 각각  $9.92\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$ ,  $11.71\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$ 의 투과도를 보임. 일반 크림(CC)과 대비하였을 때 ORG의 피부투과량이 그림 2와 같이 CL,EL에서 각각 25%, 75% 이상 증가하는 결과를 나타냄. 이는 CL과 비교했을 때, EL의 증가된 가변성이 피부침투능을 향상시킨 것으로 추론할 수 있음. 이를 통해 CL은 각질층 윗층에 주로 분포하는데 비하여 EL은 가변성이 우수하여 피부세포간극이나 모낭을 통과할 수 있을 것이라고 예상된다.

표 1. 리포솜 캐리어의 물리적 특성

	CL	EL
입자 분포 (nm)	$140.2 \pm 4.6$	$130.6 \pm 3.4$
입자 균일도	0.142	0.132
표면 전하 (mV)	$-3.6 \pm 1.4$	$-9.3 \pm 2.6$
봉입율 (%)	$58.1 \pm 5.4$	$55.2 \pm 6.2$
가변성	$15.5 \pm 3.9$	$60.2 \pm 5.1$

2) 천연물 Ex 화합물 (허수테논: HST)의 안정성 개선을 위한 항산화제 스크리닝

- HST의 안정성 증대를 위해 Labrafil M1944 CS를 oil상으로, Tween 80을 surfactant로 하여 나노지질캐리어(NLC)를 개발하였다. 그 결과 그림 3에 나타난 바와 같이 HST solution 대비 안정성이 증가하였다. (속도상수:  $23.41$  (solution) vs  $7.29$  (NLC),  $\times 10^{-2}, \text{day}^{-1}$ )

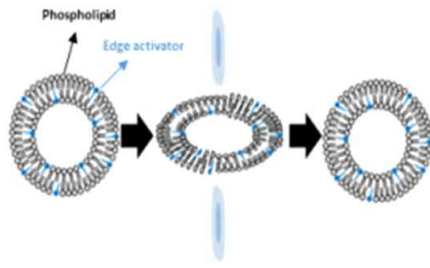


그림 1. 탄성리포솜의 생체막투과 시 가변성

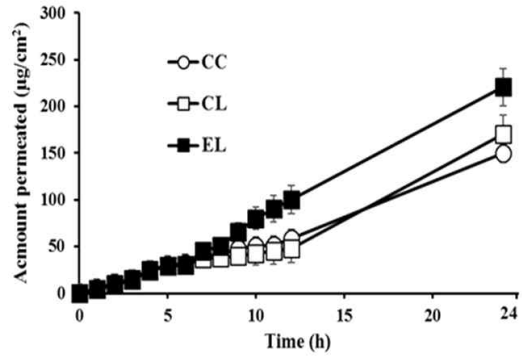


그림 2. 오레고넨 탑재 일반 크림 및 리포솜 분산제형의 피부 투과량 평가

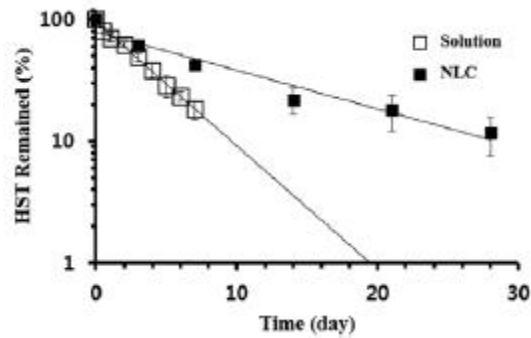


그림 3. 가속조건 (40°C, 75% RH)에서의 HST solution과 NLC 제형의 안정성 비교.

- NLC 내 HST의 산화에 의한 낮은 안정성 개선을 위해 항산화제 스크리닝을 진행함 (Ascorbyl palmitate: AP, Etylenediaminetetraacid: EDTA, alpha-Tocopherol: TC, Butylated hydroxytoluene: BHT). 그림 4(A)에 나타난 바와 같이 항산화제 단일 첨가 중에서는 AP, (B)복합 첨가 중에서는 AP와 EDTA를 각각 1% 첨가한 것이 가속조건 (40 °C, 75% RH)에서 가장 개선된 안정성을 보였음.

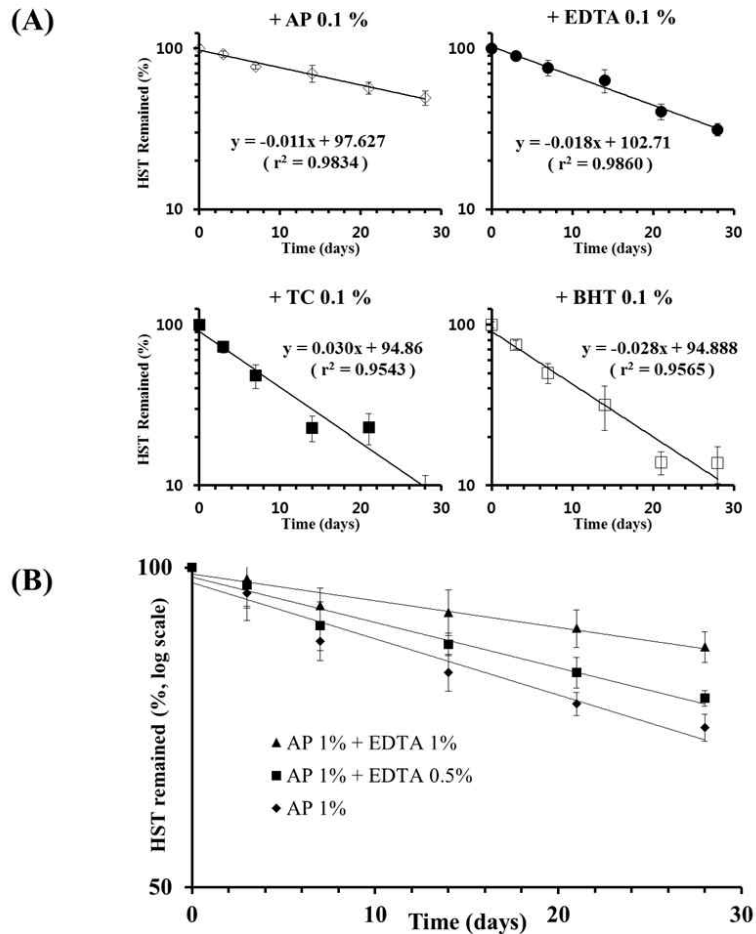


그림 4. 가속조건에서의 NLC 내 HST의 안정성 (A) 항산화제 단일 첨가 (B) 복합첨가

- Q<sub>10</sub> 값을 2로 가정하여 AP/EDTA가 각각 1% 씩 첨가된 NLC의 유효기간을 25℃, 4℃에서 각각 예측한 결과 51.2일, 219.5일로 관찰되었다.

3) 물오리나무 Ex 화합물 (ORG) 탑재 연고 제형 (C-DDS) 설계 및 최적화

- 기능성 크림 (HUMC)의 가속조건 (40℃, 75% RH)안정성 시험 1,3개월 결과에서 지표성분인 ORG의 함량이 각각 80% 미만, 50% 미만으로 감소한 것을 알 수 있음

- 이에 따라 ORG의 안정성 개선을 위해 수상을 최소화한 제형인 C-DDS들을 제조하게 됨. 물을 함유하지 않아 높은 안정성을 갖는 대한약전 백색연고를 기반으로 한 친유성 연고 (Lipophilic ointment :LO)와 친유성 연고의 정상 및 투과도 개선을 위해 USP O/W연고를 기반으로 한 친수성 연고 (Hydrophilic ointment :HO) 제형을 설계함.

- 세 가지 연고제형 모두 적합한 바름성과 수세성을 보임.

- 아래 표에서 나타난 바와 같이 LO는 함량이 100%수준으로 유지되어 안정성이 개선되



었다는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 LO의 정상 및 약물 투과량 결과가 좋지않아 천연 물 Ex 분산매질을 Propylene glycol에서 Transcutol P로 변경한 LOb를 제조함

표 2. 연고제형의 조성표

Ingredient	LOa (%)	LOb (%)	Ingredient	HO (%)
<b>API</b>			<b>API</b>	
물오리나무 추출물	1	1	물오리나무 추출물	1
TECA	0.25	0.25	TECA	0.25
Hyaluronic acid	0.3	0.3	Hyaluronic acid	0.3
<b>Oil phase</b>			<b>Oil phase</b>	
White beeswax	5	5	White petroleum	35
Propylene glycol	5	-	Propylene glycol	10
Transcutol P	-	5	Grape seed oil	4
<b>Surfactant</b>			<b>Aqua phase</b>	
Span 80	1	1	Cetyl alcohol	20
<b>Antioxidant</b>			<b>Surfactant</b>	
Ascorbyl palmitate	1	1	Span 80	1
EDTA	1	1	<b>Antioxidant</b>	
White petroleum	q.s ad 100.0	q.s ad 100.0	Ascorbyl palmitate	0.5
			Propyl p-oxybenzoate	0.5
			Methyl p-oxybenzoate	0.5
			Water	q.s ad 100.0

표 3. 제형별 가속 안정성 시험 결과

제형	ORG 함량 (%)	
	가속 1개월	가속 3개월
HUMC	78.2	< 50
LOa	105.81	진행 중
LOb	진행 중	진행 중
HO	진행 중	진행 중

4) 물오리나무 ex 화합물 탑재 (ORG) 제형의 약물 방출량 및 피부 투과량 평가  
 - 물오리나무 ex 화합물 탑재 제형 HUMC, HO, LOa 및 LOb의 약물 방출량 및 피부 전달능을 franz cell을 이용해 비교 평가함.

- 기제 적용 12시간 후 제형 내 ORG 방출량이 HUMC, HO, LOa 및 LOb 각각 가한 함량 대비 55.3%, 26.4%, 4.7%, 0.54%를 보였는데 HUMC의 경우 처음 2시간 동안 initial burst 후 지연된 방출을 보이는 biphasic한 방출양상을 보임. 수상이 존재하는 HUMC 및 HO는 ORG가 수용성이기 때문에 확산 하는 것에 방해받지 않으나 LO의 경우 극성의 차이로 인하여 확산이 율속단계로 작용하여서 방출이 지연되는 결과를 가져왔다고 사료됨.

- 기제 적용 24시간 후 피부 투과 ORG량이 HUMC, HO, LOa 및 LOb 각각  $216.1 \pm 54.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $86.30 \pm 25.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $7.663 \pm 3.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $11.88 \pm 5.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 를 보임. LOa 대비 HUMC 및 HO 각각 28.2배, 11.3배 증가를 보여 지표성분 피부투과능의 우수성을 확인하였으나 LOb의 경우 LOa 대비 50% 증가를 보여 투과량 증가가 미미하였음.

- 투과능으로서는 HUMC가 가장 적합하지만 3개월 가속 안정성 시험에서 네 제형 모두 부적합한 결과가 나왔기 때문에, 안정화된 새로운 제형의 개발이 필요함.

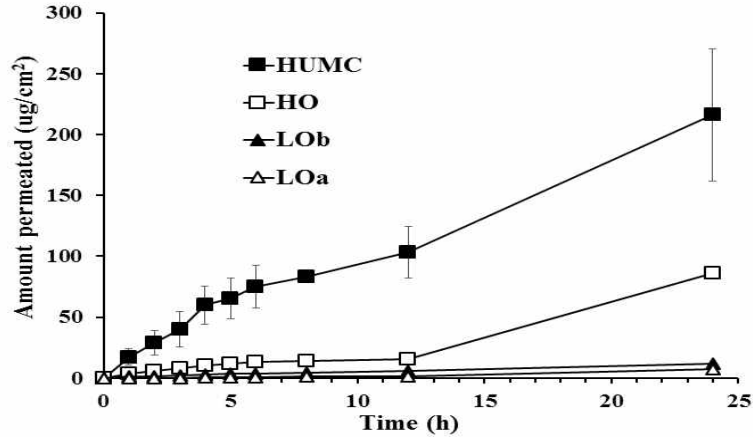


그림 4. 물오리나무 Ex. 화합물 탑재 크림 및 연고제형의 피부 투과량 평가

나. 완제의약품 안정성 확보(장기/가속 3개월)

- 1) 물오리나무 Ex.의 불안정성을 보완하는 연고제 개발을 위해 폴리에틸렌글리콜 기반 연고와 백색바셀린 기반 연고를 다음 표 4와 같이 제조하였다.

표 4 물오리나무 Ex.를 함유하는 연고제의 조성

Compositions (g)	PEG base			White petrolatum base	
	P1	P2	P3	V1	V2
ASEx	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Polyethylene glycol 4000	23.0	23.0	23.0	-	-
Polyethylene glycol 400	62.0	62.0	62.0	-	-
Beeswax	-	-	-	5.0	5.0
Propylene glycol	-	-	-	15.0	15.0
Zinc stearate	-	-	5.0	-	5.0
White petrolatum	-	1.5	1.5	q.s. ad 100	q.s. ad 100
Water	q.s. ad 100	q.s. ad 100	q.s. ad 100	-	-

- 2) 물오리나무 Ex.의 수용액은 온도의존성이며, 그림 5(A)와 같이 1차 속도식을 따랐으며 속도상수( $\times 10^{-2}$ )는 1.35 (25°C), 3.39 (40°C), 7.35(50°C)으로 측정되었다. 아르헤니우스 방정식에 대입하였을 때, 그림 5(B)와 같이 직선성을 나타내었으며, 활성화에너지는 53.60 kJ/mole으로 측정되었다.

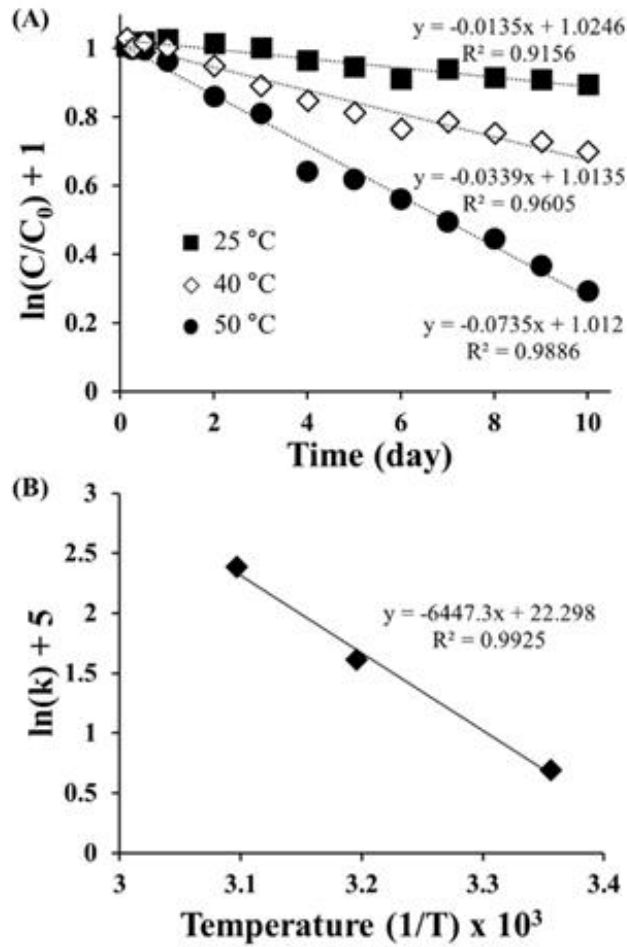


그림 5 (A) 다른 온도에서 물오리나무 Ex. 수용액 중 남아있는 오레고닌의 1차 분해 속도 그래프 (B) 아르헤니우스식에 의한 ln(k)와 1/T 간의 상관관계

3) 각각의 연고(P1~P3, V1, V2)를 가속조건 (40°C, 75% RH)에서 120일 간 안정성 시험을 하였을 때 그림 6과 같이 폴리에틸렌글리콜 기반 연고가 백색바셀린 기반 연고보다 더 우수한 안정성을 보임. 이 중에서 P3가 가장 우수한 안정성을 보였으며 그림 7에서 나타난 바와 같이 다른 연고와는 달리 P3에서는 120일 보관 후 외관상의 변화가 관찰되지 않음.

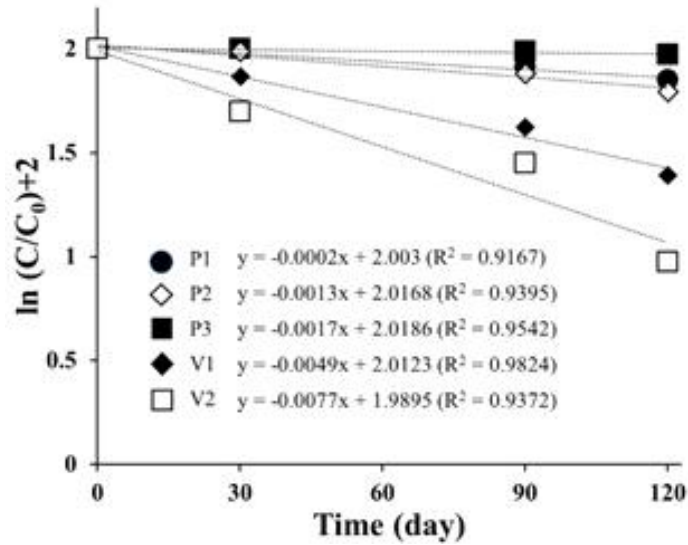


그림 6. 가속조건 하에서 각 연고에 남아있는 오레고닌

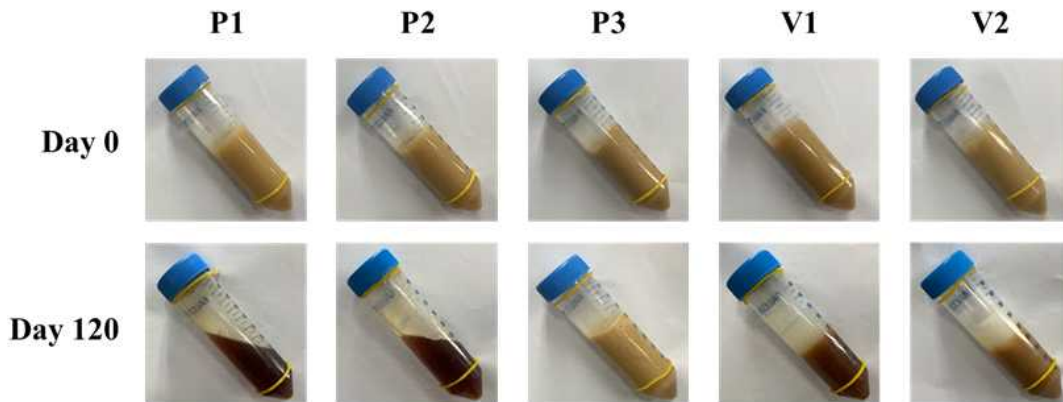


그림 7. 가속조건 하에서 120일 보관 후 외관상의 변화

4) 각각의 연고에 대한 레올로지 평가를 하였을 때, 그림 8(A)에서와 같이 모두 전단박화 흐름의 특성을 나타냄. 5가지의 연고 중에서 P3에서 가장 높은 항복값(472.78 Pa)이 관찰됨. 이는 스테아르산과 폴리에틸렌글리콜 사이의 수소결합으로 간주되며 그림 8(B)와 같이 스테아르산의 함량이 높아짐에 따라 점도가 증가하는 것을 볼 수 있음.

5) 스테아르산 나트륨은 스테아르산 아연에 비해 점도를 충분히 증가시키지 못하였는데 그 이유로는 1가 이온인 나트륨에 비해 2가 이온인 아연에서 더 복잡한 네트워크를 형성하기 때문이라 유추할 수 있음.

6) 일반적으로, 기체의 점도가 낮으면 분산되어있는 입자 간 충돌 확률이 증가하여 안정성이 떨어질 수 있음. 따라서 점도가 가장 높은 P3의 안정성이 가장 좋게 관찰되었다고 할 수 있음.

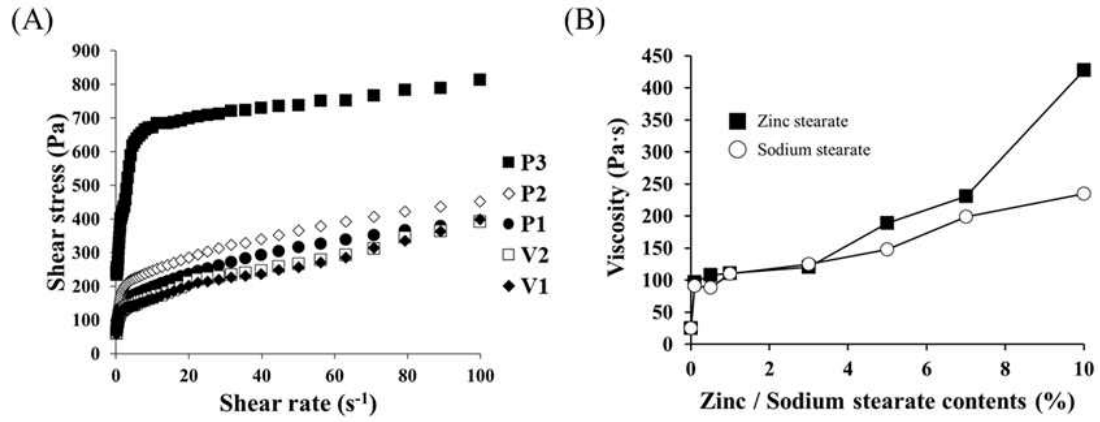


그림 8. 물오리나무 Ex. 화합물 탑재 연고의 (A) 레오그램 (B) 스테아르산 아연/소듐의 함량에 따른 점도

7) 계산된  $Q_{10}$ 값(2.17)을 이용하여 25°C에서 유효기간을 계산했을 때, 4년을 초과하는 값을 얻었다.

8) 임상용 의약품 안정성 시험

(가) 원료 약품 및 분량

연고 (1g) 중				
배합목적	원료명	규격	분량	단위
주성분	물오리나무 70%에탄올건조엑스(15~25→1)	별규	10.0	밀리그램
기제	폴리에틸렌글리콜4000	KP	230.0	밀리그램
기제	폴리에틸렌글리콜400	KP	620.0	밀리그램
기제	백색바셀린	KP	15.0	밀리그램
기제	스테아르산아연	USP	50.0	밀리그램
기제	정제수	KP	적량	밀리그램
	총량		1,000.0	밀리그램

(나) 안정성 시험 자료

현재 DKB120 연고에 대한 안정성 시험은 진행 중이다. 현재까지 가속안정성 시험(40±2℃/75±5% RH)은 3개월까지 완료하였음. 가속 시험조건 하에서 3개월 동안 안정성 시험을 진행하였으며, 함량시험의 경우 시험 기간 동안 유의적 변화는 없었으며, 시험항목 모두 기준에 적합하였음.

장기보존시험 조건(25±2℃/60±5% RH)하에 실시되고 있으며, 지금까지 장기 3개월 안정성 시험 결과는 함량시험의 경우 유의적 변화가 없었으며, 그 외의 모든 시험항목에서 기준에 적합하였음.

<가속안정성 시험 자료>

제품명	DKB120 연고										
보관조건	온도	습도				포장					비고
	40 ± 2 °C	75 ± 5 % RH				1차 : 알루미늄 튜브					
제조번호	제조일자	시험기간									
		0	1M	3M	6M						
DKB120 DP19001	2019. 06. 27	V	V	V							[안정성 시험결과 보고서 참조]

JSQ30-0009-F

개정번호(Revision No.): 신규  
 시행일자(Effective date): 신규



Dongkook  
 Pharmaceutical Co., Ltd.

Page 1 / 1

Protocol No: DKB120DP19001 15g 19-A01		안정성 시험 결과 보고서 The report for stability study	
제품명 Product Name	DKB120	사용기간/제품보관조건 Shelf life / Storage condition	36 개월 / 실온보관(1~30℃), 밀폐용기
시험구분 Study type	가속 시험	안정성보관조건 Storage condition of stability chamber	40℃ ± 2℃ / 75% ± 5%
포장형태 Packaging	알루미늄 튜브	시험기간 Test period	2019.07~2020.01
개월수 Status	3 개월	결과 Result	적합
시험사유 Reason for Stability Study	<input checked="" type="checkbox"/> 신제품 New product : 1Lot <input type="checkbox"/> 변경 Change/validation <input type="checkbox"/> 기타 Etc.		
결론 Final Conclusion	가속 시험 조건에서 3 개월 동안 안정성 시험을 진행하였다. 함량 시험의 경우 시험 기간 동안 유의적 변화는 없었으며 시험 항목 모두 기준에 적합하였다. Stability test is conducted during 3months' testing at Accelerated storage condition. Significant change in assay is not occurred during test period. Test items are complied with the acceptance criteria.		
첨부자료 Attachment	Stability table (Accelerated test – DKB120DP19001)		
승인 Approval	직책 Responsibility	성명 Name	서명 / 서명일 Signature/Sign.Date
	작성자 Preparation by / date	박유화(YH.PARK)	/ 2019.10.28
	시험확인자 Checked by / date	정현일(HI.JUNG)	/ 2019.10.28
	시험책임자 Responsibility by / date	김도훈(DH.KIM)	/ 2019.10.28
승인자 Approved by / date	이계완(KW.LEE)	/ 2019.10.28	

동국제약주

**DKB120 : 가수시험**

제조번호 : DKB120DP19001  
보관조건 : 40 ± 2°C / 75 ± 5% RH  
보관용기 : 알루미늄 튜브  
사용기간 : 36개월

제조일자 : 2019.06.27  
제조수량 : 5Kg  
제조처 : 동국제약(주)  
시험기간 : 2019. 07 - 2020. 01

기준 개월	시험일 년/월	성상	확인	함량		질량·용량		미생물한도		
				Oregonin 0.13% 이상	표준액에서 얻은 주피크의 유지시간과 동일	90% 이상	총호기성미생물수 100,000 CFU/g 이하	총진균수 100 CFU/g 이하	특정미생물시험 불검출	
Initial	2019/07	불투명한 노란색의 크림	동일	0.146%	99%	0CFU/g	0CFU/g	불검출		
1	2019/08	불투명한 노란색의 크림	동일	0.167%	99%	0CFU/g	0CFU/g	불검출		
3	2019/10	불투명한 노란색의 크림	동일	0.149%	98%	0CFU/g	0CFU/g	불검출		
6	2020/01									



<장기보존 시험 자료>

제품명	DKB120 연고										
보관조건	온도	습도				포장					비고
	25 ± 2 °C	60 ± 5 % RH				1차 : 알루미늄 튜브					
제조번호	제조일자	시험기간									
		0	3M	6M	9M	1 2 M	1 8 M	2 4 M	3 6 M		
DKB120 DP19001	2019. 06. 27	V	V								[안정성 시험결과 보고서 참조]

JSQ30-0009-F

개정번호(Revision No.): 신규

시행일자(Effective date): 신규

Page 1 / 1



Dongkook  
Pharmaceutical Co., Ltd.

Protocol No: DKB120DP19001 15g 19-L01		<b>안정성 시험 결과 보고서</b> <b>The report for stability study</b>	
제품명 Product Name	DKB120	사용기간/제품보관조건 Shelf life / Storage condition	36개월 / 실온보관(1~30℃), 밀폐용기
시험구분 Study type	장기 시험	안정성보관조건 Storage condition of stability chamber	25℃ ± 2℃ / 60% ± 5%
포장형태 Packaging	알루미늄 튜브	시험기간 Test period	2019.07 ~ 2022.07
개월수 Status	3개월	결과 Result	적합
시험사유 Reason for Stability Study	<input checked="" type="checkbox"/> 신제품 New product : 1Lot <input type="checkbox"/> 변경 Change/validation <input type="checkbox"/> 기타 Etc.		
결론 Final Conclusion	<p>장기 시험 조건에서 3개월 동안 안정성 시험을 진행하였다.</p> <p>함량 시험의 경우 시험 기간 동안 유의적 변화는 없었으며 시험 항목 모두 기준에 적합하였다.</p> <p>Stability test is conducted during 3 months' testing at Long term storage condition.</p> <p>Significant change in assay is not occurred during test period.</p> <p>Test items are complied with the acceptance criteria.</p>		
첨부자료 Attachment	Stability table (Long term test – DKB120DP19001)		
승인 Approval	직책 Responsibility	성명 Name	서명/서명일 Signature/Sign.Date
	작성자 Preparation by / date	박유화(YH.PARK)	/ 2019.10.28
	시험확인자 Checked by / date	정현일(HI.JUNG)	/ 2019.10.28
	시험책임자 Responsibility by / date	김도훈(DH.KIM)	/ 2019.10.28
승인자 Approved by / date	이계완(KW.LEE)	/ 2019.10.28	

동국제약(주)

DKB120 : 장기 시험

제조번호 : DKB120DP19001  
보관조건 : 25 ± 2°C / 60 ± 5% RH  
보관용기 : 알루미늄 튜브  
시험기간 : 36개월

제조일자 : 2019.06.27  
제조수량 : 5Kg  
제조처 : 동국제약 (주)  
시험기간 : 2019. 07 - 2022. 07

기준 개월	시험일	성상	확인	함량		질량·용량		미생물안도		
				Oregonin	0.13% 이상	90% 이상	중호기성미생물수 100,000CFU/g 이하	총균수 100 CFU/g 이하	특정미생물시험 불검출	
Initial	2019/07	분투명한 노란색의 크림	동일	0.146	99%	0CFU/g	0CFU/g	불검출		
3	2019/10	분투명한 노란색의 크림	동일	0.168	99%	0CFU/g	0CFU/g	불검출		
6	2020/01									
9	2020/04									
12	2020/07									
18	2021/01									
24	2021/07									
36	2022/07									

## 2-8. 임상프로토콜 개발: 첨부 파일 참조

### 가. 임상시험계획서

임상시험 번호	DKB-120
임상시험용 의약품	DKB120[물오리나무 70 % 에탄올건조엑스(15~25→1)] 연고
임상시험 제목	경증 및 중등증의 아토피피부염 환자 대상 DKB120 연고의 유효성 및 안전성 평가를 위한 4주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 제2a상 임상시험
임상시험 단계	치료적 탐색 임상시험[제2a상 임상시험(Phase 2a Study)]
임상시험 실시기관	중앙대학교 피부과
임상시험 의뢰자	동국제약(주) 서울특별시 강남구 테헤란로 108번길 7
Confidential	© Dongkook PHARMACEUTICAL Co., Ltd. This protocol is the property of Dongkook PHARMACEUTICAL Co., Ltd. and may not in full or in part be passed on, reproduced, published or otherwise use without the express permission of Dongkook PHARMACEUTICAL Co., Ltd.

<표지>

## 임상시험계획서

경증 및 중등증의 아토피피부염 환자 대상 **DKB120** 연고의  
유효성 및 안전성 평가를 위한 **4주, 무작위배정, 이중눈가림,**  
**위약대조, 제2a상 임상시험**

Protocol No. : DKB-120

Version No. : 1.0

Version Date : 2019년 11월 18일

의뢰자: 동국제약㈜

### ***Confidential***

본 임상시험계획서에는 동국제약주에 귀속되는 기밀정보가 포함되어 있습니다. 본 문서는 임상시험 책임자, 임상시험 공동연구자 및 임상시험 코디네이터, 임상시험심사위원회(IRB), 식품의약품안전처 등 임상시험의 실시와 관련된 자에게 제공하는 것으로, 동의를 취득하는 경우를 제외하고는 동국제약주의 사전 서면동의 없이 제3자에게 제공되거나 공개될 수 없습니다.

나. 임상시험계획서 요약

임상시험 제목	경증 및 중등증의 아토피피부염 환자 대상 DKB120 연고의 유효성 및 안전성 평가를 위한 4주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 제2a상 임상시험
임상시험 의뢰자	동국제약(주) 서울특별시 강남구 테헤란로 108번길 7
임상시험 책임자	미정
임상시험 실시기관	미정
임상시험 기간	임상시험심사위원회(IRB) 승인일로부터 18개월
임상시험 대상	만 19세 이상, 만 65세 미만인 경증 및 중등증의 아토피피부염 환자
임상시험 목적	만 19세 이상, 만 65세 미만인 경증 및 중등증의 아토피피부염 환자를 대상으로 대조약 대비 DKB120의 유효성 및 안전성을 평가하여 치료적 확증시험의 시험 설계, 평가 항목, 평가 방법에 대한 근거 확보를 위한 치료적 탐색 임상시험이다.
단계 및 디자인	단 계: 치료적 탐색 임상시험[제2a상 임상시험(Phase 2a Study)] 디자인: 4주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
임상시험용 의약품	시험약: DKB120[물오리나무 70 % 에탄올건조엑스(15~25→1)] 연고 대조약: 시험약과 성상과 외형이 동일하고 유효성분을 포함하지 않은 위약
임상시험용 의약품 투여방법	시험군(DKB120): 1일 2회(아침, 저녁), 얇은 층으로 병변 부위가 덮이도록 도포 대조군(Placebo): 시험군과 동일한 방법으로 도포
임상시험용 의약품 투여기간	4주

<p>임상시험 방법</p>	<p>임상시험 대상자는 자의(또는 법정대리인)에 의해 임상시험 동의서에 서명 후, 방문 평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 대상자에 한해 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정한다. 배정된 임상시험 대상자는 4주간 임상시험용 의약품 (DKB120 또는 대조약)을 투여하게 된다.</p>												
<p>임상시험 대상자 수</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군 (DKB120)</th> <th>대조군 (Placebo)</th> <th>총 시험대상자 수</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 레수(PP Set)</td> <td>22</td> <td>22</td> <td>44</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(25 %) 고려 레수</td> <td>30</td> <td>30</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table>		시험군 (DKB120)	대조군 (Placebo)	총 시험대상자 수	최종 평가 레수(PP Set)	22	22	44	Drop-out(25 %) 고려 레수	30	30	60
	시험군 (DKB120)	대조군 (Placebo)	총 시험대상자 수										
최종 평가 레수(PP Set)	22	22	44										
Drop-out(25 %) 고려 레수	30	30	60										
<p>선정기준</p>	<p>대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 만 19세 이상, 만 65세 미만의 남녀</li> <li>2) 방문1 기준 1개월 이전부터 지속적인 아토피피부염 증상이 있는 자</li> <li>3) 아토피피부염으로 진단받은 자(Hanifin and Rajka 기준)</li> <li>4) 방문1 시점의 IGA 점수가 2~3점에 해당되는 자</li> <li>5) BSA가 5 % 초과에 해당되는 자</li> <li>6) 임상시험이 시작되기 전에 본 임상시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자</li> </ol>												
<p>제외기준</p>	<p>다음 조건 중 어느 하나라도 해당되는 자는 본 임상시험에 참여할 수 없다.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 아토피피부염 이외에 자극물접촉피부염, 알레르기성 접촉피부염, 감염(예: 옴) 또는 건선 등과 같은 아토피피부염 결과의 정확한 평가를 저해시키는 피부질환이 있는 자</li> <li>2) 방문1 전 다음의 약물 또는 치료를 받은 자 <ol style="list-style-type: none"> <li>A. 방문1 기준 4주 이내에 경구용 스테로이드제, 경구용 항생제, 전신 광화학요법 및 다른 면역억제제를 투여한 자</li> <li>B. 방문1 기준 2주 이내에 국소 스테로이드제 및 항생제를 사용한 자</li> <li>C. 방문1 기준 4주 이내에 아토피피부염 관련 한약, 건강기능식품을 섭취한 자</li> </ol> </li> </ol>												

	<p>3) 정신분열증, 약물중독, 알코올 사용·유발 장애 등의 정신질환자 및 우울증으로 치료중인 자</p> <p>4) 면역결핍, 자가면역질환, 암 등의 전신질환이 있는 자</p> <p>5) 임상적으로 유의한 호흡기, 순환기, 신장, 간, 내분비, 면역, 혈액, 신경 혹은 기타 만성 질환이 있는 자</p> <p>6) 조절되지 않는 고혈압 환자(수축기 혈압 160 mmHg 이상 또는 이완기 혈압 100 mmHg 이상, 임상시험 대상자 10분 안정 후 측정기준)</p> <p>7) 조절되지 않는 당뇨병 환자(HbA1c 6.5 % 이상)</p> <p>8) Creatinine이 시험기관 정상 상한치의 2배 이상인 자</p> <p>9) AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 시험기관 정상 상한치의 3배 이상인 자</p> <p>10) 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자</p> <p>11) 본 임상시험용 의약품 성분에 과민반응 병력이 있는 자</p> <p>12) 본 임상시험 시작 6개월 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 임상시험 진행 중 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자</p> <p>13) 기타 사유로 시험자가 본 임상시험 참여에 부적합하다고 판단하는 자</p>
<p>유효성 평가 변수</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1차 유효성 평가 변수</li> </ul> <p>1) IGA 0~1점인 대상자의 비율(%)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2차 유효성 평가 변수</li> </ul> <p>2) IGA</p> <p>3) SCORAD index</p> <p>4) EASI</p> <p>5) DLQI</p> <p>6) TEWL</p> <p>7) IgE, Eosinophil count</p> <p>8) 혈중 Cytokine(IL-4, 12, IFN-γ)</p>
<p>안전성 평가 변수</p>	<p>1) 이상반응</p> <p>2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)</p> <p>3) 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중)</p> <p>4) 심전도검사</p>
<p>통계분석</p>	<p>1. 유효성 평가 변수</p> <p>1) 1차 유효성 평가변수</p> <p>1차 유효성 평가변수인 IGA 0~1점인 대상자의 비율에 대해서는 군 별로 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 군 간 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.</p> <p>2) 2차 유효성 평가변수</p> <p>2차 유효성 평가변수인 IGA, SCORAD index, EASI, DLQI, TEWL, IgE,</p>



Eosinophil count, 혈중 Cytokine(IL-4, 12, IFN- $\gamma$ ) 변화량에 대해서는 각 항목의 투여 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 또한, 기저특성 중 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 존재하는 경우 해당 변수를 공변량으로 고려하여 GLM을 실시할 수 있다.

## 2. 안전성 평가 변수

### 1) 이상반응

임상시험용 의약품 투여 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA에 따라 Coding 하며, 임상시험용 의약품 투여 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 군간 이상반응이 발생한 임상시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다. 아울러 시험약 또는 대조약과의 관련성이 인정되는 약물이상반응 발생률에 대해서도 동일한 방법으로 비교검정을 시행한다.

### 2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)

혈액학적 및 혈액화학적 검사치 같이 연속형(Continuous type) 자료의 투여 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 시험군과 대조군 간의 변화 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교한다.

### 3) 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중)

활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중) 검사치에 대하여 투여 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.

### 4) 심전도검사

심전도검사 결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 투여 전과 후의 군내 변화에 차이가 있는지 McNemar test를 이용하여 확인한다.

## 2-9. 임상 2상 IND 신청

가. 임상 시험자 자료집(IB): 첨부 파일 참조

동국제약(주)

# Investigator's Brochure

임상시험자자료집

Protocol No. DKB-120  
IB Version 1.0 (2019-09-27)



기밀유지: 본 임상시험자자료집에 포함된 모든 정보는 시험책임자 및 시험담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 동국제약(주)의 사전 동의 없이 제 3 자에게 공개될 수 없습니다.

**CONFIDENTIAL**

- 1 -

나. 임상시험계획 승인 신청서: 첨부 파일 참조

IND-Phase II

2019/11/11

## 임상시험계획승인 신청서 (DKB120 연고)

동 국 제 약

다. 임상시험계획 승인 접수증

1) IND 신청 및 접수 완료(12/9): 식품의약품안전처 임상제도과

## 접수증

접수번호 : 20190185669

접수일자 : 2019-12-09

민원명	임상시험계획승인-일반-임상시험 : DKB-120		
민원인 (대표자 또는 대리인)	오홍주		
처리에정기한	2020-01-21(30일한)		
처리주관부서	식품의약품안전처 임상제도과	전화 :	
안내사항	※ 방문수령의 경우에는 교부받고자 하는 민원실에 본 접수증을 제출하셔야 하며, 본인의 신분증 또는 대리인인 경우에는 위임장을 제시하셔야 민원서류를 수령하실수 있습니다.		
교부(수령)기관	식품의약품안전처 임상제도과		
수수료	※ 수수료는 전자지불을 통해 금 772,350원을 납부하였음을 증명합니다. (납부일 : 2019-12-06)		

청렴하고 깨끗한 식품의약품안전처가 되겠습니다.

- ※ 식품의약품안전처는 접수된 민원을 항상 신속하고 공정하게 처리하겠습니다.
- ※ 민원처리 공직자가 금품을 요구 또는 불공정하게 업무를 처리하거나 불친절한 경우 우리 처 홈페이지(www.mfds.go.kr), 감사담당관 직통전화(043-719-1365) 또는 이메일(mfdsoig@korea.kr)로 알려주시기 바랍니다.
- ※ 모든 신고내용은 철저히 관리하여 귀하의 개인정보가 외부로 유출되지 않도록 하겠으며, 청렴하고 공정한 식품의약품안전처를 만들기 위한 소중한 자료로 사용할겠습니다.

위 건명의 민원사안이 접수되었습니다.

식품의약품안전처

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

구분	내용
최종목표	천연물 유래의 아토피피부염 치료제 개발을 위한 임상 2상 IND 신청
세부목표	<ol style="list-style-type: none"><li>1) 원생약 품질관리 기준 확립</li><li>2) 제조공정 표준화 완료</li><li>3) 대량생산공정 확립</li><li>4) 동물효력시험 및 작용기전 연구</li><li>5) 기준 및 시험방법 확립</li><li>6) 완제의약품 제형 완료</li><li>7) 임상프로토콜 개발</li><li>8) 임상 2상 IND 자료작성 및 신청</li></ol>

### 3-2. 목표 달성 여부

가. 연구 개발 성과/평가방법 및 달성도

□ 1차년도				
구분	세부목표	평가 항목	평가 방법	달성도 (%)
1	원생약 관리 기준 설정	산지별 원생약 확보 및 기준 설정	원생약 관리 기준 설정 수준	100
1.1	지역별 원생약 확보 및 분석	산지별 원생약 평가		
2	Lab scale 제조공정 확립	제조 공정 표준화	제조 공정 표준화 완료 유·무	100
2.1	제조 공정 표준화 설정	제조 재현성, 주요 성분함량 분포 일관성, 제조 공정 경제성		
2.2	유효(지표) 성분 분리/구조 동정 및 확립	유효(지표) 성분 분리/구조 동정	유효(지표) 성분 확립 유·무	100
		유효(지표) 성분 확정		
2.3	원료의약품 기준 및 시험방법 설정	함량분석법 MV	분석법 확립 수준	100
		성상 및 확인시험법 설정	각 항목 기준 설정 수준	100
		순도시험 설정		
3	대량생산 공정 연구	Scale up test (5kg 이상)	scale up test 재현성	100
4	in vitro 효력 평가 및 작용기전 연구	세부 항목에 따른 효력 및 작용기전 연구	효력 평가 및 작용기전 연구 수준	100
4.1	DPPH assay	오리나무추출물, 분획물, 유효(지표) 성분 효력 평가		
4.2	Th1/Th2 cytokine			
4.3	비만세포 활성화 스크리닝 (비만세포의 히스타민 유리)			
5	외용제 (f-DDS) 설계 및 평가	다양한 외용제제 연구 수준 (성상, 점성, 감촉성, 보습능 평가)	외용제제 연구 수준	100
6	비임상 독성시험 GLP 기관 및 시험범위 선정	GLP 기관 선정 독성시험 시험 범위	GLP기관 및 시험 범위 확정	100

□ 2차년도

구분	세부목표	평가 항목	평가 방법	달성도 (%)
1	원생약 관리 기준 설정	산지별 원생약 확보 및 기준 설정	원생약 관리 기준 설정 수준	100
1.1	지역별 원생약 확보 및 분석	산지별 원생약 평가		
2	대량생산공정 확립			
2.1	bGMP 생산	추출물 30kg 규모 3 batch 제조	제조 완료 유·무	100
2.2	기준 및 시험방법 확립	bGMP 제조 batch 근거 기준 및 시험방법 확립	확립 유·무	100
2.3	유연물질분석	벤조피렌 분석, 잔류용매 분석, 미생물 분석	분석결과 유·무	100
	원료의약품 안전성 평가	장기보존시험 및 가속시험	시험 결과 유·무	100
3	Pilot scale up 연구	활성분획물에서의 유효(지표) 성분 함량 평가	분석 결과 유·무	100
4	in-vivo 효능 확인	세부 항목에 따른 효력 및 작용기전 연구	효력 평가 및 작용기전 연구 수준	100
4.1	model 쥐 구축 및 SCORAD 및 TWEL 수치 분석	오리나무추출물, 분획물, 유효(지표) 성분 효력 평가		
4.2	사이트카인 분석			
5	리포솜 시스템의 설계 및 외용제 내 분산	리포솜 캐리어의 물리적 특성 평가	입자사이즈400nm이하, PDI 0.3이하	100
		복합제형(C-DDS)의 제조 및 성상 평가	외용제의 성상 및 감촉에 이상 없음	100
6	약물 방출 및 경피전달능 비교분석	C-DDS 내 약물 방출 특성 평가	C-DDS의 약물 방출 지속성 검증	100
7	비임상 독성시험 실시	GLP 독성시험 기관에서 안전성 평가	시험 수행 유·무	100

□ 3차년도

구분	세부목표	평가 항목	평가 방법	달성도 (%)
1	지역별, 계절별 원생약 확보 및 분석	지역별, 계절별 원생약 평가	원생약 관리 기준 설정 수준	100
1.1	지역별, 계절별 오리나무 샘플 성분프로파일 연구	표준성분프로파일 설정		
2	독성검사	세부 항목에 따른 독성 검사	간단한 세포 독성 연구 수준	100
2.1	LDH & MTT 분석	오리나무추출물, 분획물, 유효(지표) 성분 독성 평가		
2.2	hERG 분석			
3	시제품의 제제특성 평가	시제품의 약물 방출평가	시제품의 약물 방출 지속성 검증	100
		시제품의 경피전달능 평가	대조군 대비 약물 분포 120% 이상	100
4	원료의약품 안전성 평가	장기보조시험 및 가속시험	시험 결과 유·무	100
5	임상프로토콜 개발	임상프로토콜 설정 및 확정	임상프로토콜 개발 유·무	100
6	임상2상 IND filing 및 제출	자료 작성 및 식약처 제출	제출 유·무	100
7	비임상 독성시험 실시	GLP 독성시험 기관에서 안전성 평가	시험 수행 유·무	100



나. 정량적 성과 목표 및 달성 결과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20												15	15	10	10				
최종목표	2	0									4	2	18	6	10					
1차년도												1	4	2	3					
실적											1	3.0	4	2	-					
2차년도	1										2	1	3.0	6	2	4				
실적											1	1	1.81	6	2	4				
3차년도	1										2		3.0	8	2	3				
실적											2		3.0	9	2	2	1			
소계	2										4	2	18	6	10					
실적	2										6	1	2.4	19	6	6	1			
종료 1차년도		1		1	21.28						1	1	3.0	8	1		1			
종료 2차년도														4	1					
종료 3차년도		1															1			
종료 4차년도						1	3,500	6,200	1	1							1			
종료 5차년도						2	16,000	18,600	1											
소계		2		1	21.28	3	19,500	24,800	2		1			12	2		3			
합계	2	2		1	21.28	3	19,500	24,800	2	1	5	3	3.0	30	8	10	3			

다. 연구 성과

1) 국내의 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activities of Phenolic Compounds from <i>Alnus sibirica</i> Stems Fermented by <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	molecules	Thi Tam LE	22(9)	스위스	MDPI	SCI	2017. 09. 18	1420-3049
2	Enhanced Chemical Stability of Hirsutenone Incorporated into a Nanostructured Lipid Carrier Formulation Containing Antioxidants	Bulletin of the Korean Chemical Society	Sang Gon Lee	39(11)	대한민국	Wiley-VCH	SCI	2018. 12. 01	
3	효소분해에 따른 플로리나무 diarylheptanoid 화합물의 함량변화	생약학회지	왕혜수	49(4)	대한민국	한국생약학회	비SCI	2018. 11. 29	
4	Inhibitory Effects on NO Production and DPPH Radicals and NBT Superoxide Activities of Diarylheptanoid Isolated from Enzymatically Hydrolyzed Ethanolic Extract of <i>Alnus sibirica</i>	molecules	Hye Soo Wang	24(10)	스위스	MDPI	SCI	2019. 5. 20	1420-3049
5	<i>Alnus sibirica</i> Extracts Suppress the Expression of Inflammatory Cytokines Induced by Lipopolysaccharides, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Interferon- $\gamma$ in Human Dermal Fibroblasts	molecules	Jeongyoon Choi	24(16)	스위스	MDPI	SCI	2019. 8. 08	1420-3049
6	Polyethylene glycol-based ointment formulations of <i>Alnus sibirica</i> extract and their accelerated stability assessments	Polymer (Korea)	Yoon Tae Goo	44(2)	대한민국	한국고분자학회	SCI	2020. 02. 05	게재확정

2) 국내 및 국제 학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	48th Annual Meeting of the Korean Society of Pharmacognosy	Yin Jun	2017. 11. 23	차바이오 컴플렉스	대한민국
2	48th Annual Meeting of the Korean Society of Pharmacognosy	윤성혜	2017. 11. 23	차바이오 컴플렉스	대한민국
3	48th Annual Meeting of the Korean Society of Pharmacognosy	안혜신	2017. 11. 23	차바이오 컴플렉스	대한민국
4	The 69th Annual Meeting of The Korean Physiological Society	방효원	2017. 11. 02	서울대학교 의과대학 융합과	대한민국
5	49th Annual Meeting and symposium of the Korean Society of Pharmacognosy	왕혜수	2018. 11. 22	이화여자대학교	대한민국
6	49th Annual Meeting and symposium of the Korean Society of Pharmacognosy	왕혜수	2018. 11. 22	이화여자대학교	대한민국
7	The 70th Annual Meeting of The Korean Physiological Society	방효원	2018. 10. 25	연세대학교 원주 의과대학 (오크밸리)	대한민국
8	The 70th Annual Meeting of The Korean Physiological Society	방효원	2018. 10. 26	연세대학교 원주 의과대학 (오크밸리)	대한민국
9	2018 International Conference of the Korean Society of Pharmaceutical Sciences and Technology	강태훈	2018. 11. 22	해운대 그랜드 호텔	대한민국
10	2018 International Conference of the Korean Society of Pharmaceutical Sciences and Technology	윤호엽	2018. 11. 22	해운대 그랜드 호텔	대한민국
11	The 50th Annual meeting and symposium of the Korean Society of Pharmacognosy	김민지	2019. 11. 28.	서울드래곤 시티	대한민국

12	2019 International seminar of the Research institute for biomedical and pharmaceutical sciences chung-ang university	김민지	2019. 11. 15.	중앙대학교	대한민국
13	2019 International seminar of the Research institute for biomedical and pharmaceutical sciences chung-ang university	김민지	2019. 11. 15.	중앙대학교	대한민국
14	Dynamic Revolutions in Pharmaceutical Sciences and Technology	강태훈	2019. 11. 21	서울 더케이 호텔	대한민국
15	2019 International seminar of the Research institute for biomedical and pharmaceutical sciences chung-ang university	구운태	2019. 11. 15.	중앙대학교	대한민국
16	2019 International seminar of the Research institute for biomedical and pharmaceutical sciences chung-ang university	강태훈	2019. 11. 15.	중앙대학교	대한민국
17	The 71th Annual Meeting of The Korean Physiological Society	최정윤	2019. 10. 31. - 11. 02	영남대학교 의과대학	대한민국
18	2019 International seminar of the Research institute for biomedical and pharmaceutical sciences chung-ang university	최정윤	2019. 11. 15.	중앙대학교	대한민국
19	2019 International seminar of the Research institute for biomedical and pharmaceutical sciences chung-ang university	최정윤	2019. 11. 15.	중앙대학교	대한민국

3) 지식 재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	물오리나무 추출물의 피부 질환 치료 용도	대한민국	중앙대 산학협 력단	2019. 11 . 18	10-2019-0 147828				100%
2	물오리나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피피부염 치료 또는 예방용 약학적 조성물	대한민국	중앙대 산학협 력단	2018. 11. 16	10-2018-0 142027				100%

4) 전문 연구 인력 양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	연구보조원	2018		○			○		○					
2	연구보조원	2018		○				○				○		
3	연구보조원	2018		○				○		○				
4	연구보조원	2018		○				○						
5	연구보조원	2019		○				○		○				
6	연구보조원	2019		○				○		○				

- 5) 정책 활용·홍보 전시  
- 홍보 1건(CEOSCORE DAILY, 2019)

# CEOSCORE DAILY

## 동국제약, 천연물 '아토피' 치료제 개발...2023년 출시 목표

기사입력 2019-10-22 07:00:05 | 최종수정 2019-10-22 07:00:05 | 김윤선 기자 | [yskk@ceoscore.co.kr](mailto:yskk@ceoscore.co.kr)

동국제약(대표 오흥주)이 2023년 출시를 목표로 천연물 기반의 아토피 피부염 치료제를 개발하고 있는 것으로 확인됐다.

22일 관련 업계에 따르면 동국제약은 오리나무 추출물을 이용한 천연물 유래의 아토피 피부염 치료제를 개발하고 있다. 현재는 임상 2상 진입을 위한 연구가 순조롭게 진행되고 있다.

동국제약은 해당 의약품을 2023년 출시하는 것을 목표로 하고 있다. 출시 첫해 35억 원의 매출을 올릴 것으로 기대되고 있다. 2025년에는 약 360억 원대의 대형 제품군으로 성장할 것으로 전망되고 있다.

동국제약은 현재 중앙대약대와 중앙대의대와 손잡고 공동연구를 진행하고 있다. 중앙대학교 산학협력단이 출원한 '물오리나무 발효추출물을 포함하는 아토피피부염 예방, 개선, 또는 치료용 조성물' 특허는 2017년 등록된 바 있다.

아토피피부염 환자는 계속해서 증가하고 있어 관련 시장 성장성도 높은 편이다. 건강보험심사평가원에 따르면 국내에서 아토피피부염으로 진료 받은 환자는 최근 몇 년 동안 90만 명대를 유지하고 있다.

환자 수는 90만 명대에서 크게 늘지도 줄지도 않고 있지만 요양급여비용총액은 이와 달리 꾸준히 늘어나는 추세다. 아토피피부염 요양급여비용총액은 2014년 357억 원에서 지난해 436억 원으로 4년 새 21.9% 증가했다.

특히, 아토피피부염은 완치제가 없고 치료제 대부분을 수입에 의존하고 있는 것으로 알려졌다.

해당 의약품이 개발에 성공하면 국내 농가 소득에도 도움을 줄 것으로 예상된다. 오리나무는 국내 자생식물로서 기존부터 잎과 나무껍질은 열과 장염을 치료하는 데 쓰이기도 했던 것으로 전해진다.

[CEO스코어데일리 / 김윤선 기자 / [yskk@ceoscore.co.kr](mailto:yskk@ceoscore.co.kr)]

김윤선 기자 ([yskk@ceoscore.co.kr](mailto:yskk@ceoscore.co.kr))  
Copyright @CEO LAB. All rights reserved.

### 3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후 대책(후속연구의 필요성 등)

#### 1) 세부 연구 목표

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
원생약 품질관리 기준 확립	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>지역별 원생약 확보 및 분석 완료</li> <li>성분프로파일 완료</li> </ul>
제조 공정 표준화 완료	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>품질관리 기준 및 제조 공정 표준화 완료</li> </ul>
대량 생산 공정 확립	15	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>100kg 이상의 bGMP대량 생산 공정 완료</li> </ul>
동물효력시험 및 작용 기전 연구	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>in-vitro/in vivo 아토피피부염 동물모델 효력평가 완료</li> <li>아토피 피부염 동물모델에서 오리나무 추출물의 유효성 평가 완료</li> </ul>
기준 및 시험방법 확립	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료의약품/완제의약품 기준 및 시험방법 확립</li> </ul>
완제의약품 제형 완료	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>약물 전달에 최적화된 외용제 제형(연고, 크림, 겔) 연구 완료</li> <li>완제의약품 안정성 확보(장기/가속 3개월) 완료</li> </ul>
임상프로토콜 개발	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>CRO 및 외부 전문가를 통한 임상 프로토콜 개발 완료</li> </ul>
임상2상 IND자료 작성 및 신청	30	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>임상시험계획승인 신청서 작성 완료</li> <li>임상2상 IND 식품의약품안전처에 신청 완료</li> </ul>
합계	100점	100	

2) 정량적 연구 목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20												15	15	10	10				
최종목표	2										4	2		18	6	10				
연기간내 달성실적	2										6	1	2.4	19	6	6	1			
달성율(%)	100										125	50	-	105	100	60	100			

3) 목표 미달성 사유 및 차후 대책

항목	목표	실적	대책
비SCI	2건	1건	- 현재 SCI 논문 추가로 게재 예정임(3월 확정)
인력양성	10건	6건	- 1~3차년도까지 연구에 참여했던 연구원들을 연구과제 종료후에도 성과 창출될 수 있도록 계속 관리 예정



## 4. 연구결과의 활용 계획

### 4-1. 연구개발 결과의 활용방안

- 1) 안전성과 유효성이 확보된 아토피피부염 치료제 천연물 의약품 개발
  - 임상2상, 임상3상 수행하여 신약 개발
- 2) 오리나무 추출물 유래의 기능적 단일 compound 분리 및 규명을 통한 경구용 의약품 개발
- 3) 면역과민 반응에 의한 피부상태 개선용 건강기능식품 개발
  - 개별인정형원료 개발: 인체적용시험 수행
- 4) 아토피 완화 기능성 화장품 개발(기능성 화장품 동물실험 금지에 따라 오리나무 물 추출물을 신규 제조 하여 세포시험(iv-vitro) 수준에서 아토피 개선 효과 확인 후 기능성 화장품 개발 추진 예정)
- 5) 나노캐리어 의약품 전달기술을 이용한 다양한 외용제품 개발

### 4-2. 기대성과 및 파급효과

#### 가. 기술적 측면

- 본 과제를 통해 원료생약의 규격화 및 표준화 기술 확보 및 아토피 피부질환 개선에 대한 다양하고 과학적인 검증을 거쳐 그 효능을 입증하였고, 우수한 효능을 갖는 피부 질환 개선제의 개발과 피부 질환 개선 효능 검증 기법을 개발 보급하는 효과를 기대할 수 있음. 따라서 관련 산업체나 다른 연구기관이 본 개발기술을 신뢰하고 쉽게 도입할 수 있으므로 기술적 파급효과를 가져올 수 있을 것으로 사료 됨.

#### 나. 경제적 · 산업적 측면

- 유아의 전유물이었던 아토피 피부염이 환경 오염, 스트레스 및 주거환경 등의 변화로 성인으로 확산될 뿐만 아니라 피부 건조증을 호소하는 노인 인구의 증가로 인해 아토피 시장은 급속도로 커지고 있음.
- 글로벌 아토피 피부염 시장은 2022년까지 56억 달러 규모로 성장이 예상되고, 연평균 성장률(CAGR) 3.8%임.
- 본 과제를 통해 천연물 소재인 오리나무추출물로부터 아토피 치료제 개발이 된다면 이의 경제 산업적 중요성은 매우 클 것으로 예상할 수 있음. 그 근거로는 현재까지 아토피치료제는 거의 모두 수입에 의존하고 있으며 그나마 완치효능이 없어 장기적 복용이 요구되므로 환자 본인은 물론 국가적으로 막대한 지출이 계속되고 있는데 이를 크게 개선할 수 있을 것으로 예측됨.
- 글로벌 천연물의약품 시장 규모는 23조원으로 추정되며, 이중 전문의약품으로 구분된 천연물의약품은 18조원을 차지할 것으로 예상됨. 본 과제 수행에서 개발되는 천연물을 이용한 아토피치료제는 기존 제제의 부작용을 감소시키고 활성을 높임으로써 시장에서 월등한 경쟁력을 발휘하여 국내 시장을 넘어 글로벌 블록버스터 천연물의약품으로 탄생되면 국가

경제에 크게 기여.

- 본 과제를 통해 제품화가 가능하게 되면 유사한 산업체 연구가 활성화되어 여타 천연물을 이용하여 제품화 하고자하는 사회적, 산업적 분위기가 고조될 것이며, 이는 연관 산업으로 파급효과가 매우 클 것으로 사료됨. 즉, 제약 산업뿐만 아니라 화장품, 식품 산업 등 천연물신소재 발굴 및 활용 소재산업 전반에 미치는 영향이 클 것.
- 즉, 일차적으로는 아토피 환자의 삶의 질을 높임으로 해서 사회 경제적 손실을 줄일 수 있으며, 천연물의약품 연구개발 및 산업뿐만 아니라 건강기능성 식품 등의 근간이 되고, 더 나아가서 국민의 공공보건 및 생산력 그리고 일상적인 삶의 질을 향상시키는데 기여할 것으로 전망됨.

## 붙임. 참고문헌

1. 의약품등의 독성시험기준(제2017-71호, MFDS, 2017년 08월 30일).
2. OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG402(24 Feb 1987) Acute Dermal Toxicity.
3. OECD Guideline for Testing of chemicals, TG410(12 May 1981) Repeated Dose Dermal Toxicity:21/28-day study.
4. OECD Guideline for Testing of Chemicals, TG471(21 July 1997) Bacterial Reverse Mutation Test.
5. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. TG 473(2016) *in vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test.
6. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG474(2016) Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.