

(옆면)

(앞면)

314011-5

공
보
배
추
를
활
용
한
골
다
공
증
치
료
용
식
·
의
약
소
재
의
개
발
및
산
업
화
최
종
보
고
서
(건고덕 14p)

2019

(건고덕13p)

농
림
축
산
신
성
부
농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원
(건고덕

17p)

농생명산업기술개발 사업 제5차 연도 최종보고서(건고덕 13p)

발간등록번호

11-1543000-002889-01

(건고덕31p)

공보배추를 활용한 골다공증 치료용 식·의약
소재의 개발 및 산업화
최종보고서

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

2019. 10. 28.

(건고덕15p)

주관연구기관 / 한국생명공학연구원
협동연구기관 / 고려제약주식회사

(건고덕 15.5p)

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

(건고덕 20p)

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “곰보배추를 활용한 골다공증 치료용 식·의약 소재의 개발 및 산업화”(개발기간 : 2014. 07. ~ 2019. 07.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 10. 28.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자)



협동연구기관명 : 고려제약주식회사 (대표자)



주관연구책임자 : 노 문 철

협동연구책임자 : 박 지 훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	314011-5	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.07.29.~ 2019.07.28.	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	곰보배추를 활용한 골다공증 치료용 식·의약 소재의 개발 및 산업화			
연구책임자	노문철	해당단계 참여연구원 수	총: 95명 내부: 85명 외부: 10명	해당단계 연구개발비	정부:5,000,000천원 민간:1,667,000천원 계:6,667,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 95명 내부: 85명 외부: 10명	총 연구개발비	정부:5,000,000천원 민간:1,667,000천원 계:6,667,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원, 면역조절소재연구센터			협동기관명 : 고려제약주식회사	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명:			상대국 연구기관명: 연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과 의 보안등급 및 사유	원료개량을 통한 독성제거 및 적응증 탐색을 위한 후속연구 기간인 5년간 비공개를 신청함.
--------------------------	---

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	7	13	1				43	1			

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) | 보고서 면수

〈요약문〉

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><연구개발 목표> 본 연구의 목표는 국내 농산물 자원 유래 기능성 성분(추출물 또는 분획물)을 활용하여 골다공증 질환 치료용 식·의약 소재를 개발하고 산업화하는 것으로, 전임상 및 임상시험을 통하여 성공적인 천연물 유래 신약을 개발하고 새로운 시장창출의 성공모델을 제시하고자 함.</p> <p><연구개발 내용></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 작용기전 연구 ○ 후보 농산물의 계약재배 실시 ○ 천연물 소재의 안전성(전 임상) 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 전 임상 전문기관을 통한 전 임상 시험 : 단회투여독성, 반복투여독성, 유전독성, 안전성 약리 시험 ○ 소재 표준화 및 규격화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 원료 표준화, 지표물질 선정, 생리활성 물질 분리/정제 - 최적 배합비 연구 및 표준화 ○ 안정성 시험 : 장기, 가속, 가혹 시험 ○ 실험실 및 대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립 ○ 제제 연구 ○ 제품화 연구 ○ 제품 시장 진입 전략 수립 ○ 임상시험
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ SCI 논문 5편, 학술발표 7건 ○ 국내특허: 등록 3건, 출원 3건; 국외특허: 등록 3건, 출원 6건 ○ 기술실시계약 1건 (선금금 5억 원) ○ 인력양성 8인, 고용창출 12인 ○ 홍보실적 9건 ○ 곰보배추로부터 5종의 phenolic compounds, 11종의 flavonoids, 2종의 triterpenoid, 21종의 sesquiterpenoid, 1종의 monoterpenoid, 3 종의 glycerol fatty acids로 총 43종의 유효화합물 분리정제 ○ 본 연구를 위해 후보 농산물의 계약재배 실시(임상시험에 필요한 원료공급을 위해 1차 년도부터 시작) ○ 원료 및 제제의 안정성 시험 : 장기, 가속, 가혹 시험 ○ 원료 품질 확인을 위한 일원화된 COA (Certificate Of Analysis) 확립 : 건조감량, 색상, 중금속, 잔류농약 분석, 미생물 한도시험, 비중 등의 지표 항목 설정 및 신규 기시험 확립 ○ CMC 제제 및 제형연구 ○ 원료 소재의 전임상 시험을 완료함 <ul style="list-style-type: none"> - 레드 전임상 시험 <ul style="list-style-type: none"> 가. 단회투여독성시험 완료 나. 4주 반복 용량결정(DRF)시험 완료 다. TK Validation 완료 라. 유전독성시험 완료 마. 안전성약리시험 완료 바. 26주 반복투여 독성시험 완료 - 비글견 전임상 시험

	<p>가. TK Validation 완료</p> <p>나. 4주 반복 용량결정(DRF)시험 완료</p> <p>다. 26주 반복투여 독성시험 완료</p> <p>라. 4주 회복시험 완료</p> <p>- 영장류 전임상 시험</p> <p>가. 영장류 4주 반복 용량결정(DRF)시험 완료</p> <p>나. 영장류 39주 반복투여독성 시험완료</p> <p>○ 원료가 적용된 시작품의 기능성 극대화를 위한 제품 공정 확립하였고 지표성분연구를 통한 기준 및 시험방법(MV)을 확립하였으며 이를 바탕으로 대량추출 원료 생산 제조공정 및 표준화 완료함</p> <p>○ 지속적인 후보 농산물 소재 성분의 QC/QA를 위한 지표성분의 프로파일링 및 정량/정성 분석법 체크</p> <p>○ IND filing</p> <p>- CTD 작성완료</p> <p>- 임상 1, 2상 프로토콜 작성</p> <p>○ 임상시험</p> <p>- 임상시험용 의약품 제조</p> <p>- 임상 1, 2상 IND신청 (비글 반복투여독성으로 인해 식약처 IND반려)</p> <p>- 원료개량(70% 이하 EtOH 추출 및 분획)하여 적응증탐색(in vitro, in vivo) 및 간이독성시험(in vivo) 진행 중</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 농가 소득 및 지역 경제 활성화에 이바지</p> <p>- 국내 농산물 소재로 골다공증 치료용 천연물 신소재를 개발함으로써 농가의 안정적인 공급망 확보 및 농가소득의 창출을 가져올 수 있음.</p> <p>- 계약재배를 통한 국내산 농산물을 원료로 사용하므로 신약의 매출이 늘어날수록 계약재배 농산물의 확대를 가져올 수 있으며 고부가가치 농산물의 증가로 인한 농가 및 지역 경제의 활성화가 예상된다.</p> <p>- 계약농가의 일자리 및 기업의 생산직, 영업직 등의 일자리 창출 가능.</p> <p>○ 국가 공공복지 및 과학기술 발전에 이바지</p> <p>- 고령화 사회로 접어든 국민들의 삶의 질 개선에 이바지.</p> <p>- 골다공증 치료제 개발에 농산물 신소재를 적용함으로써 기초 원천기반기술 개발 및 제시.</p> <p>- 향후 농산물 신소재를 이용한 천연물 치료제 개발 사업에 원천기술뿐만 아니라 전임상/임상시험의 적절한 모델 제시.</p> <p>- 유효 생리활성 신소재의 발굴은 국가 5대 중점연구 분야와 연계성 연구가 가능함으로써 시너지 효과를 창출할 수 있음.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>농산물자원</p>	<p>골다공증</p>	<p>계약재배</p>	<p>전임상시험</p>	<p>임상시험</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>agricultural resources</p>	<p>osteoporosis</p>	<p>contract farming</p>	<p>preclinical test</p>	<p>clinical test</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	12
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	159
4. 연구결과의 활용 계획 등	168
붙임. 참고 문헌	169

〈별첨〉 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

(1) 최종목표

본 연구의 목표는 국내 농산물 자원 유래 기능성 성분(추출물 또는 분획물)을 활용하여 골다공증 질환 치료용 식·의약 소재를 개발하고 산업화하는 것으로, 전임상 및 임상시험을 통하여 성공적인 천연물 유래 신약을 개발하고 새로운 시장창출의 성공모델을 제시하고자 함.

(2) 세부목표

<제1세부 한국생명공학연구원>

- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 대량화 및 표준화 연구
- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 지속적인 원료 공급 및 QC/QA
- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 작용기작 구명 연구
- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 *in vivo* 작용기작 구명 연구
- 국내 농산물 자원 유래 기능성 성분의 작용기작 구명 심화 연구

<제1협동 고려 제약주식회사>

- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 제제 안정성 및 제형 연구
- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 전임상 시험 완료
- 임상 2상 완료 및 임상 3상 IND 신청

1-2. 연구개발의 필요성

(1) 골다공증 연구개발의 필요성

- 골다공증(Osteoporosis)이란 뼈의 질량감소와 뼈 조직의 구조학적 퇴화를 나타내며 뼈를 구성하는 미네랄(특히 칼슘)과 기질의 감소 상태를 보이는 전신적인 진행성 골격질환으로 골절위험이 지속적으로 증가되는 질환임(한국식품의약품안전청 2011).
- 골다공증은 주로 연령증가에 따른 자연적인 노화 과정으로 일어나며 골 손실에 비하여 골 생성이 낮아짐으로써 발생됨. 특히 폐경기 이후 여성은 뼈의 강도 유지에 중요한 역할을 하는 여성호르몬인 에스트로겐(estrogen)의 분비가 중지됨에 따라 뼈로부터 칼슘 소실을 유발하게 되어 골다공증 발생 위험이 높아짐.
- 골다공증은 주로 엉덩이(hip) 및 고관절, 척추(spine), 그리고 손목(wrist) 등의 부위에서 많이 나타남.
- 우리나라를 포함하여 미국, 유럽, 신흥부흥국(BRIC; Brazil, Russia, India and China) 등 전 세계의 나라들이 고령사회로 진입하면서 골다공증 관련 질환을 앓고 있는 인구가 급속하게 늘고 있으며, 골다공증은 주로 50세 이상의 사람에게서 나타나서 대부분 만성적으로 이어짐.
- 2009년 전 세계 골다공증 보유 인구는 약 1.6억 명이며, 이 중 우리나라는 74만 명으로 추정되었음.
- 전 세계 질환 시장의 큰 비중을 차지하는 미국, 일본, 그리고 5개 유럽국가(독일, 프랑스, 이탈리아, 스페인 그리고 영국)의 골다공증 보유 인구는 약 1.17억 명의 여성과

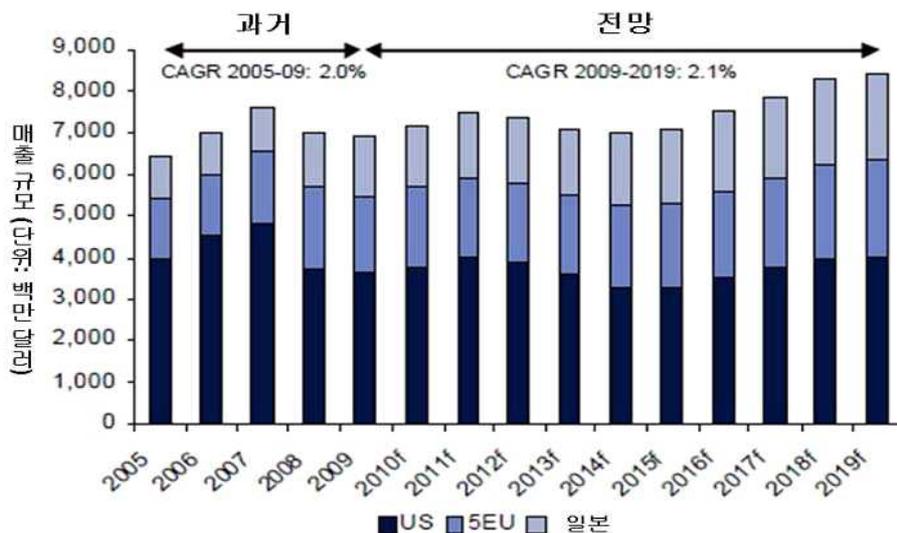
4,500만 명의 남성으로 추정됨. 특히 향후 2020년까지 골다공증 여성 인구가 지금보다 1,700만 명이 증가한 1.34억 명이 될 것으로 예상됨(Datamonitor 2010).

- 2009년 우리나라 여성 골다공증 인구는 68만 7,524명으로 집계 되었으며, 남성 골다공증 인구는 5만 2,487명으로 집계 되었음. 남성 골다공증의 경우 2005년 2만 5,491명에서 2009년 5만 명이 넘어서면서 2배 이상 증가한 것으로 나타남.
- 기존의 골다공증 의약품은 의료보험이 적용되지 않았으나 2010년 미 의료보험개혁으로 인해 골다공증 관련 치료제 및 의료서비스가 65세 이상 고령 인구에게 보장됨.
- 한편, 골다공증은 현재까지 완벽한 진단과 치료법이 정착되지 않아서 기술적으로 보다 많은 연구가 절실함.

(2) 골다공증 치료제 개발에 대한 국내외 현황

① 골다공증 치료제 세계 시장 규모와 주요제품

- 2009년 주요 국가(미국, 5개 유럽국가, 일본)의 골다공증 시장규모는 총 약 70억 달러에 달함 (IMS Health 2010. 3; Datamonitor 2010. 6).
- 골다공증 시장은 꾸준한 성장세를 유지하고 있음. 2005-2009년 사이 연평균 2%로 성장하였으며, 향후(2009-2019년)에도 이와 비슷한 연평균성장률(2.1%)을 보이며 지속적으로 시장규모가 확대될 전망이다.
- 골다공증은 질환 부담이 높은 암 질환과 비교 시, 폐암 다음으로 오랜 기간 부담을 지우는 만성 질환이므로, 관련 치료제 시장이 점점 더 커질 것으로 예상됨.
- 2012-2014년 Bonviva 등 주요 제품의 특허가 만료될 예정이므로 제네릭이 출시되어 골다공증 시장이 일시적으로 그 규모가 감소할 것이나, 활발한 파이프라인 개발로 인하여 2019년에는 85억 달러로 성장할 것으로 전망됨.



출처: 'Commercial Insight: Osteoporosis', Datamonitor (2010)

- 골다공증 시장에서 가장 큰 비중을 차지하는 제품인 Actonel 및 Bonviva 등의 특허가 곧 만료될 예정으로, 골다공증 시장은 차세대 의약품에 대한 새로운 국면을 준비해야 하는 상황임 ([표 1]).

[표 1] 주요 골다공증 의약품 특허 만료 전망

Brand	미국	일본	유럽
Actonel (risedronic acid; WarnerChilcott/Sanofi-Aventis)	2014	2010	2010
Bonviva IV (ibandronic acid; Roche/GlaxoSmithKline)	2014	n/a	2013
Bonviva oral (ibandronic acid; Roche/GlaxoSmithKline)	2012	n/a	2011
Aclasta (zoledronic acid;Novartis)	2013	n/a	2012
Evista (raloxifene; Eli Lilly)	2014	2015	2015
Protelos (strontium renalate;Servier)	n/a	n/a	2015
Forteo (teriparatide; Eli Lilly)	2018	n/a	2018

* 단, n/a는 not applicalbe(해당사항 없음)

출처: Thomson Pharma(2009); 'Commercial Insight: Osteoporosis', Datamonitor (2010. 6)

- 2009년 매출액을 기준으로 할 때, 시장규모가 가장 큰 제품은 Wamer Chilcott/Sanofi-Aventis사의 Actonel brand franchise(15.2억 달러)이며, 그 다음으로 Roche/GlaxoSmithKline의 Bonviva(9.4억 달러), Merck&Co.의 Fosamax brand franchise(8.6억 달러), 그리고 Eli Lilly의 Evista(8.1억 달러)와 Forteo(6.4억 달러) 순임.

[표 2] 골다공증 관련 주요 기업의 보유 브랜드 수 및 매출규모 현황

기업	보유 브랜드 수	브랜드 매출규모 (2010, \$ m)
Eli Lilly	2	1,854
Roche	3	1,129
Warner-Chilcott*	2	1,027
Merck & Co**	1	925
Novartis***	2	579
Sanofi	1	315
Servier	1	314
GlaxoSmithKline	2	235

※ *는 Actonel (risedronate)과 Actonel with calcium을 한 브랜드로 간주함.

는 Fosamax (alendronate)와 Fosamax Plus D (alendronate and vitamin D)를 한 브랜드로 간주함. *는 Aclasta/Reclast (zoledronic acid) 매출규모임.

- 그러나 대부분의 골다공증 제품은 2014년까지 특허가 만료될 예정이며, 그에 따른 제네릭의 시장 침투가 예상됨.
- 2005-2009년 사이 신흥부흥국(BRIC; Brazil, Russia, India and China)을 중심으로 골다공증 시장은 빠른 성장률(CAGR 8.7%)을 보이고 있으며, 2009년 이 지역에서 발생된 매출규모는 약 3.3억 달러임.

- BRIC과 한국 등을 중심으로 한 다른 신흥부흥국에서의 골다공증 발병 빈도수도 높으며, 그 지역의 경제가 성장함에 따라 제네릭 보다는 브랜드 의약품을 더 선호하는 경향이 있어서 향후 미국과 유럽에서 특허만료가 된 제품들에게 새로운 시장 기회가 될 것으로 전망됨.

② 향후 골다공증 치료제의 전망

- 미국, 5EU, 일본 등의 골다공증 시장이 향후 확대될 것으로 전망됨.
- 현재 미국이 절대적으로 가장 큰 시장규모를 차지하고 있으나, 2009-2019년 동안 연평균성장률이 가장 높은 나라는 일본으로 예상됨. 2009-2019년 동안 미국의 연평균성장률은 1.3%, 5EU는 2.5%, 일본은 10.1%로 전망됨.
- 지속적인 일본의 고령인구 증가와 새로운 의약품 출시 가능성(Forteo 또는 Bonviva 등), 현지 회사와의 파트너십 전략으로 일본 골다공증 시장의 기회요인이 점점 증가됨.
- 현재 골다공증 시장의 가장 큰 규모를 형성하고 있는 bisphosphonate 클래스의 매출이 2006년 이후 침체되고 있었으나, 최근 이 클래스의 새로운 제품인 Aclasta 등이 출시되어 시장이 커질 전망이다.
- Parathyroid hormone & analogs 클래스는 향후 2019년에는 13.9억 달러의 시장 규모를 형성하여 두 번째로 큰 제품 시장을 이룰 것으로 전망됨.
- 뼈의 칼슘을 조절(제어)하는 클래스는 2008-2009년 동안 13.8%의 빠른 성장률을 보여주었으며, 향후 2019년에는 2.5억 달러의 매출규모를 달성할 것으로 전망됨 (MIDAS sales data and Prescribing Insight, IMS Health, 2010. 3).
- 향후 Anabolic 제품과 새로운 의약품 클래스가 시장 성장을 주도할 것으로 전망됨.

(3) 기존 치료제의 문제점 및 새로운 골다공증 치료제 개발의 필요성

- 현재 골다공증 시장의 가장 큰 규모를 형성하고 있는 bisphosphonate 클래스 제제는 치주염 환자의 턱뼈에 괴사를 일으키고 관절통 및 근육통을 유발시키는 등 심각한 부작용들이 보고되고 있음. 또한 bisphosphonate 제제가 모든 파골세포를 파괴하기 때문에 뼈가 흡수된 부위를 새로운 뼈로 채우는 역할을 하는 조골세포의 기능까지 마비시키는 것으로 알려져 있음.
- 이렇게 부작용이 많은 bisphosphonate 제제는 한번 복용하면 몸 밖으로 배출되지 않아서 또 다른 부작용을 배제할 수 없는 만큼 부작용을 최소화하고 안전하게 복용할 수 있는 천연물 신소재의 치료제 개발이 절실함.
- Bisphosphonate뿐만 아니라 골다공증 치료에 사용되고 있는 에스트로젠 대체제(SERM) 또한 장기 복용 시 유방암과 자궁암 같은 부작용을 나타낸다는 결과들이 있어서 골다공증 치료에 사용 시 신중을 기해야 함.
- 국내외 연구진들이 파골세포의 분화 작용기작과 생체 내 뼈 손실을 저해할 수 있는 여러 인자들을 찾는 연구를 활발히 진행하고 있지만, 많은 연구 결과들을 바탕으로 개발 중인 치료제들이 파골세포뿐만 아니라 여러 다른 세포들을 저해할 수 있어서 생체 내 면역 기능 및 다른 기관의 손상 없이 파골세포의 분화와 활성만을 특이적으로 저해할 수 있는 물질의 개발이 필요함.

- 최근 파골세포의 형성 및 뼈 흡수에 중요한 osteoclast-associated receptor (OSCAR)와 v-ATPase V0 subunit d2 (Atp6v0d2) 등이 발견되어 유전자를 이용한 뼈 질환 치료의 가능성도 제시되고 있지만, 이러한 연구들은 아직 분자적인 수준에 머물고 있어서 보다 많은 연구가 진행되어야 함.
- 골다공증은 증상이 쉽게 나타나지 않으며 웬만한 뼈 손실로 고통이 수반되지 않기 때문에 골다공증을 진단받기 전에 예방적인 차원에서 장기적으로 안전하게 복용할 수 있는 제제의 개발이 절실함.
- 본 연구팀의 선행연구결과 파골세포의 형성을 억제할 뿐만 아니라 난소적출 및 LPS-유도 골다공증 동물모델에서 골다공증 치료 효과가 탁월한 농산물 소재를 찾을 수 있었으며, 본 과제를 통하여 농산물 소재를 활용한 골다공증 치료용 천연물 신약을 개발하고자 함. 특히 후보 농산물 소재는 식품의약품안전처에 등재된 식용가능 원재료로 독성이나 부작용이 없는 안전한 소재라 판단되며, 이를 활용하여 골다공증 예방 및 치료용 천연물 신약을 개발한다면 많은 부작용이 알려져 있는 기존의 골다공증 치료제 시장을 잠식할 수 있을 것으로 기대함.

1-3. 연구개발 범위

- 천연물유래 소재 생리활성 평가
 - IL-6/STAT3 루시퍼라제 저해활성 및 항염증 활성 검증
- 작용기전 연구
 - in vitro 및 in vivo 골다공증 치료효능에 관한 작용기전 연구
 - 파골세포 분화 저해활성 기전 연구
- 소재 표준화 및 규격화 연구
 - 선정된 소재로부터 지표물질 및 생리활성 물질의 분리/정제, 구조 동정
 - 원료의 지표물질 3종 이상 선정
 - 원료의 표준화를 위해 지표성분의 정량 및 정성 분석법 개발
 - 도출된 소재의 생물전환에 의한 활성증진 연구
 - 추출 분획의 최적 배합비 연구 및 표준화
- 실험실 및 대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립
 - 추출물 제조공정의 개발 및 최적화
 - 대량생산 공정 기술 개발
 - 대량생산된 원료의 QC/QA 분석법 확립
 - MV(method validation) 확립
- 제형 개발
 - 제품의 기능성 극대화를 위하여 시너지 효과를 갖는 복합 제품 개발
 - 제형의 물성 평가

- 제조공정 확립 및 표준화
- 시제품 샘플 생산
 - 제품의 기능성 극대화를 위하여 융합 제품의 공정화
 - 제품의 공정화에 적용하기 위한 scale up
- 후보 소재의 전임상 독성시험
 - 단회투여독성시험
 - 반복투여독성시험 (3주, 13주, 36주)
 - 유전독성시험
 - 안전성약리 시험
- 제품 안정성 확립 및 분석법 연구
 - 제제 가속/가혹 안정성시험
 - 장기 안정성 시험 및 분석(성상, 함량 등)
 - 추출물 단계별 함량 분석
 - 추출물 단계별 유효물질 분석법 개량
 - 기준 및 시험방법 확립
- 임상시험
 - 임상시험용 의약품 생산(3 Lot 분량의 임상시험용 의약품 생산 (KGMP) 및 위약 생산 (KGMP))
 - CRO기관을 통한 임상1, 2상 프로토콜작성 및 IND신청

2. 연구수행 내용 및 결과

<제1세부 한국생명공학연구원>

1. 곰보배추 추출물로부터 생리활성 화합물의 분리정제 및 구조 결정

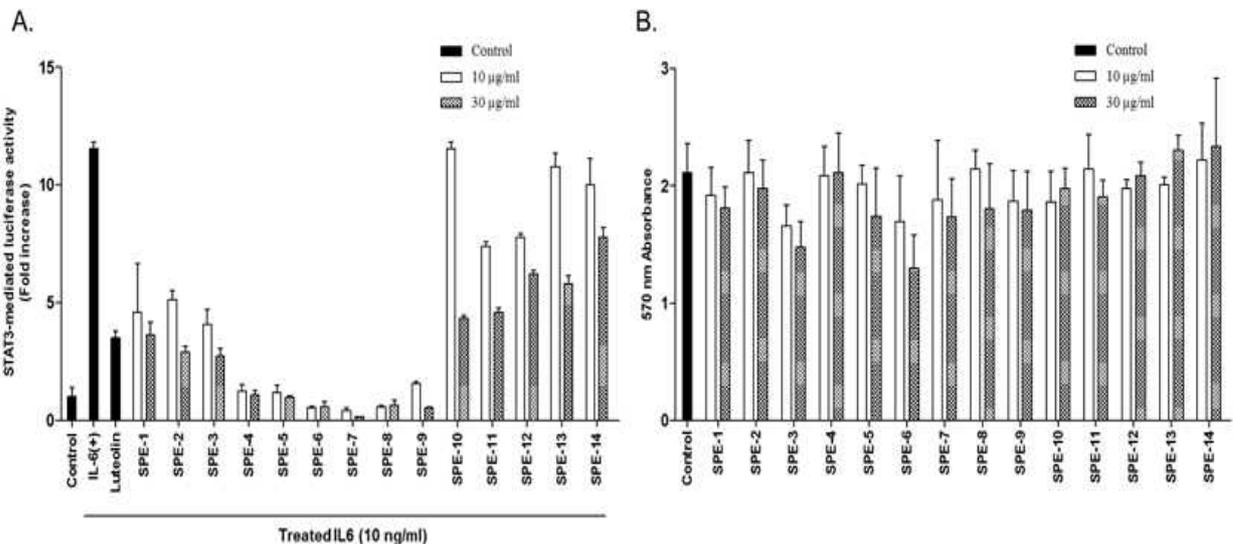
1) 생리활성 화합물의 분리정제 과정

- 곰보배추 30 kg을 음건하고 이를 1cm 미만으로 세절하여 95% 에탄올을 추출용매로 70°C에서 5시간동안 추출기를 활용하여 추출하였음. 이를 통해 95% 에탄올 추출물 2.6 kg을 수득함.

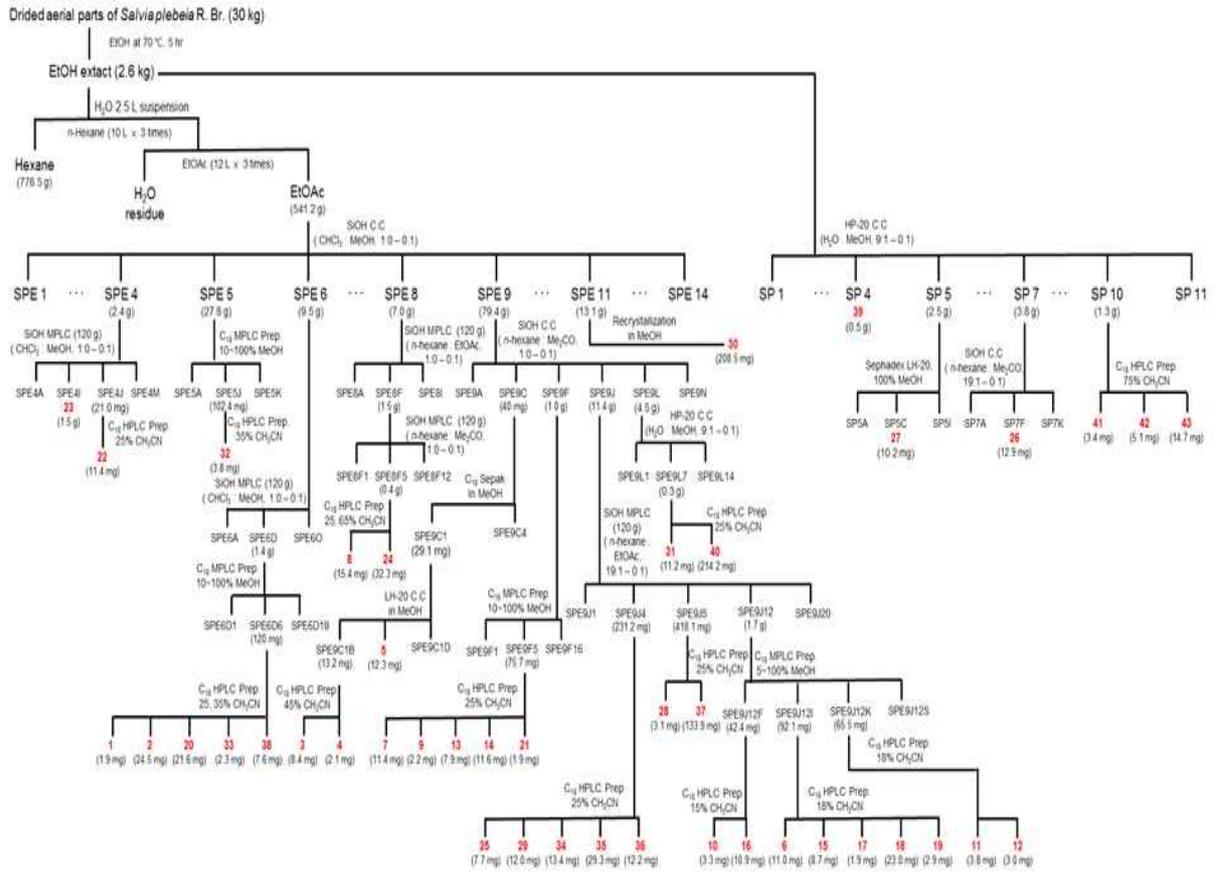


[그림 1] 곰보배추 (*Salvia plebeia* R.Br)의 voucher specimen

- 조추출물 2.6 kg을 *n*-hexane, EtOAc, H₂O의 용매를 활용하여 단계적으로 분획을 실시하였으며, IL-6/STAT3 억제 활성 스크리닝을 기반으로 하는 생리활성 추적 분리법을 이용하여 가장 강한 활성을 갖는 EtOAc를 대상으로 분리 정제를 실시하였음.
- EtOAc 분획물 (541 g)을 CHCl₃와 MeOH를 활용한 컬럼크로마토그래피를 통해 14개의 하위 분획물을 수득하였고 (SPE1-SPE14), 생리활성 추적 분리법을 통해 43종의 생리활성 화합물을 순수 분리하였음 [그림 2, 3].



[그림 2] EtOAc 하위 분획물별 IL-6/STAT3 억제 효과



[그림 3] 생리활성 화합물의 분리 정제 과정

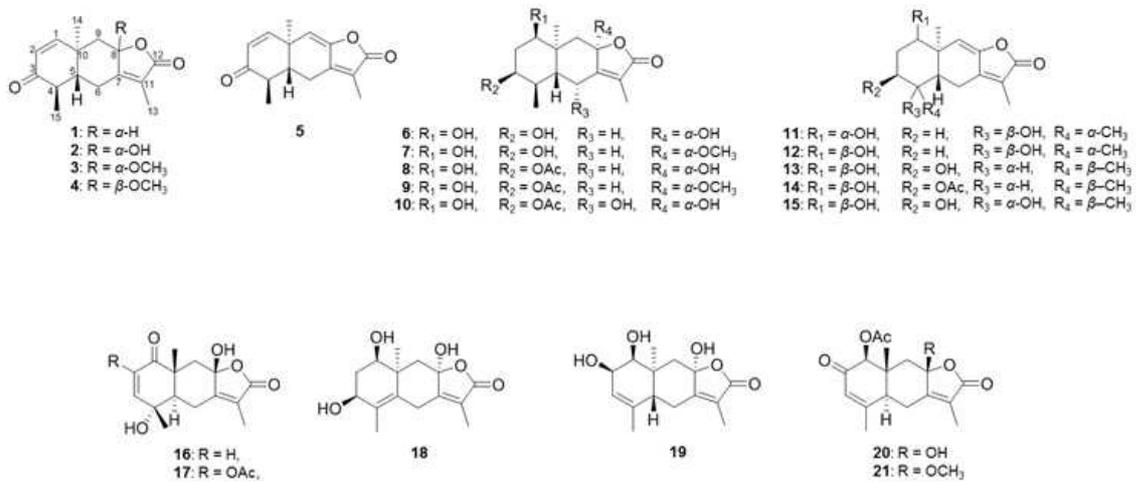
2) 생리활성 화합물의 구조 결정

- 곰보배추로부터 총 43종의 화합물을 분리정제 하였으며, 분리된 화합물들은 각각 5종의 phenolic compounds, 11종의 flavonoids, 2종의 triterpenoid, 21종의 sesquiterpenoid, 1종의 monoterpenoid, 3 종의 glycerol fatty acids로 확인되었음. 분리된 화합물들은 NMR, IR, MS, UV 등의 기기분석을 통해 구조를 동정하였으며, 이중 15종의 sesquiterpenoid 화합물은 신규화합물로 동정되었음.

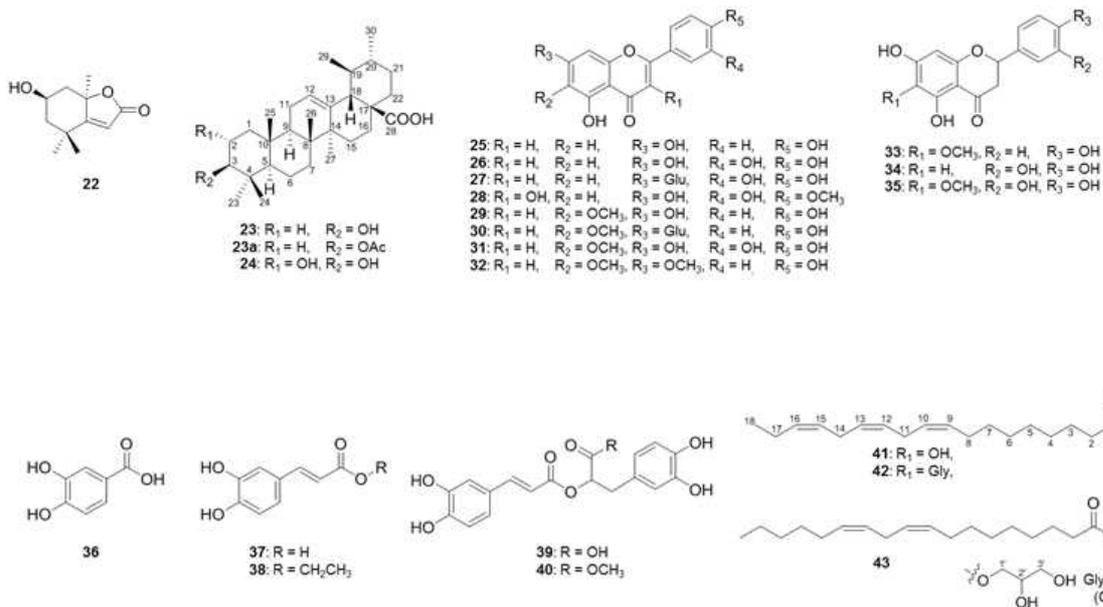
[표 1] 곰보배추 EtOAc 분획물로부터 수득한 생리활성 화합물

화합물 계열	화합물 명	화합물 계열	화합물 명
Sesquiterpenoids	eudebeiolide A (1)	Triterpenoids	ursolic acid (23)
	eudebeiolide B (2)		corosolic acid (24)
	eudebeiolide C (3)	Flavonoids	apigenin (25)
	8-methoxy-eudebeiolide C (4)		luteolin (26)
	eudebeiolide D (5)		luteolin-7-glucoside (27)
	plebeiolide B (6)		isorhamnetin (28)
	8-methoxy-plebeiolide B (7)		hispidulin (29)
	plebeiolide A (8)		homplantagin (30)
	eudebeiolide E (9)		nepetin (31)
	eudebeiolide K (10)		cirsimaritin (32)
	phaeusmane G (11)		6-methoxy-naringenin (33)
	1-epi-phaeusmane G (12)		eriodictyol (34)
	eudebeiolide F (13)		filifolin (35)

	plebeiolide C (14)	Phenolic compounds	protocatechuic acid (36)
	eudebeiolide L (15)		caffeic acid (37)
	eudebeiolide G (16)		ethyl caffeate (38)
	eudebeiolide H (17)		rosmarinic acid (39)
	eudebeiolide I (18)		methyl rosmarinate (40)
	eudebeiolide J (19)		α -linolenic acid (41)
Monoterpenoid	1 β -acetoxy-8 β -hydroxy-2-oxoeudesman-3,7(11)-dien-8,12-olide (20)	Aliphatic compounds	1-linolenoyl glycerol (42)
	(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxy-8-methoxy-2-oxoeudesman-3,7(11)-dien-8,12-olide (21)		1-linoleoyl glycerol (43)
	7-Epiloliolide (22)		



[그림 4] 곰보배추로부터 분리 정제된 Sesquiterpenoids 화합물들의 구조 (1-21)



[그림 5] 곰보배추로부터 분리 정제된 나머지 화합물들의 구조 (22-43)

[표 2] sesquiterpenoid 15종의 물리화학적 성상

[Eudebeiolide A (1)]	yellow amorphous powder; $[\alpha]_{25D} -69.0$ (c 0.1, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 217 (2.16) nm; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$) 224 (-11.8) nm; IR (KBr) ν_{\max} 2918, 2850, 1741, 1680, 1466, 1376, 1180, 1036 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 247.1329 ($\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_3$, calcd. 247.1328).
[Eudebeiolide B (2)]	white amorphous powder; $[\alpha]_{25D} -125.0$ (c 0.08, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 218 (2.32) nm; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$) 217 (-12.7), 243 (-6.7) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3392, 2972, 1750, 1675, 1457, 1375, 1197, 1134 cm^{-1} ; HRFABMS m/z 263.1284 ($\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_4$, calcd. 263.1283).
[Eudebeiolide C (3)]	yellow amorphous powder; $[\alpha]_{25D} -181.5$ (c 0.1, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 218 (2.26) nm; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$) 217 (-21.5), 245 (-7.2) nm; IR (KBr) ν_{\max} 2919, 2850, 1765, 1675, 1467, 1318, 1188, 948 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 299.1255 ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Na}$, calcd. 299.1253)
8-Epi-eudebeiolide C (4)	Yellow amorphous powder; $[\alpha]_{25D} +291.8$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 219 (2.25), 274 (1.49) nm; ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$): 209 (+21.5), 245 (+5.0) nm; IR (KBr) ν_{\max} : 3354, 2918, 2850, 1765, 1677, 1595, 1465, 1379, 1157, 963 cm^{-1} ; HRESIMS: m/z 277.1429 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_4$, 277.1440)
[Eudebeiolide D (5)]	yellow amorphous powder; $[\alpha]_{25D} +92.3$ (c 0.1, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 223 (1.99), 276 (2.15) nm; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$) 209 (+14.0), 255 (-5.0), 296 (+1.2) nm; IR (KBr) ν_{\max} 2917, 2849, 1767, 1675, 1462, 1175, 1038, 718 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 267.0997 ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Na}$, calcd. 267.0992).
[Eudebeiolide E (9)]	yellow amorphous powder; $[\alpha]_{25D} -132.8$ (c 0.1, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 217 (2.06) nm; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$) 241 (-10.1) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3362, 2918, 2850, 1756, 1434, 1178, 1085, 1024, 944 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 319.1518 ($\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Na}$, calcd. 319.1515).
Eudebeiolide K (10)	White amorphous powder; $[\alpha]_{25D} -73.0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 210 (1.96) nm; ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$): 229 (-10.0) nm; IR (KBr) ν_{\max} : 3420, 2920, 2853, 1741, 1383, 1256, 1089, 1027, 938 cm^{-1} ; HRESIMS: m/z 363.1414 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$, 363.1420)
1-Epi-phaeusmane G (12)	White amorphous powder; $[\alpha]_{25D} +36.8$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 273 (2.07) nm; ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$): 226(+0.3), 255(-3.5), 285 (+4.3) nm; IR(KBr) ν_{\max} : 3382, 2919, 2850, 1763, 1653, 1588, 1467, 1314, 1115, 1025, 936 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 265.1436 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_4$, 265.1440)
[Eudebeiolide F (13)]	white amorphous powder; $[\alpha]_{25D} -116.5$ (c 0.1, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 217 (2.15) nm; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$) 224 (-6.4) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3383, 2919, 2853, 1757, 1253, 1089, 1026, 943 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 361.1622 ($\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{Na}$, calcd. 361.1621).
Eudebeiolide L (15)	White amorphous powder; $[\alpha]_{25D} +15.6$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 274 (2.23) nm; ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$): 224 (+1.3), 257 (-4.8), 286 (+4.9) nm; IR (KBr) ν_{\max} : 3422, 2919, 1733, 1663, 1460, 1315, 1170, 1030, 847 cm^{-1} ; HRESIMS: m/z 281.1383 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_5$, 281.1389)
[Eudebeiolide G (16)]	yellow amorphous powder; $[\alpha]_{25D} +63.5$ (c 0.1, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 274 (2.14) nm; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$) 219 (+0.2), 253 (-3.6), 289 (+4.8)

	nm; IR (KBr) ν_{\max} 3371, 2919, 2850, 1746, 1646, 1465, 1015 cm^{-1} ; HRESIMS m/z 287.1249 ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Na}$, calcd. 287.1253).
Eudebeiolide H (17)	Yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -14.2 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$): 215 (2.22) nm; ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$): 209 (-16.3), 231 (+9.0), 258 (-1.1) nm; IR (KBr) ν_{\max} : 3349, 2919, 2853, 1748, 1700, 1463, 1374, 1325, 1200, 1107, 1022, 948 cm^{-1} ; HRESIMS: m/z 335.1125 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_7$, 335.1131)
Eudebeiolide I (18)	Yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -169.8 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$): 215: (2.05) nm; ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$): 213 (-13.6), 232 (-4.9), 250 (-10.9) nm; IR (KBr) ν_{\max} : 3357, 2923, 1739, 1698, 1453, 1327, 1267, 1185, 1056, 950 cm^{-1} ; HRESIMS: m/z 279.1238 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_5$, 279.1232)
Eudebeiolide J (19)	Yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -53.8 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$): 202 (1.99), 270 (0.77) nm; ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$): 204 (-3.9), 244 (-4.9) nm; IR (KBr) ν_{\max} : 3383, 2920, 1742, 1564, 1454, 1384, 1254, 1184, 1145, 1022, 946 cm^{-1} ; HRESIMS: m/z 303.1200 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Na}$, 303.1208)
(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetox y-8-methoxy-2-oxoeude sman-3,7(11)-dien-8,12- olide (21)	Yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ -72.8 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$): 227 (2.11) nm; ECD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta \epsilon$): 214 (-22.0), 236 (+7.4), 264 (-1.2) nm; IR (KBr) ν_{\max} : 3448, 2922, 2848, 1762, 1685, 1456, 1232, 1047, 949 cm^{-1} ; HRESIMS: m/z 357.1308 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$, 357.1314)

[표 3] 화합물 1-5의 ^1H NMR 데이터^a

Position	1 ^d	2 ^d	3 ^c	4 ^d	4 ^e	5 ^e
	δ_{H} (J in Hz)					
1	6.87 (d, 10.2)	6.87 (d, 10.0)	6.88 (d, 10.0)	6.75 (d, 10.2)	6.76 (d, 10.2)	7.18 (d, 10.0)
2	5.86 (d, 10.2)	5.80 (d, 10.0)	5.80 (d, 10.0)	5.83 (d, 10.2)	5.77 (d, 10.2)	5.88 (d, 10.0)
3	-	-	-	-	-	-
4	2.52 ^b , m	2.56, m	2.56, m	2.44 ^b , m	2.41, m	2.52 ^b , m
5	1.73 (td, 12.6, 3.6)	1.72 (td, 12.8, 3.2)	1.73 (td, 13.2, 3.2)	2.44 ^b , m	2.27 (td, 12.0, 6.6)	2.10 (td, 13.2, 4.2)
6a	2.98 (dd, 13.8, 3.6)	2.85 (dd, 13.2, 3.2)	2.88 (dd, 13.6, 3.2)	2.72, (dq, 18.0, 1.8)	2.67 (1H, ddt, 18.0, 6.6, 1.8)	2.94 (dd, 17.4, 4.2)
6b	2.36 (td, 13.8, 1.2)	2.36 (t, 13.2)	2.26, m	2.56, m	2.53 (1H, m)	2.52 ^b , m
7	-	-	-	-	-	-
8	5.09 (dd, 11.4, 6.6)	-	-	-	-	-
9a	2.52 ^b , m	2.38 (d, 13.6)	2.45 (d, 13.6)	2.28 (d, 14.4)	2.18 (d, 14.4)	6.10, s
9b	1.26 (t, 11.4)	1.63 (d, 13.6)	1.62 (d, 13.6)	2.07 (d, 14.4)	2.03 (d, 14.4)	
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	1.82 (d, 1.8)	1.80 (d, 1.2)	1.86 (d, 1.2)	1.89 (d, 2.4)	1.83 (d, 1.2)	1.86 (d, 1.6)
14	1.32, s	1.40, s	1.35, s	1.02, s	0.95, s	1.23, s

15	1.21 (d, 7.2)	1.21 (d, 6.8)	1.21 (d, 6.8)	1.19 (d, 6.0)	1.08 (d, 6.6)	1.13 (d, 6.6)
OAc	-	-	-	-	-	-
OAc-CH ₃	-	-	-	-	-	-
OCH ₃	-	-	3.15, s	3.09, s	3.00, s	-

^a TMS was used as an internal standard; chemical shifts (δ) are reported in ppm; J values are reported in Hz;

^b Overlapping; data were measured in methanol-*d*₄ at ^c 400 MHz or ^d 600 MHz or in ^e DMSO-*d*₆ at 600 MHz.

[표 4] 화합물 1-5의 ¹³C NMR 데이터^a

Position	1 ^c	2 ^c	3 ^b	4 ^c	4 ^d	5 ^d
1	159.9 CH	161.0 CH	160.8 CH	159.2 CH	157.4 CH	157.0 CH
2	127.4 CH	126.7 CH	126.8 CH	126.1 CH	124.7 CH	126.5 CH
3	202.6 C	202.8 C	202.7 C	202.6 C	199.6 C	199.7 C
4	43.8 CH	43.6 CH	43.6 CH	43.8 CH	41.8 CH	41.6 CH
5	50.0 CH	51.8 CH	50.7 CH	42.7 CH	40.8 CH	45.7 CH
6	27.3 CH ₂	25.8 CH ₂	26.1 CH ₂	26.9 CH ₂	25.3 CH ₂	22.8 CH ₂
7	163.6 C	161.4 C	159.5 C	158.1 C	156.3 C	147.4 C
8	79.6 CH	105.2 C	107.8 C	107.7 C	105.7 C	148.2 C
9	45.5 CH ₂	49.2 ^b CH ₂	48.2 CH ₂	49.4 ^b CH ₂	47.6 CH ₂	115.9 CH
10	38.8 C	38.5 C	38.5 C	36.7 C	35.0 C	38.9 C
11	121.8 C	123.5 C	126.5 C	128.0 C	125.8 C	120.5 C
12	176.9 C	174.2 C	173.4 C	173.2 C	170.7 C	170.2 C
13	8.3 CH ₃	8.2 CH ₃	8.2 CH ₃	8.4 CH ₃	8.1 CH ₃	8.4 CH ₃
14	17.9 CH ₃	19.1 CH ₃	19.0 CH ₃	20.8 CH ₃	20.1 CH ₃	21.3 CH ₃
15	12.3 CH ₃	12.5 CH ₃	12.5 CH ₃	12.0 CH ₃	11.5 CH ₃	11.5 CH ₃
OAc	-	-	-	-	-	-
OAc-CH ₃	-	-	-	-	-	-
OCH ₃	-	-	51.7 CH ₃	51.0 CH ₃	50.1 CH ₃	-

^a TMS was used as an internal standard; chemical shifts (δ) are reported in ppm. Data were measured in methanol-*d*₄ at ^b100 MHz or ^c150 MHz or in ^dDMSO-*d*₆ at 150 MHz

[표 5] 화합물 7,9,10,12,13,15의 ¹H NMR 데이터^a

Position	7 ^d	9 ^d	10 ^d	12 ^d	13 ^c	15 ^d
	δ_{H} (J in Hz)					
1	3.43, br.s	3.41 (t, 3.0)	3.30 (t, 2.4)	3.68, br s	3.77 (t, 2.8)	3.79 (t, 3.0)
2a	2.06, m	2.15 (dt, 16.0, 3.0)	2.16, m ^b	1.93, m ^b	2.01 ^b , m	2.38 (dt, 15.0, 3.0)
2b	1.92, m	1.96 (dt, 16.0, 3.0)	1.94 (dt, 15.6, 2.4)	1.72, m	2.01 ^b , m	1.89 (dt, 15.0, 3.0)
3a	3.80, br.s	4.96 (q, 3.0)	5.04 (q, 2.4)	1.95, m ^b	3.80 (dd, 4.8, 2.0)	3.54 (t, 1.8)
3b			-	1.53, m		
4	1.75, m	1.94, m	2.30, m	-	1.75, m	-
5	1.69 (t,	1.83 (td,	1.77 (dd,	2.30 (dd,	2.24 (td,	2.32 (dd,

6a	11.4) 2.02 (t, 13.2)	12.6, 3.6) 2.02 (td, 13.2, 1.8)	11.4, 3.0) 4.97 (d, 3.0)	13.8, 3.6) 3.08 (dd, 16.8, 3.6) 2.50 (ddd, 16.8., 13.8, 1.8)	13.6, 3.6) 2.34 (td, 16.8, 2.0) 2.88 (dd, 16.8, 3.6)	13.8, 3.6) 2.89 (dd, 17.4, 3.6) 2.76 (ddd, 17.4, 13.8, 1.8)
6b	2.79 (dd, 13.2, 1.8)	2.82 (dd, 13.2, 3.6)	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9a	1.93 (d, 13.2)	1.97 (d, 13.8)	2.16, m ^b	5.78, s	5.79, s	5.75, s
9b	2.07 (d, 13.2)	2.10 (d, 13.8)	1.98 (d, 13.8)	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	1.85, s	1.86 (d, 0.6)	1.87, s	1.88 (d, 1.8)	1.88 (d, 1.6)	1.90 (d, 1.8)
14	1.09, s	1.12, s	1.37, s	1.07, s	1.04, s	1.22, s
15	1.06 (d, 6.6)	0.99 (d, 6.6)	1.07 (d, 6.6)	1.25, s	1.07 (d, 6.8)	1.32, s
OAc	-	-	-	-	-	-
OAc-CH ₃	-	2.02, s	2.02, s	-	-	-
OCH ₃	3.12, s	3.13, s	-	-	-	-

^a TMS was used as an internal standard; chemical shifts (δ) are reported in ppm; J values are reported in Hz;

^b Overlapping; data were measured in methanol-*d*₄ at ^c400 MHz or ^d 600 MHz.

[표 6] 화합물 7,9,10,12,13,15의 ¹³C NMR 데이터^a

Position	7 ^c	9 ^c	10 ^c	12 ^c	13 ^b	15 ^c
1	76.7 CH	74.3 CH	76.0 CH	73.6 CH	76.7 CH	76.7 CH
2	34.5 CH ₂	33.1 CH ₂	33.0 CH ₂	27.8 CH ₂	34.8 CH ₂	30.7 CH ₂
3	73.8 CH	75.2 CH	75.9 CH	36.9 CH ₂	73.7 CH	77.6 CH
4	37.3 CH	35.5 CH	32.7 CH	72.3 C	37.2 CH	74.5 C
5	41.6 CH	41.5 CH	43.8 CH	47.2 CH	37.5 CH	40.5 CH
6	25.5 CH ₂	25.6 CH ₂	65.8 CH	20.2 CH ₂	23.6 CH ₂	20.4 CH ₂
7	161.5 C	161.1 C	160.1 C	151.4 C	150.4 C	151.2 C
8	109.1 C	109.1 C	107.5 C	149.6 C	150.1 C	149.5 C
9	46.1 CH ₂	46.2 CH ₂	47.0 CH ₂	121.1 CH	120.9 CH	121.6 CH
10	41.1 C	40.7 C	40.7 C	43.9 C	43.5 C	43.8 C
11	125.0 C	125.2 C	125.2 C	121.0 C	121.1 C	121.2 C
12	173.9 C	173.9 C	174.3 C	173.4 C	173.5 C	173.4 C
13	8.1 CH ₃	8.2 CH ₃	8.5 CH ₃	8.4 CH ₃	8.4 CH ₃	8.4 CH ₃
14	17.5 CH ₃	18.0 CH ₃	21.0 CH ₃	20.5 CH ₃	19.4 CH ₃	21.5 CH ₃
15	16.6 CH ₃	16.0 CH ₃	15.3 CH ₃	22.5 CH ₃	16.2 CH ₃	26.6 CH ₃
OAc	-	173.0 C	173.0 C	-	-	-
OAc-CH ₃	-	21.3 CH ₃	21.3 CH ₃	-	-	-
OCH ₃	50.7 CH ₃	50.8 CH ₃	-	-	-	-

^a TMS was used as an internal standard; chemical shifts (δ) are reported in ppm. Data were measured in methanol-*d*₄ at ^b100 MHz or ^c150 MHz

[표 7] 화합물 16-19, 21의 ¹H NMR 데이터^a

Position	16 ^c	17 ^c	18 ^c	19 ^c	21 ^c
	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)
1	-	-	3.57 (dd, 6.6, 2.4)	3.37 (d, 4.2)	5.21, s
2a	5.81, (d, 10.2)	-	2.13 (dq, 13.8, 2.4)	4.24, br s	-
2b	-	-	1.89 (ddd, 13.8, 6.6, 2.4)	-	-
3a	6.72, (d, 10.2)	6.39, s	3.97 (t, 4.8)	5.31, s	5.99 (q, 1.2)
3b	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	2.03 (dd, 13.8, 3.0)	2.08 (dd, 13.2, 3.0)	-	2.36 (br d, 13.8)	2.88 (br d, 12.6)
6a	3.03 (dd, 13.2, 3.0)	3.04 (dd, 13.2, 3.0)	3.73 (d, 14.4)	2.95 (dd, 13.2, 3.6)	3.16 (dd, 13.8, 3.0)
6b	2.53, m ^b	2.55, m ^b	3.03 (d, 14.4)	2.26 (dt, 13.2, 1.2)	2.42 (td, 13.8, 1.2)
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9a	2.54 (d, 13.8)	2.54 (d, 13.8)	2.08, s	2.07 (d, 13.2)	2.43 (d, 13.8)
9b	1.61 (d, 13.8)	1.65 (d, 13.8)	-	1.97 (d, 13.2)	1.65 (d, 13.8)
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	1.82 (d, 1.2)	1.82 (d, 1.2)	1.81 (d, 1.2)	1.83, s	1.93 (d, 1.2)
14	1.36, s	1.44, s	1.32, s	1.13, s	1.14, s
15	1.41, s	1.46, s	1.87, s	1.78 (d, 0.6)	2.10, s
OAc	-	-	-	-	-
OAc-CH ₃	-	2.18, s	-	-	2.18, s
OCH ₃	-	-	-	-	3.13, s

^a TMS was used as an internal standard; chemical shifts (δ) are reported in ppm; *J* values are reported in Hz;

^b Overlapping; data were measured in methanol-*d*₄ at ^c 600 MHz.

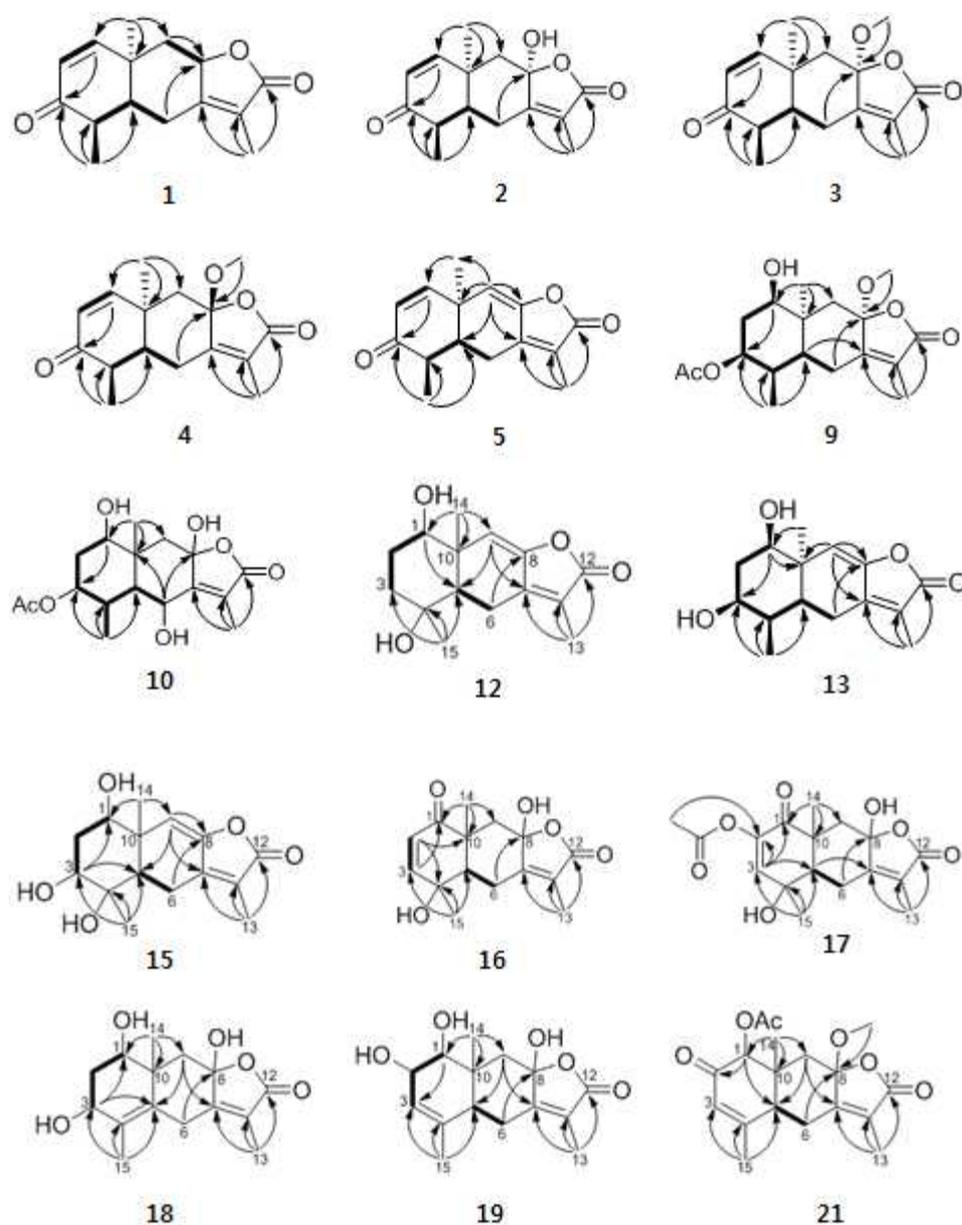
[표 8] 화합물 16-19, 21의 ¹³C NMR 데이터^a

Position	16 ^b	17 ^b	18 ^b	19 ^b	21 ^b
1	204.5 C	197.0 C	74.9 CH	75.8 CH	84.3 CH
2	125.4 CH	142.9 C	34.7 CH ₂	68.0 CH	194.6 C
3	156.1 CH	141.0 CH	70.3 CH	124.9 CH	126.7 CH
4	71.1 C	71.0 C	131.1 C	137.1 C	163.9 C
5	54.4 CH	54.4 CH	134.1 C	43.8 CH	50.2 CH
6	22.2 CH ₂	22.0 CH ₂	26.9 CH ₂	24.3 CH ₂	24.5 CH ₂
7	161.6 C	161.4 C	161.8 C	163.0 C	158.6 C
8	105.5 C	105.0 C	106.1 C	106.1 C	107.1 C
9	46.9 CH ₂	46.7 CH ₂	45.2 CH ₂	46.1 CH ₂	46.4 CH ₂

10	46.7	C	47.3	C	42.5	C	42.0	C	44.1	C
11	123.0	C	123.1	C	121.8	C	122.9	C	127.3	C
12	174.3	C	174.2	C	174.6	C	174.6	C	173.1	C
13	8.3	CH ₃	8.2	CH ₃	8.4	CH ₃	8.2	CH ₃	8.4	CH ₃
14	20.2	CH ₃	20.2	CH ₃	25.1	CH ₃	16.4	CH ₃	12.8	CH ₃
15	22.4	CH ₃	23.0	CH ₃	17.0	CH ₃	21.4	CH ₃	22.2	CH ₃
OAc	-		170.5	C	-		-		172.0	C
OAc-CH ₃	-		20.3	CH ₃	-		-		20.6	CH ₃
OCH ₃	-		-		-		-		-	

^a TMS was used as an internal standard; chemical shifts (δ) are reported in ppm

^b Data were measured in methanol-*d*₄ at 150 MHz

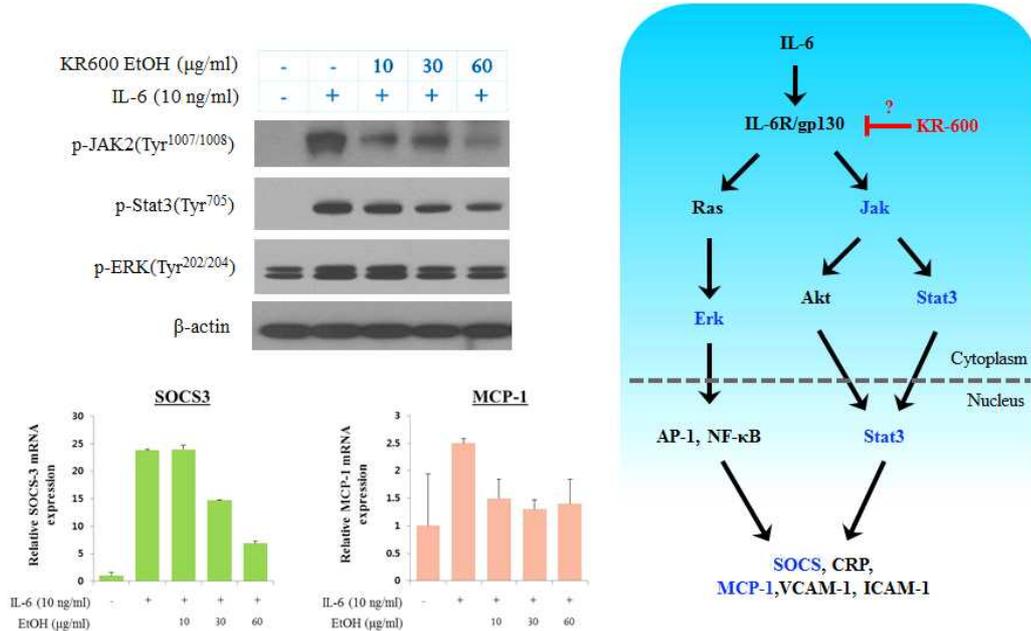


[그림 6] 신규 세스퀘르테르펜 15종의 2D NMR 데이터

2. 곰보배추 추출물과 추출물로부터 분리한 화합물의 생리활성 검증

1) 곰보배추 추출물의 IL-6 신호전달 저해활성 검증

- 곰보배추 추출물이 IL-6 하위 signaling의 인산화를 저해하는 과정을 weston blot법을 활용해 검증한 결과, JAK2, STAT3, ERK, SOCS3, MCP-1 등의 하위 기전을 모두 저해하는 것으로 확인되었음. 이를 통해 곰보배추 추출물은 보다 상위 수준에서 신호 전달을 억제하는 것으로 예상됨 [그림 6].



[그림 7] 곰보배추 추출물의 IL-6 신호전달 저해 기전 연구

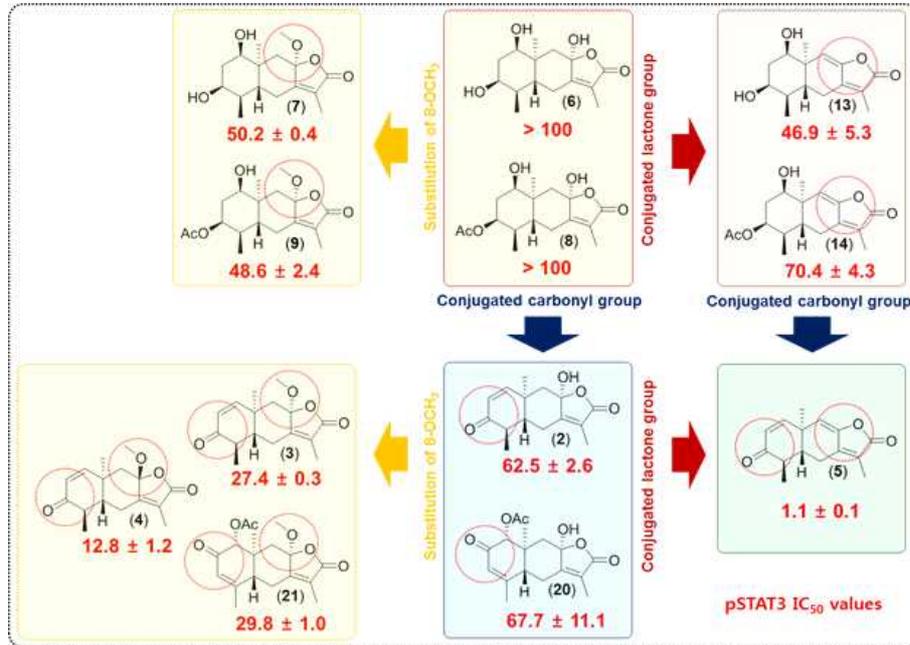
2) 곰보배추 추출물로부터 분리한 화합물의 IL-6/STAT3 억제 효과

- 15종의 신규 화합물을 포함한 sesquiterpenoid (1-21)의 경우에는 화합물의 A ring에 conjugated carbonyl group으로 치환되어 있는 sesquiterpenoids 화합물인 eudebeilide D (5)에서 가장 우수한 IL-6/STAT3 억제 활성을 나타내었으며, 다른 화합물은 비교적 평이한 수준의 활성을 나타내었음.

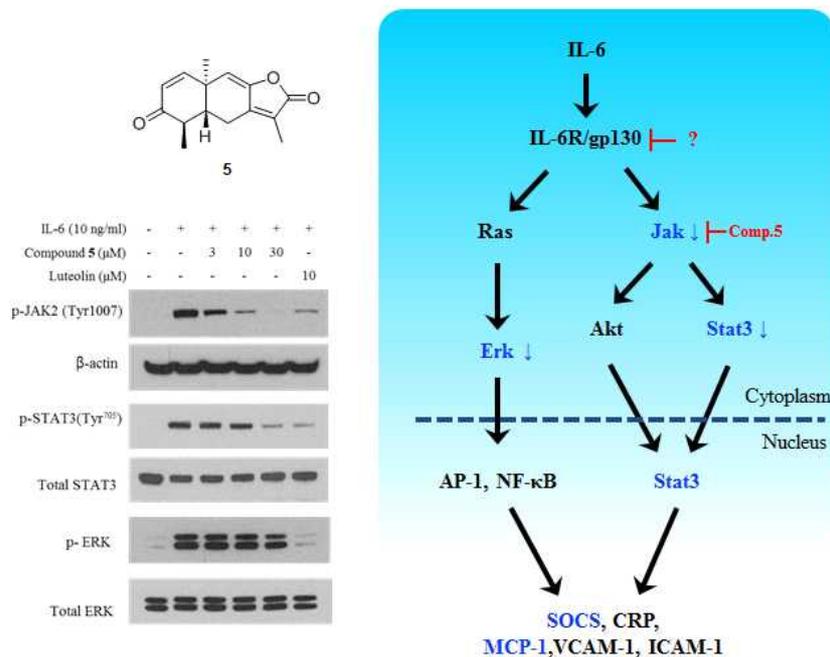
[표 9] 화합물 1-21의 IL-6/STAT3 억제 활성

Compounds	IC ₅₀ (μM)	Compounds	IC ₅₀ (μM)
1	38.8 ± 2.3	12	> 100
2	62.5 ± 2.6	13	46.9 ± 5.3
3	27.4 ± 0.3	14	70.4 ± 4.3
4	12.8 ± 1.2	15	> 100
5	1.1 ± 0.1	16	> 100
6	> 100	17	> 100
7	50.2 ± 0.4	18	> 100
8	> 100	19	> 100
9	48.6 ± 2.4	20	67.7 ± 11.1
10	> 100	21	29.8 ± 1.0
11	> 100	Luteolin ^b	5.0 ± 0.2

- 구조-활성 상관관계(SAR)를 확인해본결과, eudesman-type sesquiterpene lactone 골격에 3-oxo- α,β -unsaturated carbonyl group을 가지고 있는 화합물 1-5가 1,2- (19) 또는 1,3-dihydroxy group (6-10, 18), 1-oxo- α,β - (16, 17) 또는 2-oxo- α,β -unsaturated carbonyl group (20, 21)을 가지고 있는 화합물 6-21과 비교하여 우수한 활성을 나타냄을 확인하였음. 또한, C-8 위치의 hydroxy group이 methoxy group으로 치환된 화합물들이(3, 4, 7, 9, 21) 보다 우수한 활성을 나타냈음. 그리고 conjugated lactone moiety을 가지고 있는 화합물 (5, 13, 14) 이 lactone group만 가지고 있는 화합물 (1-4, 6, 8)과 비교하여 활성이 우수하였음. 결론적으로 C-3의 α,β -unsaturated carbonyl group, C-8의 methoxy group, 그리고 conjugated lactone group의 존재가 IL-6/STAT3 저해활성에 영향을 주는 것으로 생각됨.



- 곰보배추로부터 분리된 화합물 5가 IL-6 하위 signaling의 인산화를 저해하는 과정을 weston blot 방법을 활용해 검증한 결과, JAK2, STAT3 등의 하위 기전을 모두 저해하는 것으로 확인되었음.



[그림 8] 화합물 5의 IL-6 신호전달 저해 기전 연구

- 곰보배추 추출물로부터 분리된 화합물 **22-43** (monoterpenoid, phenolic compounds, flavonoids, triterpenoids) 들에 대한 IL-6/STAT3 억제 효과를 아래와 같이 확인하였으며, 그 결과 apigenin (25), luteolin (26), isorhamnetin (28), hispidulin (29), nepetin (31), cirsimaritin (32), methyl rosmarinic acid (40)은 세포 독성 없이 생리활성을 나타냈음. Ursolic acid (23)와 corosolic acid (24)은 뛰어난 활성을 나타내었으나 고농도에서는 세포 독성이 확인되었음.

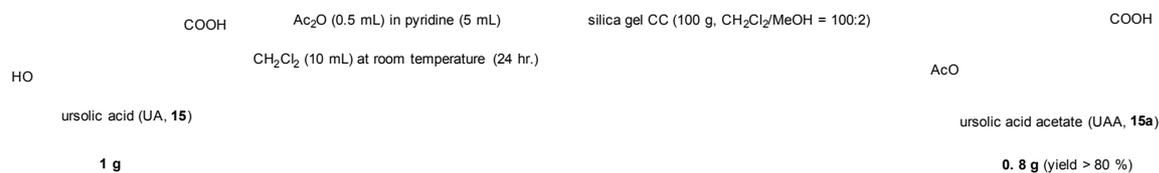
[표 10] 화합물 **23-40**의 IL-6/STAT3 억제 활성 및 세포 독성 실험 결과 (*positive control, **Rheumatology, 2014)

화합물	농도 (μ M)	Inhibition (%)	Viability (%)
oleanolic acid acetate*	1	85.7	85.9
23	3	55.0	93.9
	10	94.0	89.7
	30	103.8	14.9
24	3	55.0	93.9
	10	94.0	89.7
	30	103.8	14.9
25	3	24.6	101.6
	10	60.9	101.4
	30	96.8	105.5
26	3	38.0	94.3
	10	63.6	120.2
	30	99.4	102.3
27	3	27.5	104.1
	10	32.5	97.0
	30	25.1	103.7
28	3	20.3	106.6
	10	36.3	108.0
	30	90.0	112.7
29	3	19.7	99.3
	10	26.8	96.5
	30	65.5	97.0
30	3	44.9	98.7
	10	31.8	98.4
	30	31.2	97.2
31	3	43.2	98.9
	10	62.7	95.9
	30	83.4	97.0
32	3	62.3	105.5
	10	78.1	98.4
	30	91.9	36.9
33	3	5.9	84.3
	10	1.2	81.1
	30	10.4	84.2
34	3	18.0	90.1
	10	18.6	90.4
	30	32.6	83.4
35	3	23.1	81.7
	10	37.7	84.6
	30	30.2	79.3
38	3	34.3	89.8
	10	26.0	89.9

	30	32.4	92.5
39	3	16.1	89.7
	10	9.9	88.1
	30	19.9	91.5
40	3	52.7	96.3
	10	67.4	91.2
	30	91.9	88.2

[표 11] 화합물 23와 23a의 IL-6/STAT3 억제 활성 비교

화합물	농도 (μ M)	Inhibition (%)	Viability (%)
23	0.5	13.6	101.0
	1	25.4	97.4
	5	74.2	94.2
23a	0.5	31.0	98.2
	1	46.8	99.3
	5	101.5	86.4



[그림 9] Ursolic acid acetate 반합성 과정

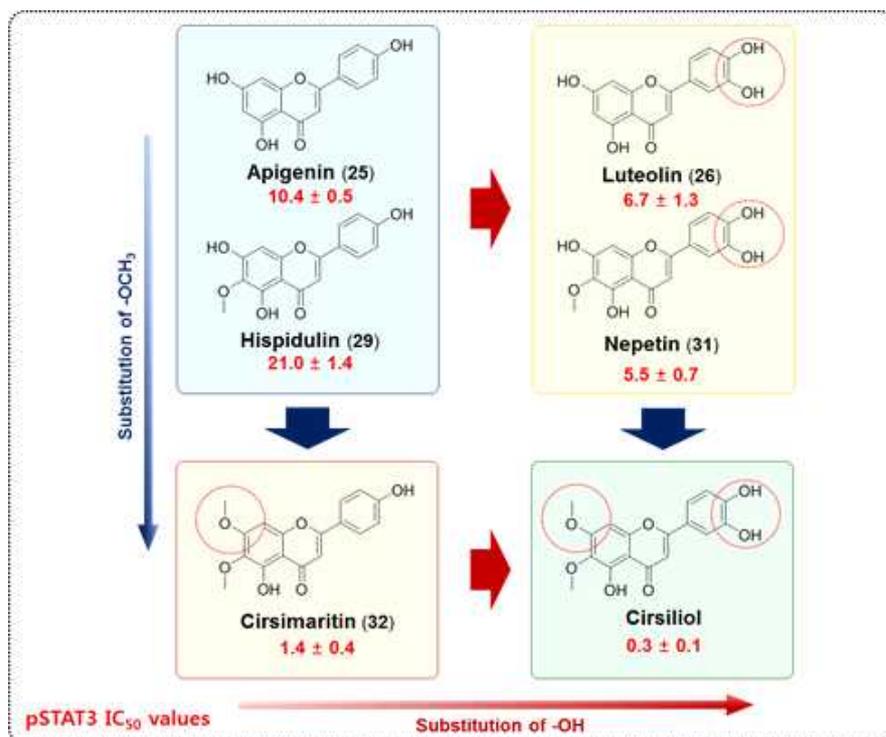
[표 12] 화합물 22-43의 IL-6/STAT3 억제 활성

Compounds	IC ₅₀ [*] (μ M)	Compounds	IC ₅₀ [*] (μ M)
22	> 100	33	> 100
23	3.1 ± 0.23	34	> 100
23a	1.5 ± 0.35	35	> 100
24	0.5 ± 0.14	36	> 100
25	10.4 ± 0.48	37	> 100
26	6.7 ± 1.30	38	> 100
27	> 100	39	> 100
28	14.7 ± 1.16	40	5.8 ± 0.42
29	21.0 ± 1.36	41	21.9 ± 3.68
30	> 100	42	28.6 ± 0.20
31	5.5 ± 0.69	43	6.3 ± 1.95
32	1.4 ± 0.40	Genistein ^b	15.0 ± 0.53

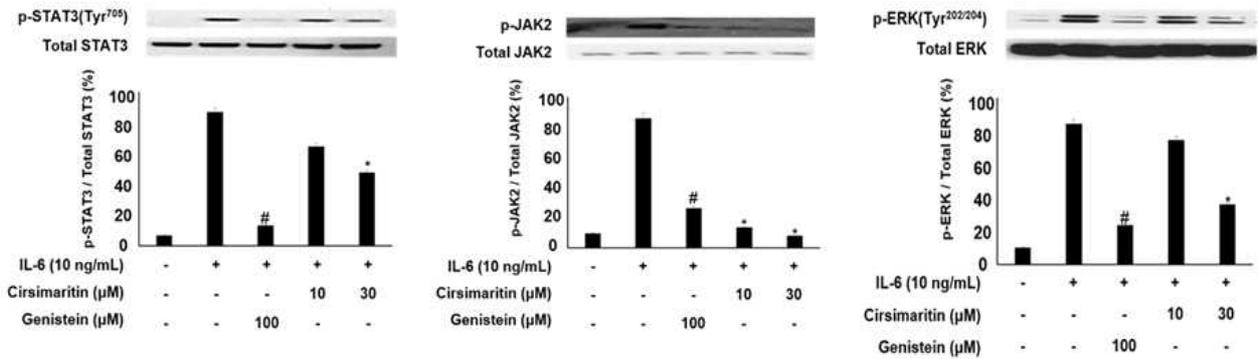
Data are expressed as the IC₅₀ values (means ± S.E.) of three independent experiments ($n = 3$), each performed using triplicate

wells. ^aNo cytotoxicity was observed at the IC₅₀ concentration. ^bGenistein was used as the positive control.

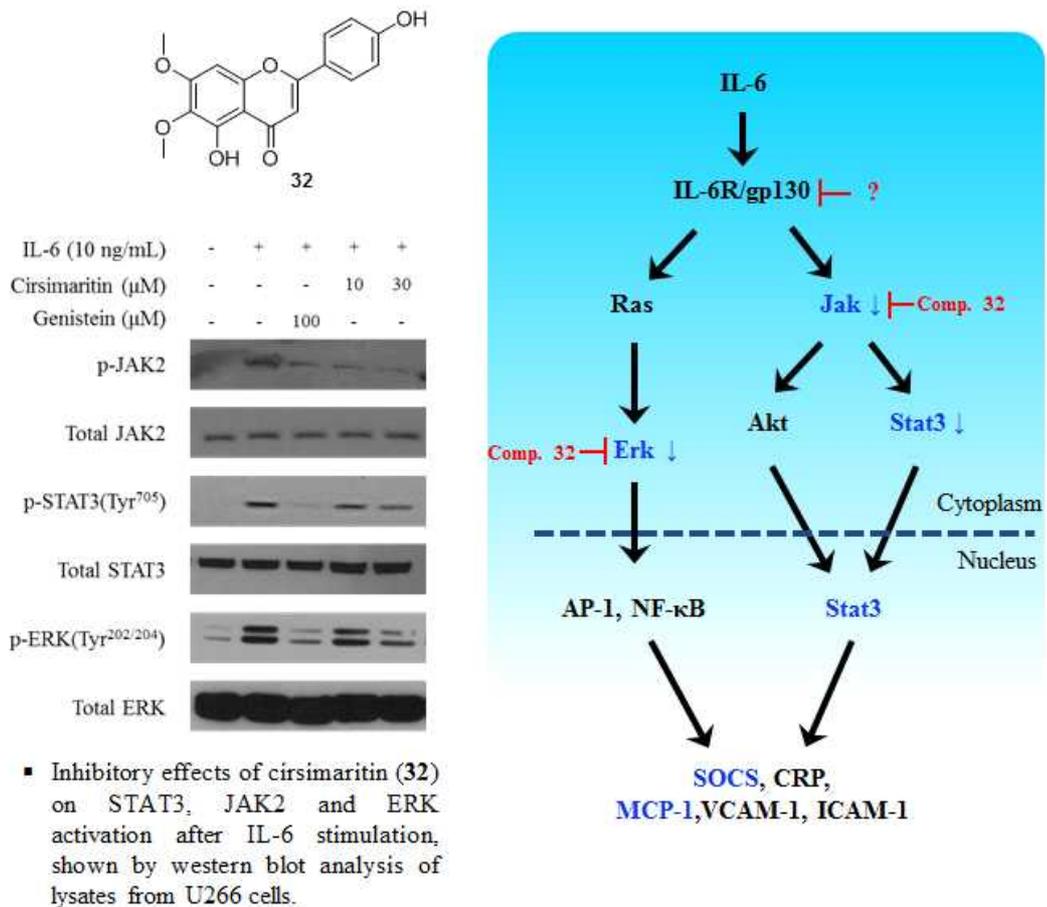
- 곰보배추 추출물로부터 분리한 화합물들의 IL-6/STAT3 억제 효과를 아래와 같이 IC₅₀ 값으로 나타내었음. 그 결과, flavonoids 화합물에서는 flavone 계통 화합물인 apigenin (25), luteolin (26), isorhamnetin (28), hispidulin (29), nepetin (31), cirsimaritin (32)에서 높은 활성을 나타내었으나 배당체 flavonoids 인 luteolin 7-glucoside (27) 와 homoplantagin (30), 그리고 flavanone 계통 화합물인 6-methoxy-naringenin (33), eridictyrol (34), filifolin (35)에서는 IL6/STAT3 저해 활성이 나타나지 않았음.
- 활성을 보여주는 플라보노이드계 화합물 중에서는 cirsimaritin (8)에서 가장 좋은 활성을 보여주는 것으로 보아, 플라본 계통의 플라보노이드의 구조상에서 A ring의 methoxy 치환기와 B ring에 3', 4' hydroxy 치환기의 유무에 따라 IL-6/STAT3 저해활성에 대한 상관관계를 나타냈음.
- 이와 같이 플라보노이드계 화합물에 대한 구조 활성 상관관계를 분석해본 결과, cirsimaritin (8)의 B ring에 hydroxy 가 두 개 존재할 경우 보다 우수한 IL-6/STAT3 저해활성을 나타낼 것으로 예측할 수 있었음.
- cirsimaritin (8)의 B ring에 2개의 hydroxy가 존재하는 화합물인 cirsiol을 *Salvia plebeia* 로부터 분리정제하기 위하여 HPLC 분석을 해본 결과 함량이 적거나 존재하지 않는 것으로 확인됨.
- 이에 추정되는 화합물인 cirsiol을 구입하여 활성을 검증 해본 결과 cirsimaritin (8)보다 10배 이상으로 IL-6/STAT3 저해활성이 우수한 것을 확인할 수 있었음.
- phenolic 화합물에서는 rosmarinic acid (39)에서는 저해 활성이 나타나지 않았으나, methyl rosmarinate (40)에서는 활성이 나타나는 것으로 보아, phenolic 화합물에서 또한 methoxy 치환기의 유무에 따라 활성의 차이나 나타나는 것으로 추정됨. triterpenoids 계통의 화합물에서는 기 보고된 내용을 바탕으로 ursolic acid (23) 보다 반합성된 ursolic 3-acetate (23a) 화합물이 약 2배 정도 활성이 증가하는 것으로 확인하였음. corosolic acid (24)은 뛰어난 활성을 나타내었으나 고 농도에서는 세포 독성이 확인되었음. glycerol aliphatic 화합물에서는 오메가 6 지방산인 1-linoleoyl glycerol (43)이 오메가 3 지방산 화합물보다 약 3-5배 정도 높은 저해활성을 나타냈음.



- 곱보배추 추출물로부터 분리한 Cirsimaritin (32)의 IL-6 신호전달 저해활성 검증
 - 곱보배추에서 유래한 화합물 중, IL-6/STAT3 저해활성이 우수한 cirsimaritin (32) 화합물이 IL-6 유도된 하위 signaling의 인산화를 저해하는 과정을 western blot 법을 활용하여 검증하였다. 그 결과, cirsimaritin (32)은 STAT3 뿐만 아니라, JAK, ERK의 인산화를 저해하는 것으로 확인되었다. 따라서 cirsimaritin (32) 화합물은 곱보배추 추출물의 STAT3 저해 활성에 기여하는 후보물질이 것으로 추정됨.



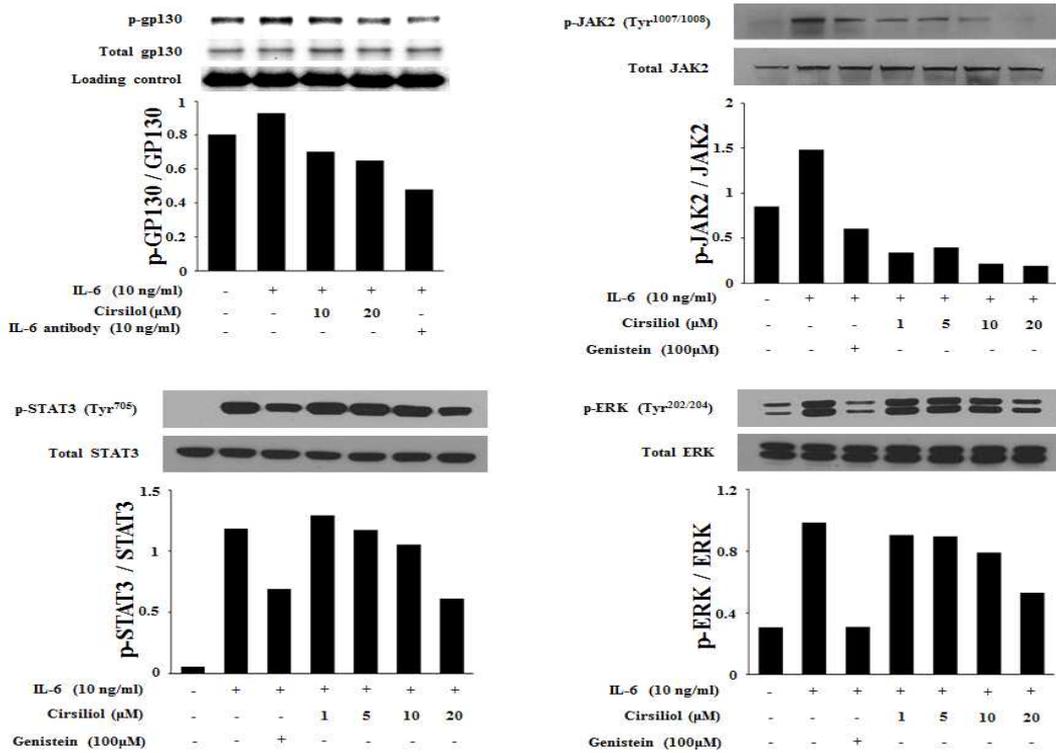
[그림 10] 곱보배추 추출물에서 유래한 cirsimaritin (32)의 IL-6 신호전달 저해 기전 연구



[그림 11] cirsimaritin (32)의 IL-6 신호전달 저해 기전 연구

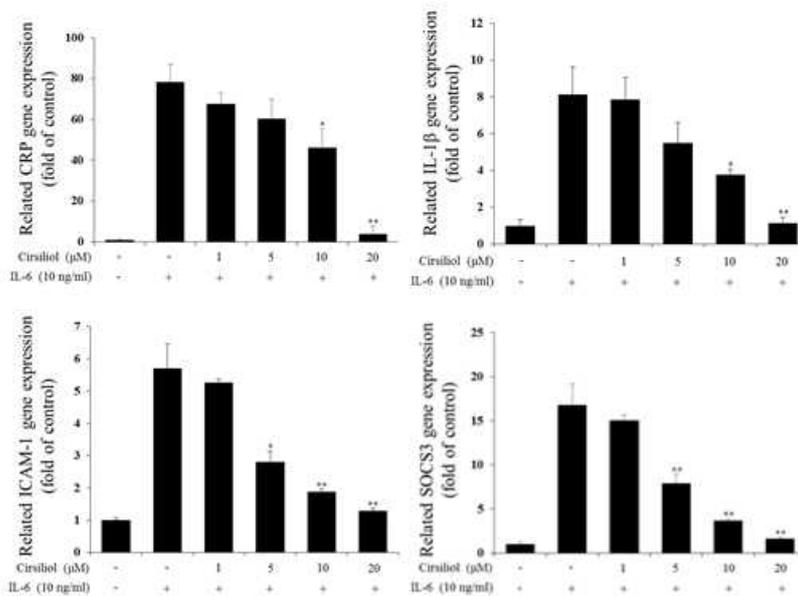
• cirsiol의 IL-6 신호전달 저해활성 검증

- U266 세포를 이용하여 IL-6 (10 ng/ml)에 의한 JAK2, STAT3 및 ERK 단백질 발현량을 웨스턴 블랏법으로 분석한 결과 cirsiol은 농도 의존적으로 저해하였으며, 양성대조군으로 사용한 genistein과 유사하거나 더 우수한 저해 활성을 확인하였음.



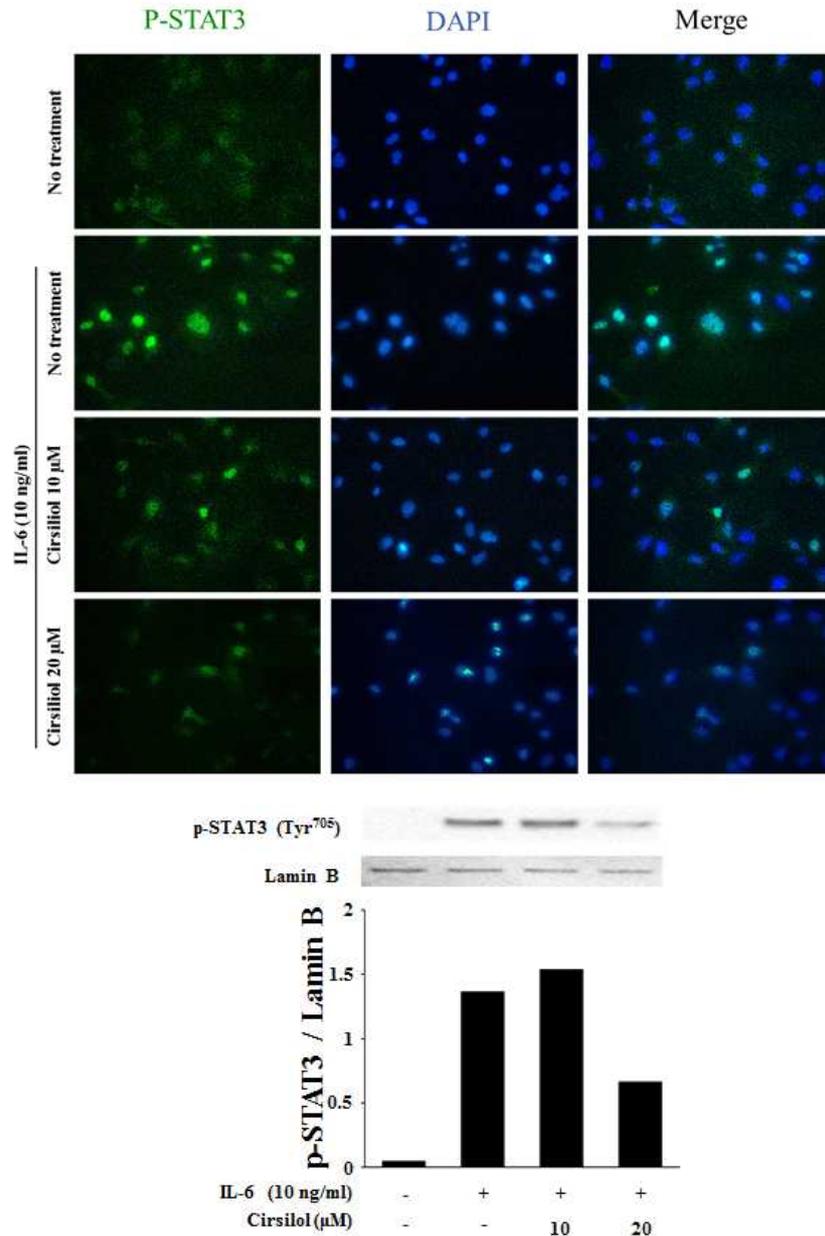
[그림 12] cirsiol이 IL-6에 유도된 JAK2, STAT3 및 ERK의 미치는 영향

- Hep3B 세포주를 이용하여 cirsiol이 CRP, IL-1 β , ICAM-1 및 SOCS3의 유전자 발현 수준을 실시간 PCR로 측정하고 18s rRNA로 표준화 했을 때 농도의존적 저해 활성을 확인하였고 모든 군에서 유의적인 효과를 입증함.



[그림 13] IL-6에 의해 유도된 염증 유발 인자의 유전자 발현에 대한 cirsiol의 억제 활성

- Cirsiliol의 IL-6유도 pSTAT3 translocation 및 Jak2/STAT3 억제 활성을 확인하기 위해 Hep3B 세포와 U266 세포를 이용하여 immunofluorescence 염색과 웨스턴 블롯을 수행한 결과 Cirsiliol 처리 시 pSTAT3의 핵내로 이동이 억제되었고 발현량이 현저하게 감소(20 μ M)하는 것을 확인하였음

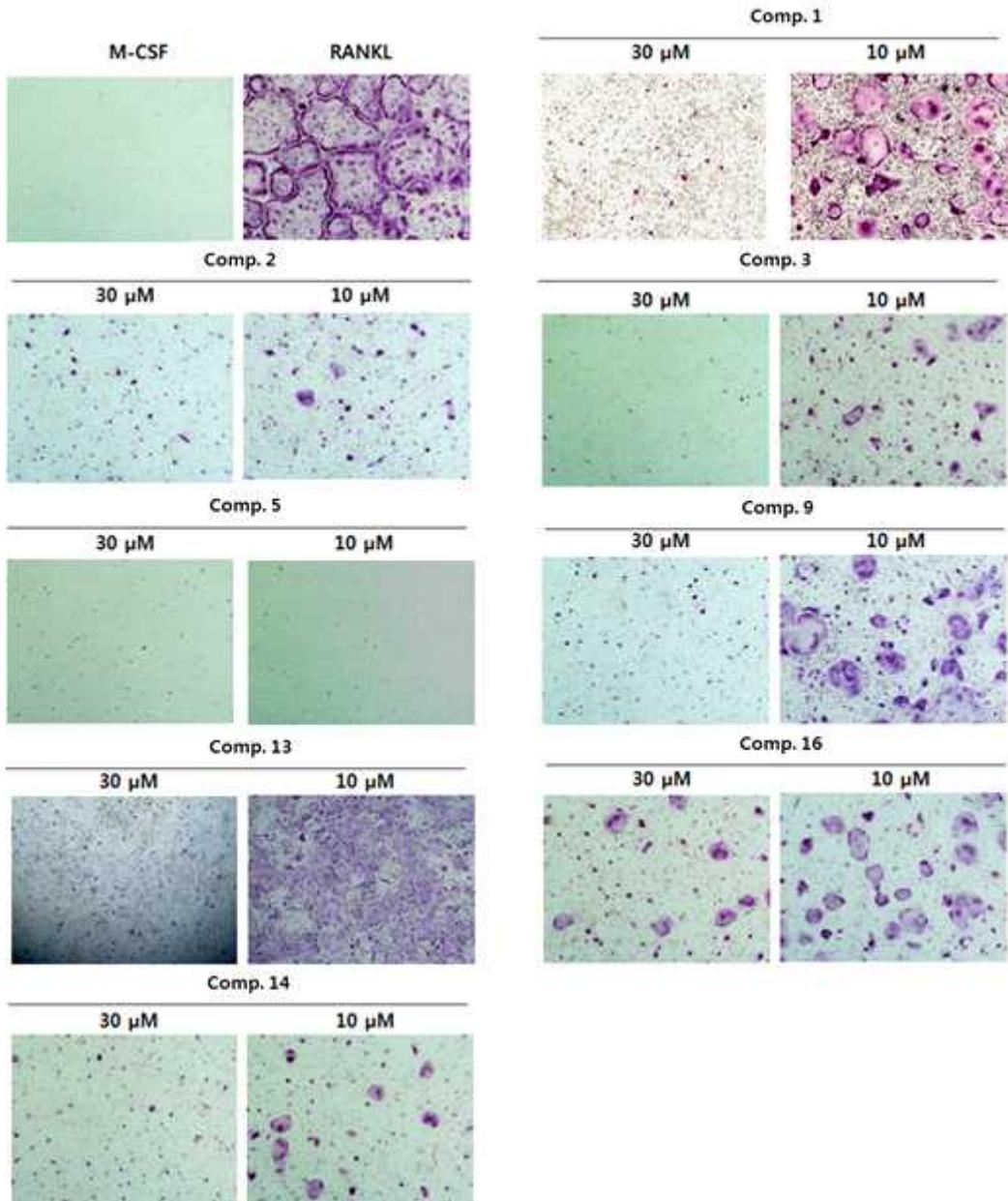


[그림 14] cirsiliol이 IL-6에 유도된 pSTAT3 nuclear translocation에 미치는 영향

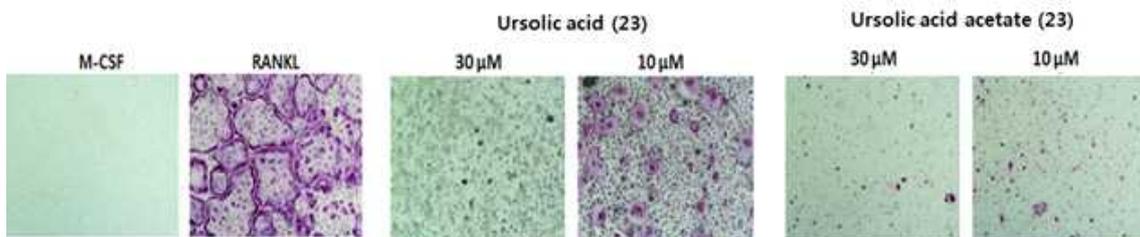
3) 곰보배추 추출물로부터 분리정제 된 화합물의 파골세포 분화 억제 효과

- 곰보배추 추출물로부터 분리한 주요 생리활성 화합물 중, sesquiterpenoid와 triterpenoid 화합물의 TRAP assay를 통한 파골세포 분화 억제 효과를 확인하기 위해 5주령 ICR 마우스의 femur에서 골수세포를 얻어 실험하였음. 분리한 골수세포는 10% FBS, 1% penicilin/streptomysin을 첨가한 α -MEM media에 하루 배양한 후 부착되지 않은 세포를 M-CSF (30 ng/ml)를 처리하여 3일 배양 하였으며, 3일 후 분화된 bone marrow macrophage cells을 48 well에 seeding 한 후, RANKL (100 ng/ml)와 화합물을 처리하였음. 이후 4일 째 TRAP solution으로 세포 염색을 한 결과, 모

두 높은 수준의 생리활성을 나타냈으며, 특히 sesquiterpenoid 중 함량의 비중이 가장 높은 eudebeiolide B (2)와 주요 terpenoid 화합물 ursolic acid (23)는 탁월한 분화 억제 효과를 보여주었음. 이를 통해 골다공증 치료의 핵심 기술인 파골세포 분화 억제 효과를 갖는 구성 화합물을 확인하였음.

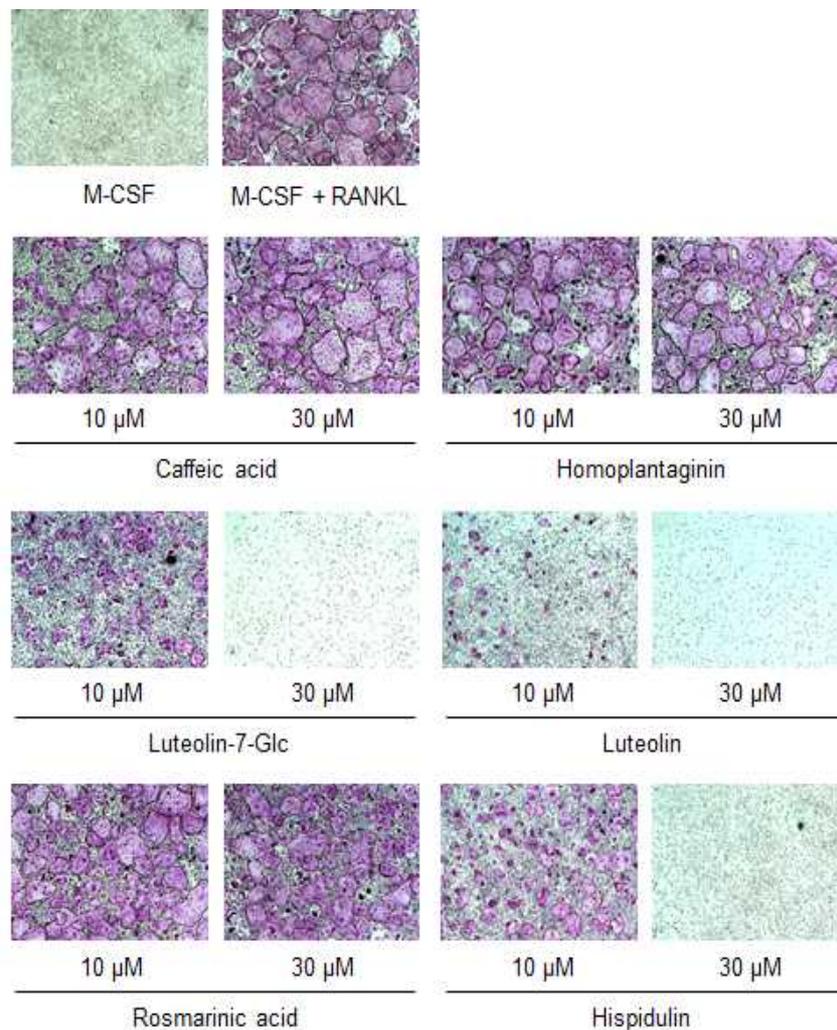


[그림 15] Sesquiterpenoid 화합물의 파골세포 분화 억제 효과



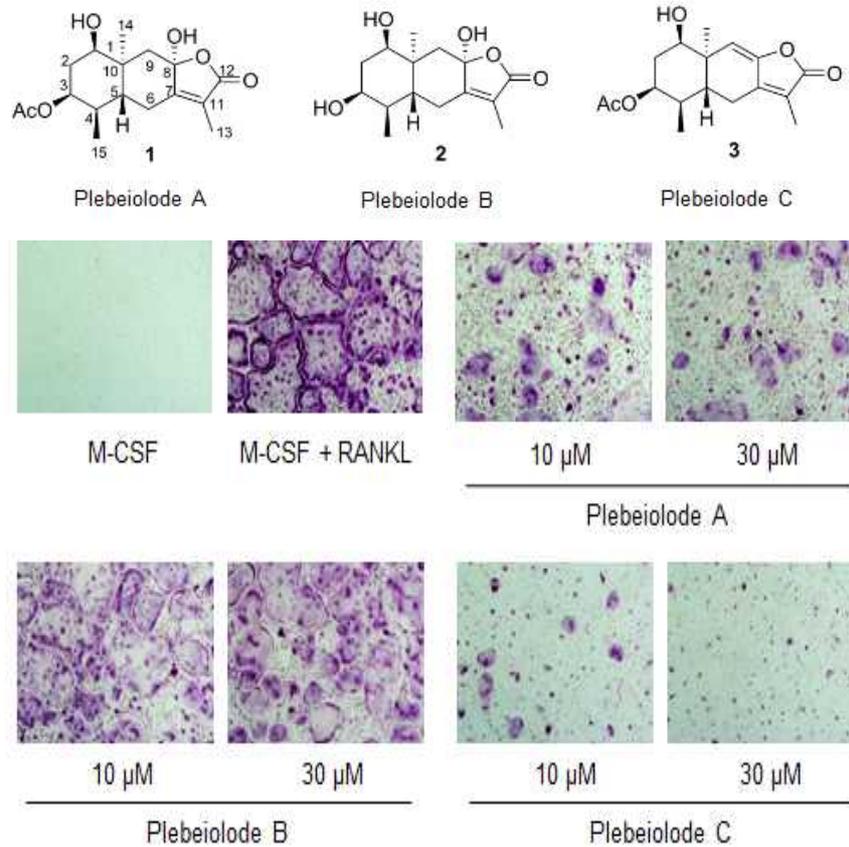
[그림 16] 화합물 23와 23a의 파골세포 분화 억제 효과

- 추가적으로 곰보배추 추출물에서 분리한 화합물의 파골세포 분화 억제 효과
 - 곰보배추 추출물의 Caffeic acid, Homoplantagin, Luteolin-7-glucoside, Luteolin, Rosmarinic acid, Hispidulin은 주요 화합물로 알려져 있고, 이 중 Luteolin-7-glucoside, Luteolin, Hispidulin은 파골세포 분화를 억제한다고 알려져 있음. 이 들 6가지 화합물들이 파골세포 분화에 영향을 미치는지 확인하기 위해 TRAP staining을 실시함. 그 결과, M-CSF+RANKL와 Luteolin-7-glucoside, Luteolin, Hispidulin을 10, 30 μ M 처리한 군이 M-CSF+RANKL를 처리한 군보다 파골세포 분화를 저해하는 것을 확인 함. 그러나 M-CSF+RANKL와 Caffeic acid, Homoplantagin, Rosmarinic acid 을 10, 30 μ M 처리한 군은 파골세포 분화를 저해하지 않는 것을 확인 함.



[그림 17] 곰보배추 추출물에서 분리한 주요화합물의 파골세포 분화억제 효과

- 곰보배추 추출물에서 분리한 3개의 eudesmane-type sesquiterpenes 화합물인 Plebeiolide A-C가 파골세포 분화에 영향을 미치는지 확인하기 위해 TRAP staining을 실시 함. 그 결과, M-CSF+RANKL와 Plebeiolide A, C를 10, 30 μ M 처리한 군에서 파골세포 분화가 저해되는 것을 확인 할 수 있었고, M-CSF+RANKL와 Plebeiolide B를 10, 30 μ M 처리한 군에서는 파골세포 분화가 저해되지 않는 것을 확인 함.



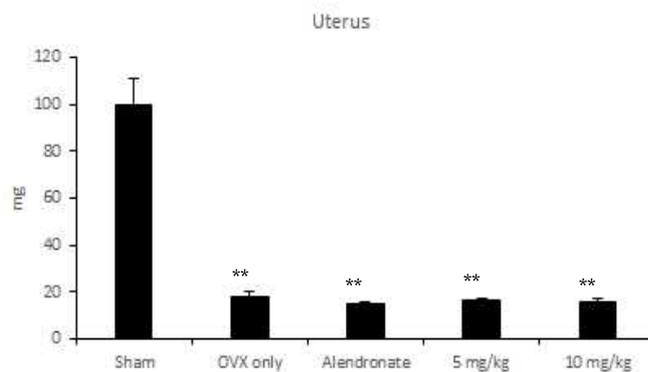
[그림 18] 곰보배추 추출물에서 분리한 화합물의 파골세포 분화억제 효과

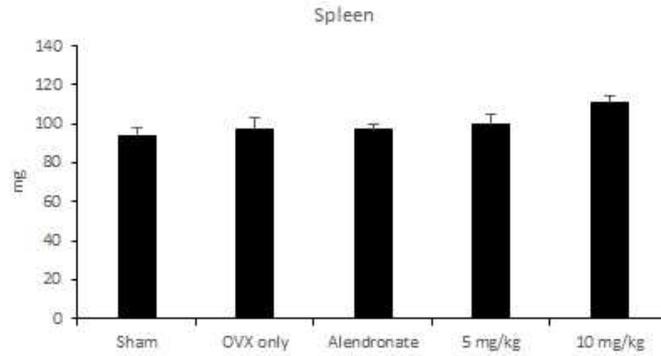
4) 곰보배추 추출물로부터 분리정제 된 화합물 2와 23a에 대한 골다공증 동물모델에서의 효능검증

- Ursolic acid acetate (23a)의 골다공증 동물모델에서의 치료 효과
 - Ursolic acid (23)보다 향상된 IL-6/STAT3 활성을 갖는 화합물 23a (code name: UAA)의 골다공증 치료 효과를 아래와 같이 확인하였음.

[골다공증 마우스 모델]

- ✓ 6주간 칼슘이 제거된 특수제작 사료를 급여 후, 6주간 vehicle (0.5% CMC), 치료제 (Alendronate 2 mg/kg), UAA (5 mg/kg, 10 mg/kg)를 매일 1회 경구 투여하였음.
- ✓ 투여 종료 후, 골밀도 측정 및 조직학적 관찰을 실시하였음.



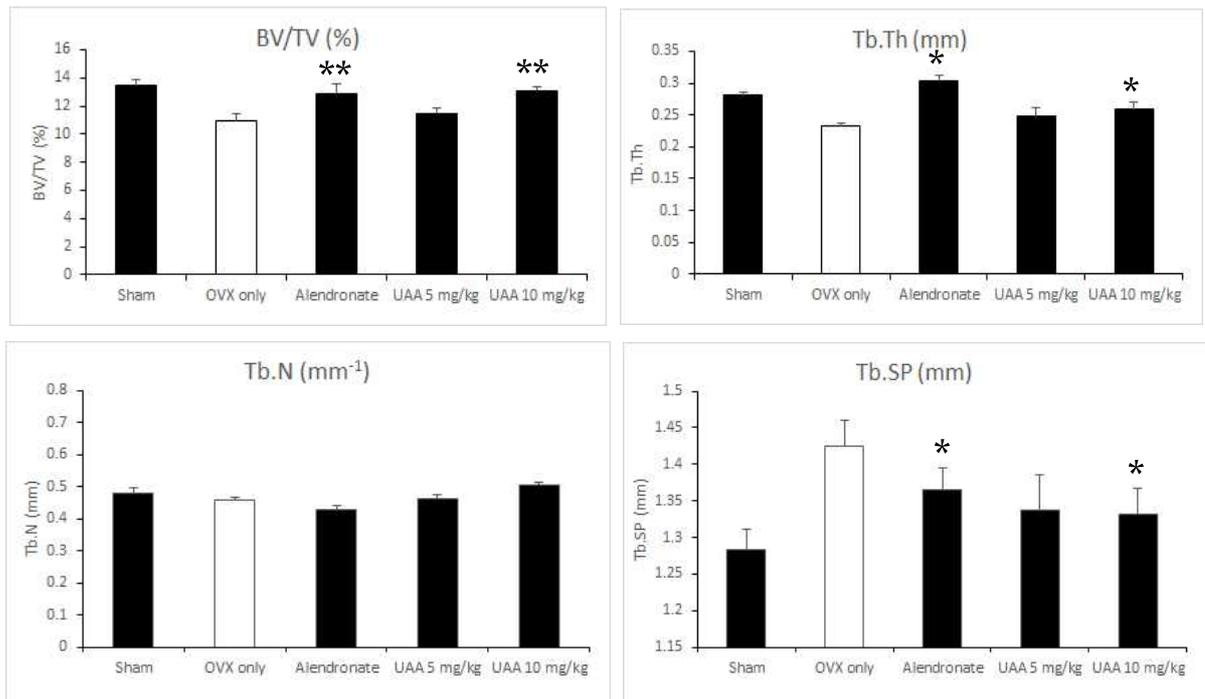


[그림 19] 비장과 자궁의 무게 변화

- ✓ 투여 종료 후, 골다공증 모델제작에 문제가 없음을 확인하기 위하여 자궁 및 비장의 무게를 측정하였음. 자궁의 무게는 난소적출술을 실시한 그룹에서 모두 유의적으로 감소한 것을 확인하였고, 비장의 무게는 그룹간에 차이를 보이지 않았음 (** $p < 0.01$).

[micro CT 측정]

- ✓ 투여실험 종료 후, 마우스의 대퇴골을 분리하여 micro CT 촬영을 통한 골질량 (BV/TV), 골소주 두께 (Tb.Th), 골소주 숫자 (Tb. N), 골소주 간격 (Tb. Sp) 등을 측정하여 UAA의 치료효능을 확인하였음.
- ✓ 그 결과, 치료제인 alendronate와 UAA 10 mg/kg의 농도에서 골질량, 골소주 두께, 골소주 간격에서 유의적인 치료효과를 보였음. (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)



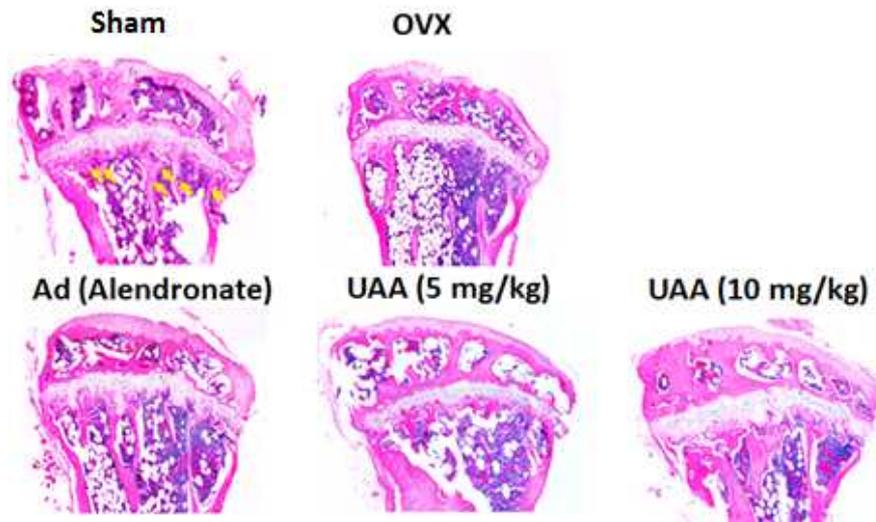
[그림 20] UAA의 micro CT 결과

[조직학적 관찰 결과]

- ✓ 샘플 채취 후, 4% paraformaldehyde에 고정하고 탈 석회화 과정 (decalcification)을 거친 후에

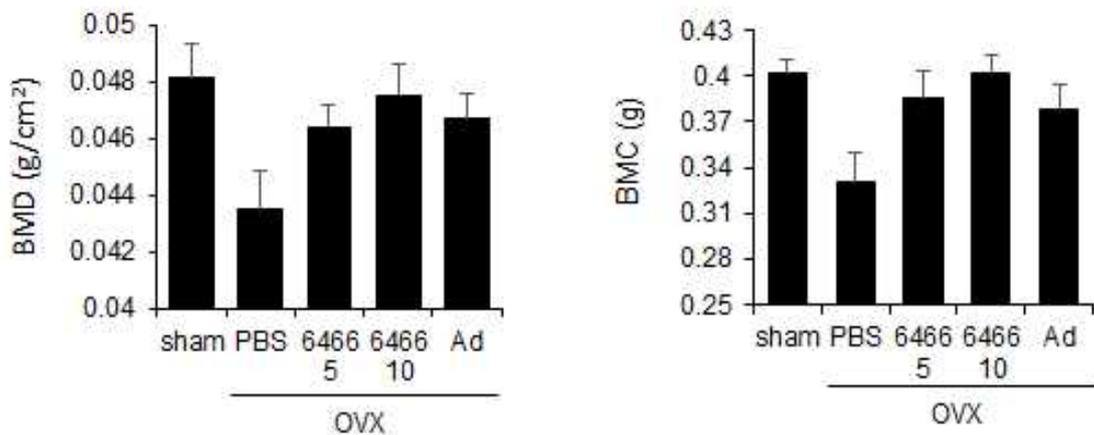
paraffin block을 만들어서 조직학적 관찰을 실시하였으며, 형태학적인 관찰을 위하여 Hematoxylin-Eosin (H-E) 염색을 실시하였음.

- ✓ Sham 그룹에 비해 OVX그룹에서 골소주 간격 및 숫자가 감소하였음이 형태학적으로 관찰되었으며, alendronate 치료그룹과 UAA 10 mg/kg 투여그룹에서 골소주 간격 및 숫자가 OVX 그룹에 비하여 증가하는 경향이 있음이 관찰되었음.



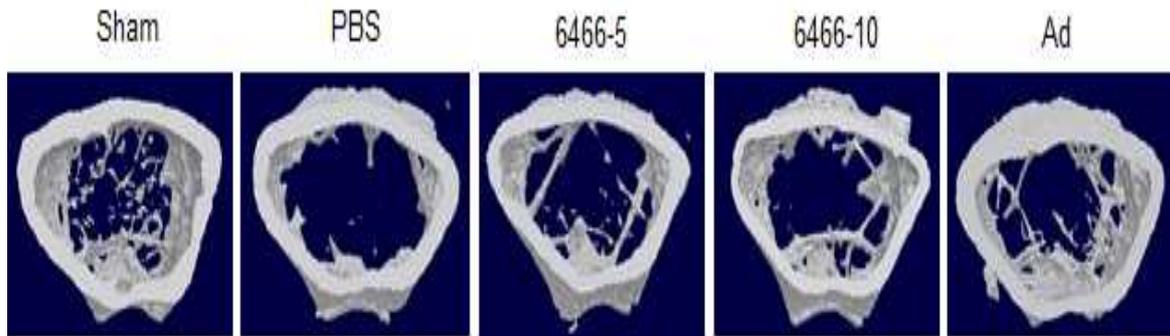
[그림 21] UAA 투여에 의한 형태학적 변화

- Eudebeiolide B (2, 6466)이 골다공증 동물모델에서의 치료 효과
 - eudebeiolide B의 골다공증 치료효과를 확인하기 위해 7주령의 C57/BL6 마우스를 난소적출한 후, 골 손실이 유도된 (난소적출술) 6주 후에 실험에 사용함. 1회/6주 동안 경구 투여를 통하여 eudebeiolide B 5, 10 mg/kg, Ad 1 mg/kg (alendronate, positive control) PBS를 투여하였고 그룹당 5마리 씩 실험에 사용함. 실험 종료 후, Dual-energy X-ray absorptiometry(DEXA)를 이용하여 마우스의 머리부분을 제외한 나머지 부분의 Bone mineral density, Bone mineral contents를 측정함. 그 결과 PBS를 투여한 군에서 정상 그룹(sham group)에 비하여 골밀도와 골미네랄 감소가 보였고, 이는 eudebeiolide B 10 mg/kg를 투여한 군에서 정상수준으로 회복된 것을 확인 할 수 있었음. 또한 positive control로 사용한 Ad 1 mg/kg보다 eudebeiolide B 10 mg/kg가 더 보호효과가 우수함을 확인 함.

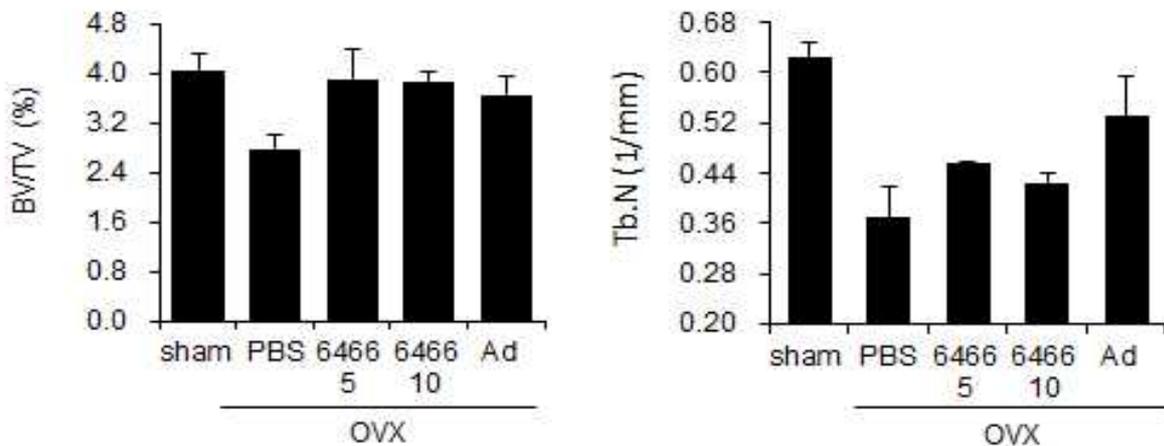


[그림 22] 골다공증 모델에서 eudebeiolide B에 의한 치료효과-1

- 난소적출로 유도되는 골손실에 대한 eudebeiolide B의 영향을 확인하기 위해 대퇴골을 4% paraformaldehyde로 고정 한 후 SkyScan 1076 microCT로 촬영함. CTan, CTVol program을 이용하여 대퇴부 내부의 3차원적 영상을 얻었으며, 이 결과를 바탕으로 bone volume/ tissue volume (BV/TV), trabecular number (1/mm)를 분석 함. 그 결과 sham 그룹에 비해 PBS 그룹에서 골손실이 심화 된 것을 확인 하였고, 이는 eudebeiolide B 5 mg/kg, 10 mg/kg을 투여한 그룹에서 골 손실이 회복 된 것을 확인 할 수 있었음.

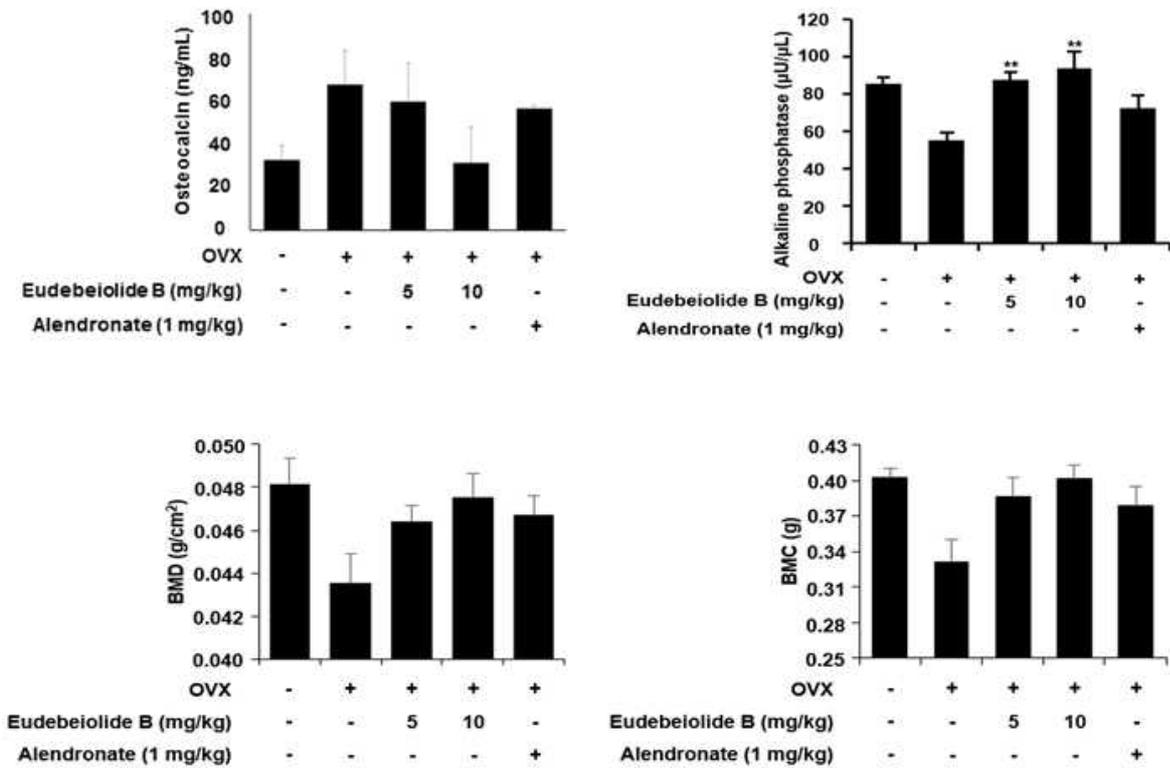


[그림 23] 골다공증 모델에서 eudebeiolide B에 의한 치료효과-2



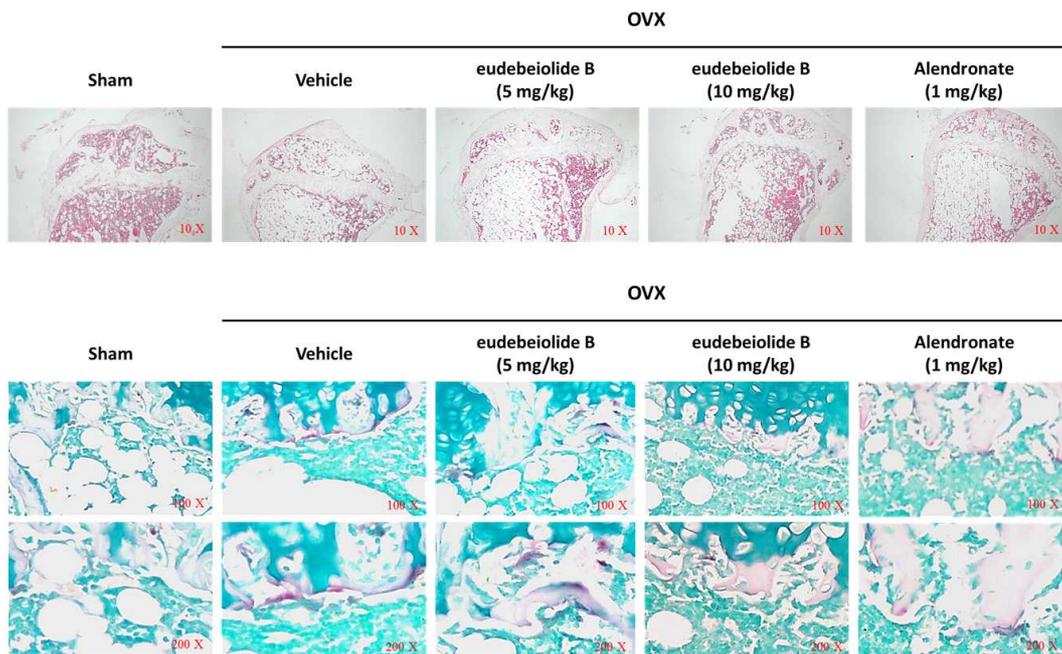
[그림 24] 골다공증 모델에서 eudebeiolide B에 의한 치료효과-3

- 알카라인 포스파타아제(ALP) 및 오스테오칼신은 골 연구에서 널리 사용되는 골 전환에 관한 생화학적 마커로 사용되는데 eudebeiolide B 처리를 통해 비교군인 alendronate보다 오스테오칼신 억제 효능이 우수하였고 ALP 저해 효과를 확인하였으며, 골의 미네랄 밀도(BMD)와 함량(BMC)의 손실을 방지한 결과를 확인함.



[그림 25] Histomorphometry and serum levels of bone turnover markers in OVX mice treated with eudebeiolide B

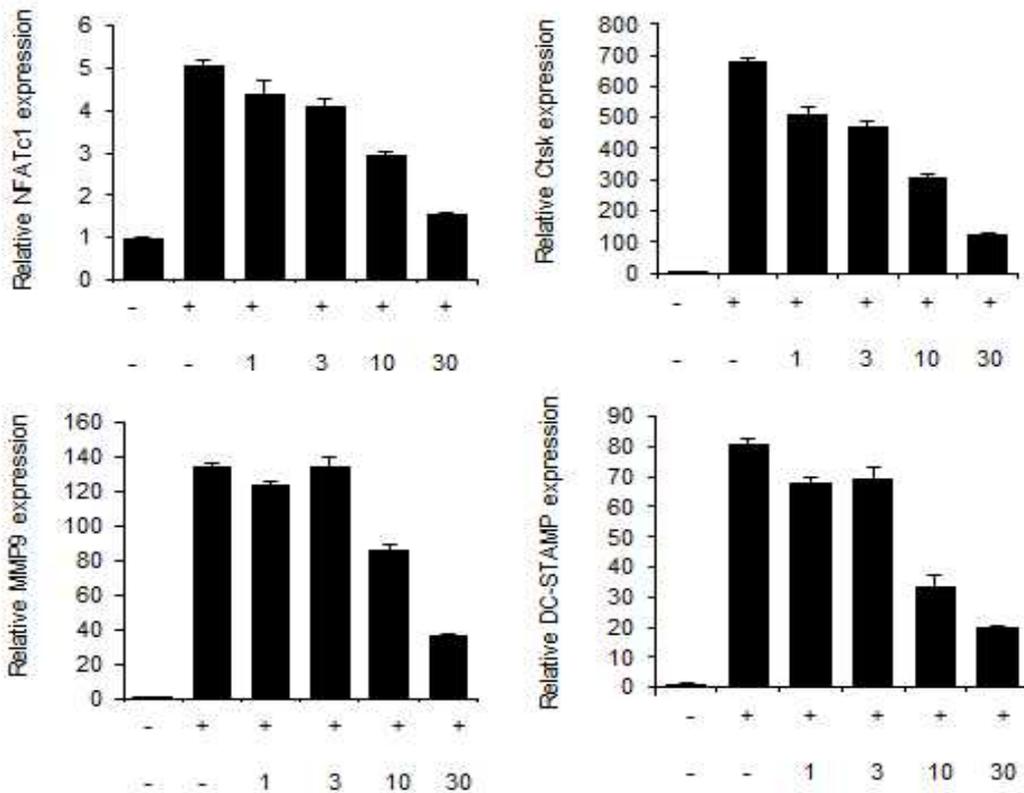
- 6주령 OVX 난소적출 골다공증 마우스 모델에서 eudebeiolide B (2)의 tibia에서 골소주 및 골망상 조직의 변화를 확인하였으며, osteoclast 마커인 TRAP 염색을 통한 eudebeiolide B (2) 처리군에서 osteoclast 감소 효과를 확인하였음



[그림 26] Analysis of trabecular bone loss and bone mesh work by H&E and TRAP staining for osteoclast in the OVX mice treated with eudebeiolide B

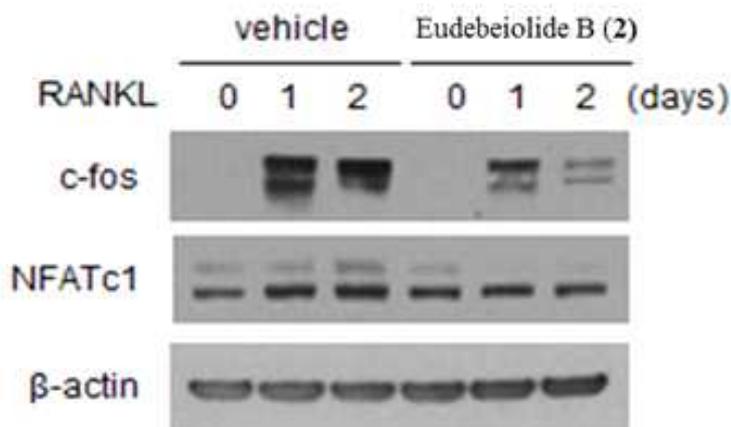
5) 곰보배추 추출물로부터 분리정제 된 eudebeiolide B (2)의 효능 및 기전 연구

- 곰보배추로부터 분리된 eudebeiolide B (2)에 대한 파골세포 분화에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 확인한 결과, 파골 세포 분화에 중요 유전자인 NFATc1, Ctsk, MMP9, DC-STAMP의 발현이 eudebeiolide B (2)에 의해 농도 의존적으로 저해 된 것을 확인 함.



[그림 27] 곰보배추 화합물 eudebeiolide B (2)에 의한 파골세포 분화 유전자 발현 저해 효과

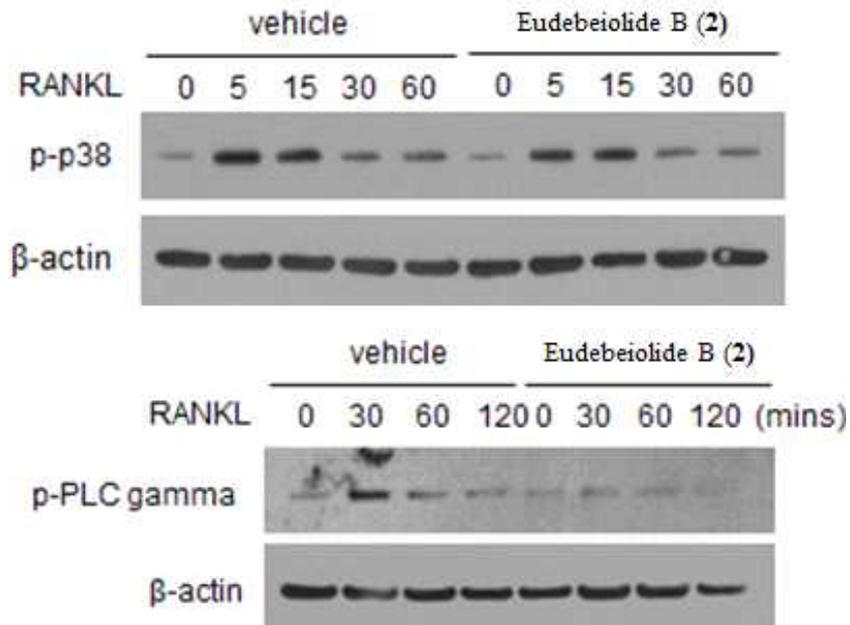
- RANKL를 처리한 후 1, 2 day에 c-Fos, NFATc1의 단백질 발현이 증가됨. 그러나 eudebeiolide B (2) (30 μM)을 처리하였을 때 c-Fos, NFATc1의 단백질 발현이 억제 되는 것을 확인 함



[그림 28] eudebeiolide B (2)에 의한 RANKL에 의해 유도되는 c-fos, NFATc1의 단백질 발현 저해

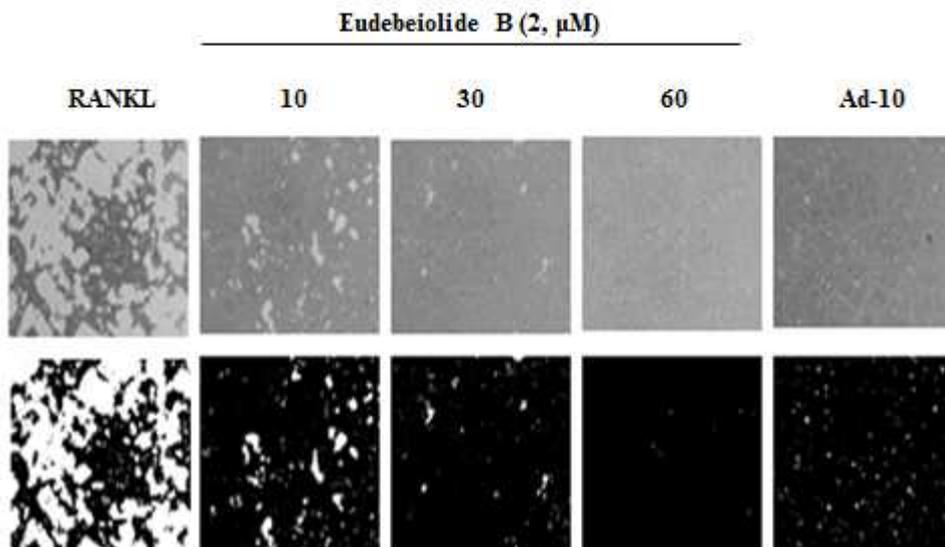
- eudebeiolide B (2)이 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 영향
 - 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위해 RANKL에 의해 전달되는 신호전달체계에 eudebeiolide B (2)이 미치는 영향을 western blotting으로 확인함. RANKL를 시간대별로 처리하였

을 때 p-P38, p-PLC gamma의 발현이 증가하는 것을 확인 함. 반면, eudebeiolide B (2) (30 μ M)을 처리하였을 때 p-P38의 발현은 저해되지 않으나 calcium signaling에 관여하는 p-PLC gamma의 발현은 저해됨.



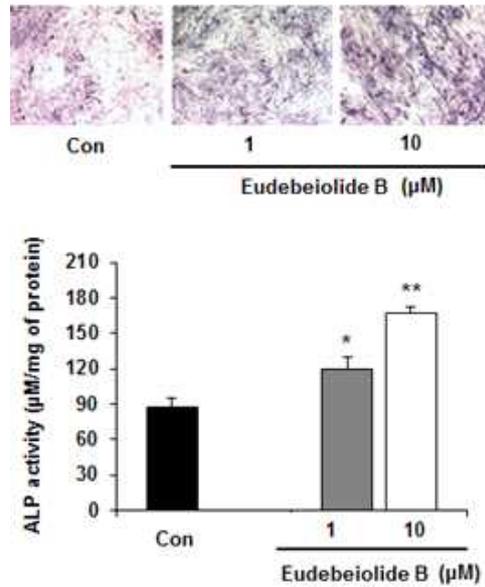
[그림 29] eudebeiolide B (2)이 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 영향

- Eudebeiolide B (2)의 파골세포에 의한 골흡수에 미치는 영향
 - 성숙한 파골세포의 골흡수 능력에 Eudebeiolide B (2)의 미치는 영향을 확인하기 위해 hydroxyapatite가 coating된 plate에 BMMs seeding 동시에 RANKL 또는 RANKL+Eudebeiolide B (2)을 처리 하고 7일 후에 골흡수 정도를 확인하였음. 결과 RANKL를 처리한 군에서 골흡수가 현저히 유도된 것을 확인 할 수 있었고 반면에, RANKL+Eudebeiolide B (2)을 처리한 군에서 골흡수가 농도 의존적으로 저해된 것을 확인 할 수 있었음



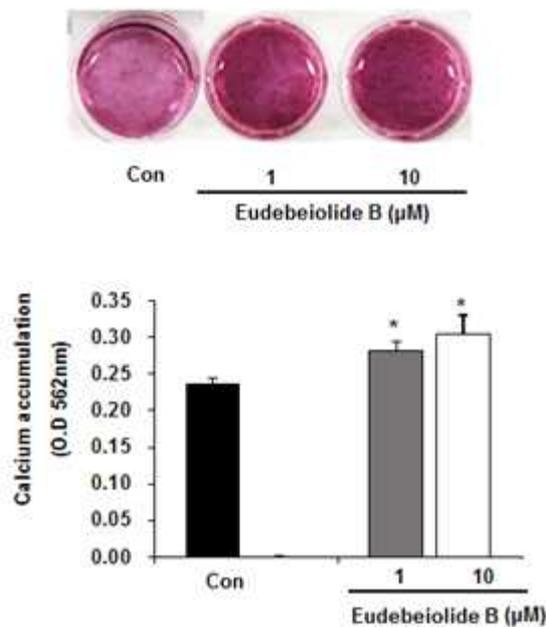
[그림 30] Eudebeiolide B (2)이 파골세포에 의한 골흡수에 미치는 영향

- 고품배추로부터 분리정제된 eudebeiolide B (2)의 조골세포분화 활성
 - 7일 동안 조골 세포를 분화시켜서 알카라인 포스파테이즈 (ALP)염색을 이용하여 현미경학적 분석을 한 결과로 ALP 측정은 초기의 분화를 나타내는 표지임.
 - 무처리군 비교 eudebeiolide B (2)를 1과 10 μM 농도로 처리시 유의적으로 증가하는 경향을 나타냄. 특히, 10 μM 농도에서 무처리군 대비 2배 이상의 증가 효능을 확인함.



[그림 31] eudebeiolide B 화합물의 조골세포 초기분화활성

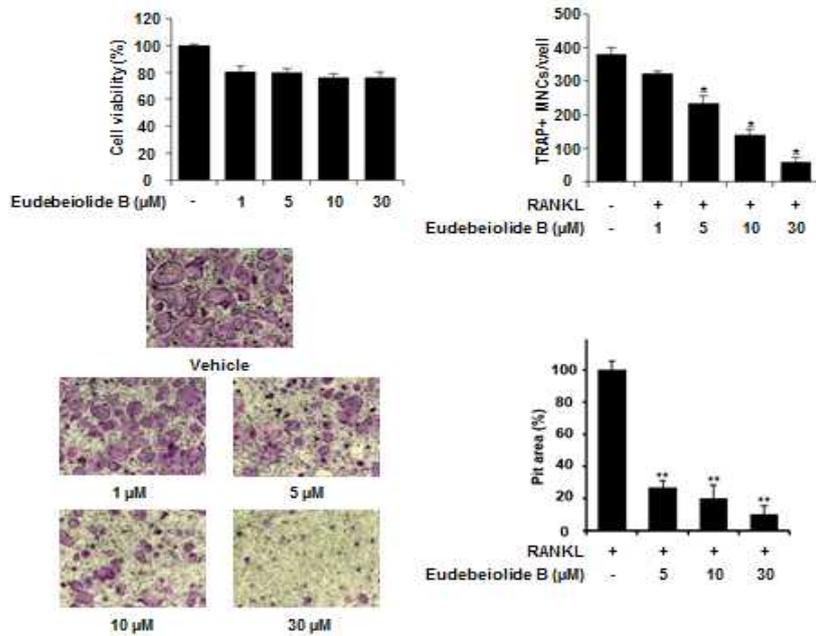
- 21일 동안 분화 시킨 조골 세포에 알리자린 레드로 염색하여 현미경학적 분석을 한 결과로 조골 세포의 후기 분화를 나타내는 표지임.
- 무처리군 비교 eudebeiolide B를 1과 10 μM 농도로 처리시 유의적으로 증가하는 형태를 확인함. 특히, 10 μM 농도에서 무처리군 대비 20%의 증가 효능을 확인함.



[그림 32] eudebeiolide B 화합물의 조골세포 후기분화활성

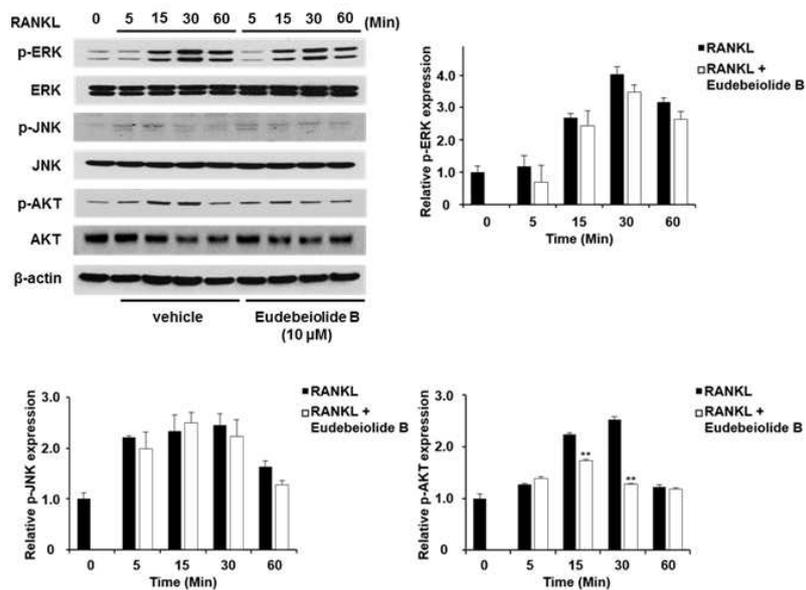
- eudebeiolide B (2)의 기전 연구

- 곰보배추로부터 분리된 eudebeiolide B (2) 화합물이 파골세포에 처리하였을 때 독성은 나타나지 않았고 4일간의 RANKL 자극 후 TRAP 양성 다핵 파골세포의 eudebeiolide B 처리시 농도 의존적으로 억제하였음. 또한 eudebeiolide B이 골 흡수에 미치는 영향을 측정된 결과로 처리하지 않은 군에서는 재흡수된 성숙 파골 세포에 의해 생성된 반면 eudebeiolide B 처리 군에서 농도 의존적으로 골 흡수 억제 활성을 확인하였음.



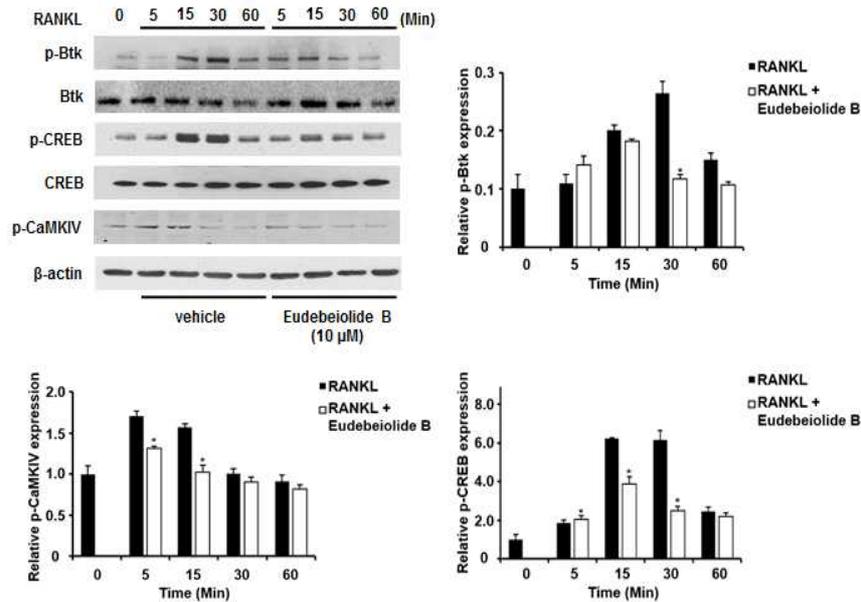
[그림 33] 곰보배추 화합물 eudebeiolide B에 의한 파골세포 분화 유전자 발현 저해 효과

- 세포주에 아무 처리하지 않았을 때는 인산화 된 세포의 시그널 조절 키나제(ERK), P38 그리고 c-Jun N-말단 키나아제(JNK)의 단백질 발현량이 RANKL에 의해 증가하였지만 eudebeiolide B 처리시 아무 처리하지 않은 그룹보다 단백질 양이 현저히 감소한 것을 확인함.



[그림 34] 곰보배추 화합물 eudebeiolide B에 의한 RANKL에 의해 유도되는 c-fos, NFATc1의 단백질 발현 저해

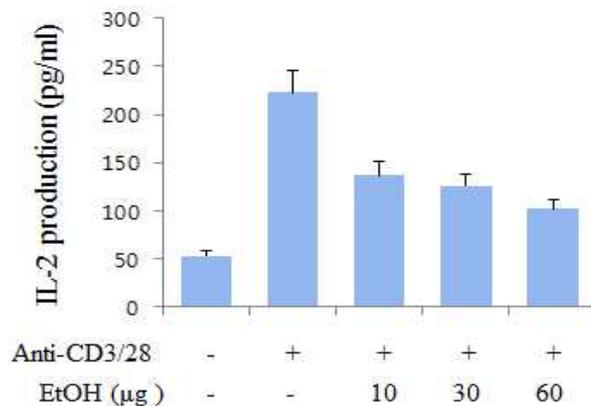
- 세포주에 아무 처리하지 않았을 때는 인산화 된 부르튼(Bruton) 티로신 키나제(Btk), cAMP 반응 요소 결합(CREB) 그리고 칼로돌린 의존성 단백질 키나제 IV(CaMKIV)의 단백질 발현량이 RANKL에 의해 증가하였지만 eudebeiolide B 처리시 아무 처리하지 않은 그룹보다 단백질 양이 현저히 감소한 것을 확인함.



[그림 35] 곰보배추 화합물 eudebeiolide B에 의한 RANKL에 의해 유도되는 c-fos, NFATc1의 단백질 발현 저해

6) 곰보배추 추출물 및 분리정제 된 sesquiterpenoid (1-21)의 항염증 활성 검증

- 곰보배추 추출물이 T 림프구의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Jurkat T 세포에 곰보배추 EtOH 추출물 (10, 30, 60 μg/ml)을 1시간 전 처리한 후 anti-CD3 항체(10 μg/ml)와 anti-CD28 항체(4 μg/ml)를 24시간 동안 처리함. 이 후 culture 배지에 secretion된 IL-2 사이토카인의 양을 ELISA assay에 의해 측정함. 결과, 곰보배추 추출물은 TCR활성에 의한 IL-2 생성을 억제하는 것을 볼 수 있었으며 T 림프구 면역세포의 과도한 활성을 저해하는 것으로 사료됨



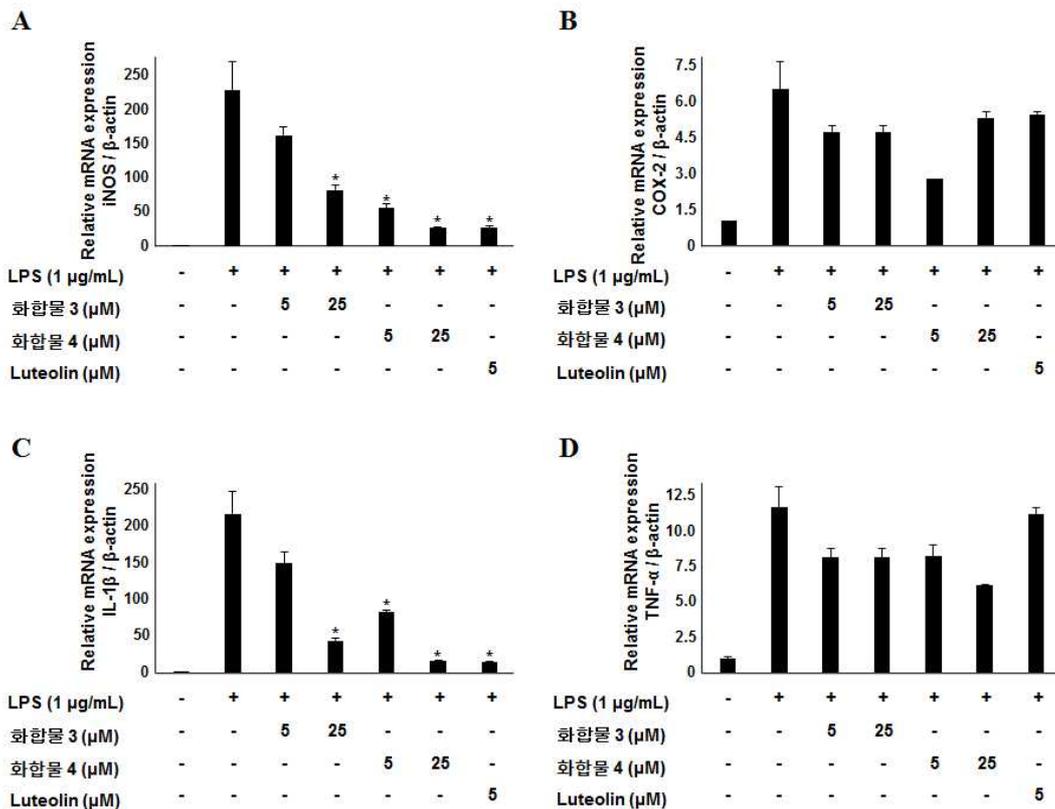
[그림 36] 곰보배추 추출물의 IL-2 생성 억제 효과

- 분리된 21개의 sesquiterpenoid (1-21) 화합물을 대상으로 RAW264.7 세포주를 이용하여 항염증 활성을 검증한 결과, 화합물 3-5번 화합물이 우수한 저해 활성을 보여주었음.

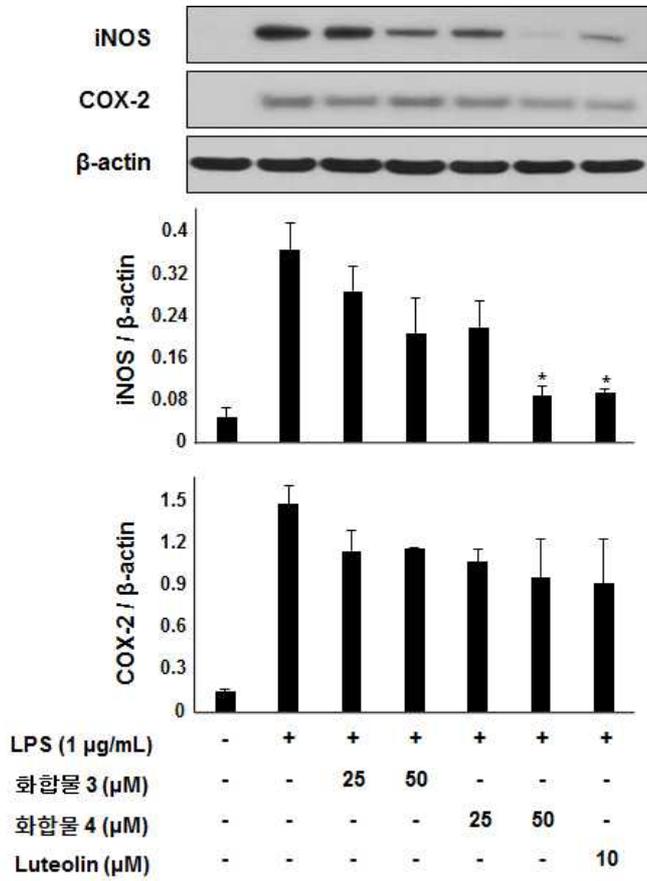
[표 13] sesquiterpenoid (1-21)의 nitric oxide (NO) 억제 활성 실험결과

Compounds	IC ₅₀ (μ M)	Compounds	IC ₅₀ (μ M)
1	70.2 \pm 7.1	12	> 100
2	68.9 \pm 3.6	13	> 100
3	31.2 \pm 3.7	14	30.0 \pm 4.0
4	17.9 \pm 1.0	15	> 100
5	1.4 \pm 0.6	16	57.0 \pm 6.2
6	> 100	17	> 100
7	> 100	18	> 100
8	> 100	19	> 100
9	19.9 \pm 0.6	20	> 100
10	> 100	21	> 100
11		Luteolin ^b	5.6 \pm 0.3

- Real-time PCR, Western blot 실험을 통해 곰보배추로부터 분리한 화합물 (3,4)은 염증매개인자인 iNOS, IL-1 β 들의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 저해하였으나, COX-2, TNF- α 는 통계적으로 유의적인 차이를 보여주지 못하였음.

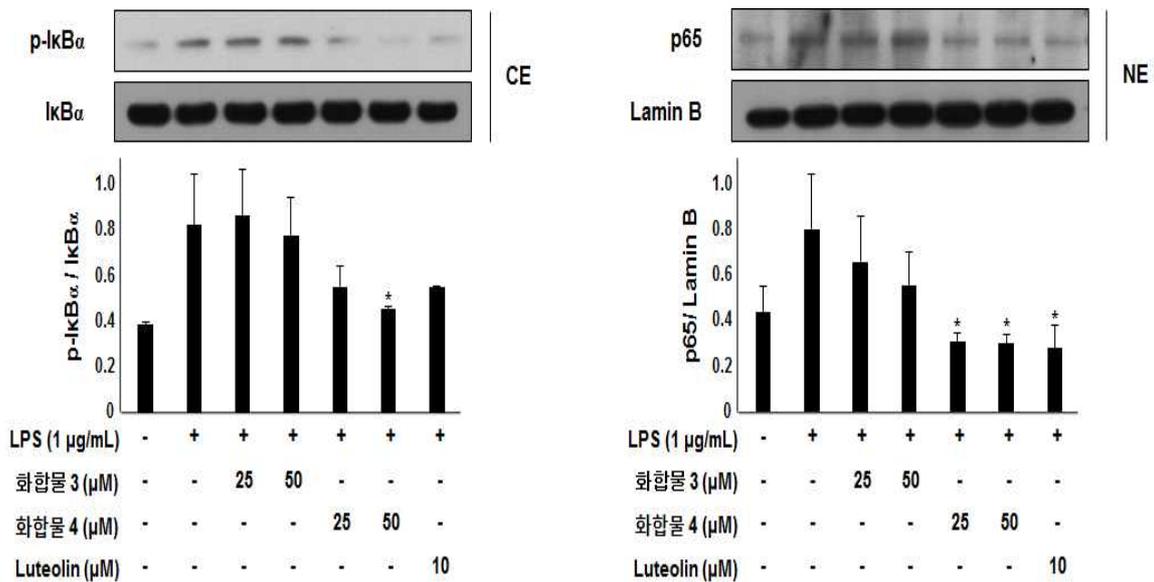


[그림 36] sesquiterpenoid 의 항염증 매개인자들의 저해



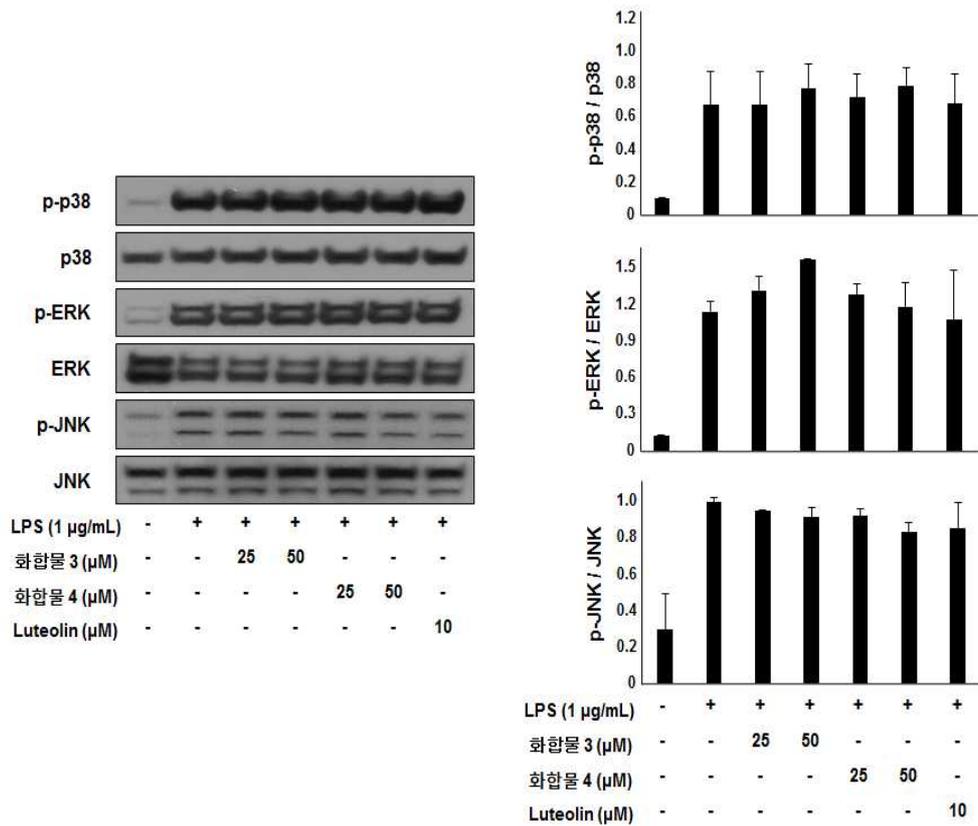
[그림 37] sesquiterpenoid 의 항염증 매개인자들의 저해

- 염증의 신호전달기전에서 주요 전사인자중 하나인 NF- κ B는 화합물 3,4번에 의해 I κ B의 인산화를 저해함으로써 전사활성화가 저해되며, 3번 화합물 보다 이성질체인 4번 화합물이 더 우수한 저해활성을 보여줌.



[그림 38] sesquiterpenoid 의 항염증 신호전달 기전연구

- 염증을 매개하는 다른 신호전달 기전인 MAPK (p38, ERK, JNK)는 화합물 3,4번에 의해 저해되지 못함.



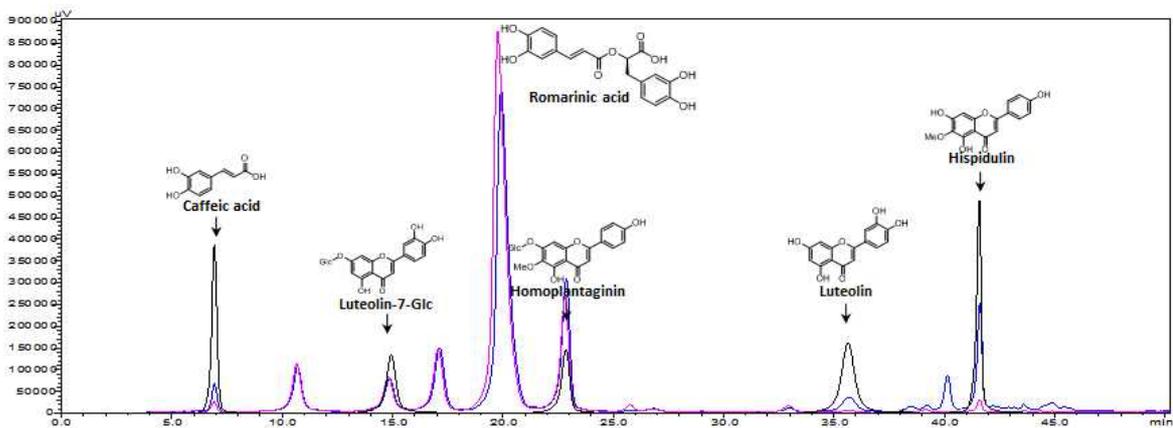
[그림 39] sesquiterpenoid 의 항염증 신호전달 기전연구

- 결론적으로 곰보배추로부터 분리된 생리활성 화합물 중 3,4번 화합물은 MAPK 신호기전이 아닌 NF- κ B 신호기전을 저해함으로써 항염증 활성을 나타내는 것으로 보임

4. 곰보배추 추출물의 채취 시기별 함량 변화 및 기준시험법 개발

1) 곰보배추의 채취 시기별 함량 변화 및 최적 채취 시기 선정

- 천연물은 재배지역과 채취시기에 따라 같은 원료임에도 불구하고 차이가 발생하게 되는 특징을 갖고 있어, 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 생리활성을 갖는 지표화합물을 설정하여 산지별, 채취시기별 비교 동등한 함량 기준을 가질수 있도록 설정해야함.
- 본 연구팀은 고창 질마재 농장에서 2주 간격으로 노지 재배 중인 곰보배추를 채취하고 이를 총 5개의 기간으로 나누어 시료를 제작하였음. 예비 실험에서 선정한 지표 화합물은 caffeic acid, luteolin-7-glucoside, rosmarinic acid, homoplantagin, luteolin, hispidulin 등 6개이나, 시료별 함량 변화의 범위가 크고 [표 15]와 같이 luteolin과 hispidulin을 제외한 화합물의 IL-6/STAT3 억제 활성이 낮은 문제점을 보여 지표 화합물 재선정의 필요성이 부각됨.
- 하지만 채취 시기별 곰보배추 추출물의 IL-6/STAT3 억제 활성은 큰 차이 없이 기준 이상의 효력을 보였고, 4번 시기의 곰보배추가 예비 실험에서 사용되었던 것과 가장 유사한 함량 분포를 나타냈음. 따라서, 4번 시기의 곰보배추를 최적의 채취 기준으로 선정하였음.



[그림 41] 곰보배추 추출물의 phenolic 화합물을 활용한 지표성분 분석

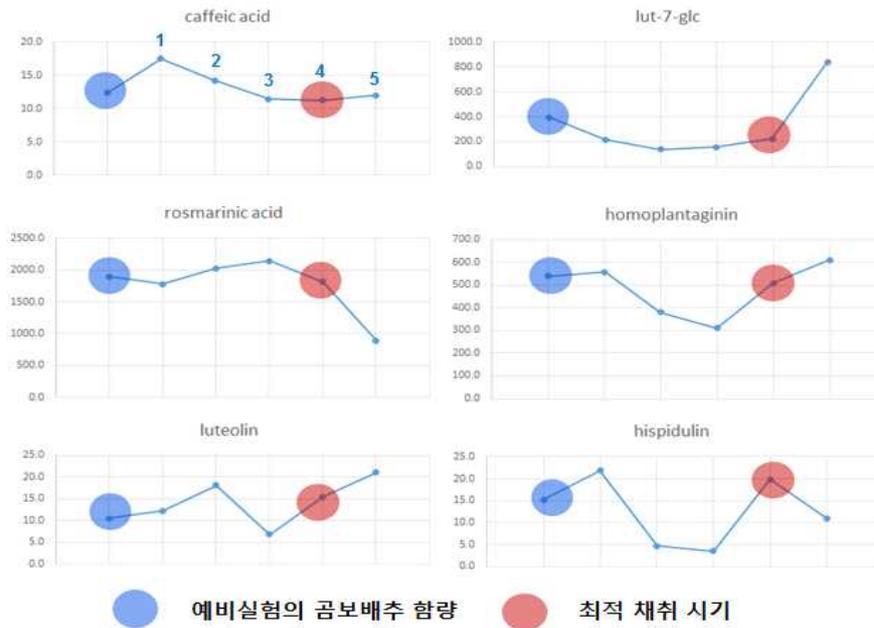
{HPLC: Shimadzu Prominence UFLC; 검출파장: 342nm; 컬럼: phenomenex gemini C₁₈; 이동상: 62% H₂O (0.5 % acetic acid), 38% MeOH → 100% MeOH, step gradient; 분석시간: 45분}

[표 15] 채취시기별 곰보배추 추출물의 IL-6/STAT3 억제 효과

채취 시기별 샘플	농도 (μg/ml)	억제 효능 (%)
luteolin (positive control)	10 μM	71.8
1	10	75.8
	30	97.3
	60	103.5
2	10	79.8
	30	100.6
	60	106.3
3	10	82.7
	30	98.1
	60	102.1
4	10	79.2
	30	99.1
	60	103.6
5	10	83.3
	30	97.8
	60	101.5



채취 시기



[그림 42] 채취시기별 곱보배추 추출물의 phenolic 화합물 함량 변화

2) 곱보배추 원물의 예약재배

- 전라남도 장흥군에 위치한 영농조합법인 (유) 매화와 계약 재배를 진행 중에 있으며, 2차년까지 롯데별 1.2톤씩 총 9개 롯트(TQ001~TQ009)를 전임상 및 임상 시료로 생산하였음. 3차년도에서는 롯데별 1.2톤씩 총 3개 롯트를 전임상 및 임상 시료(TQ010~ TQ012) 생산하였으며, 그 결과 농가 소득 발생하였으며, 의약품 원료의 안정적 공급을 위한 생산 체계를 구축하였음



농장 전경

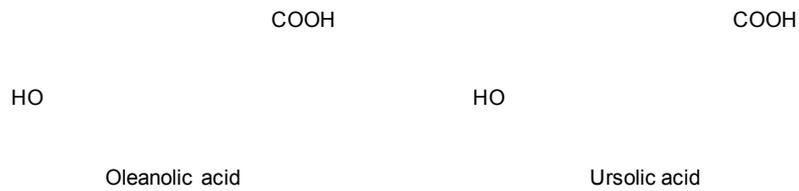


곱보배추 원물

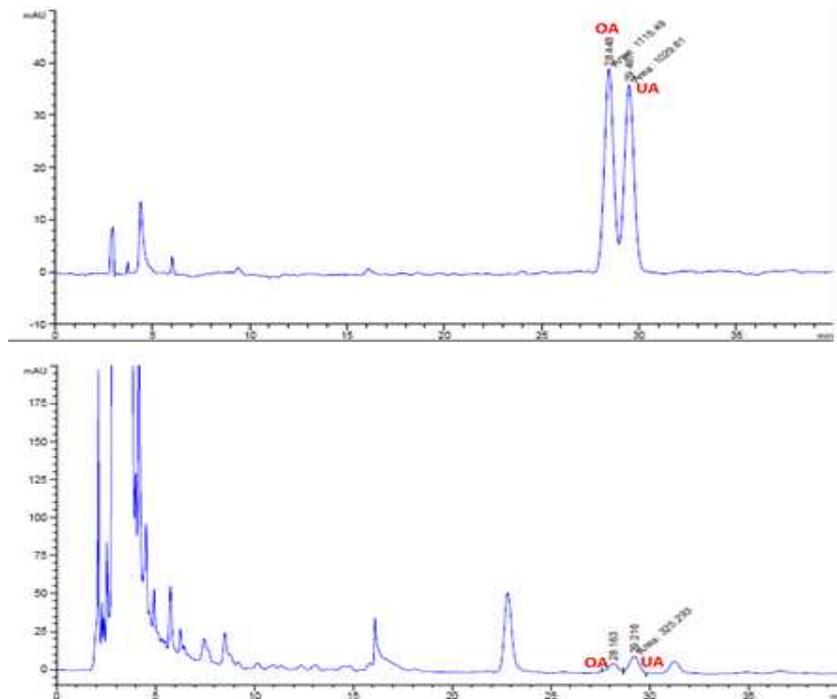
[그림 43] 후보 농산물 소재 재배 - 전남 장흥군 대덕읍 신월리 (매화농장)

3) 곰보배추 추출물의 기준시험법 개발

- 원료의 품질 일원화를 위한 기준시험법을 개발하기 위하여 식약처 고시에 따라, 1) HPLC-DAD, 2) TLC 법을 통한 2가지 시험법이 요구됨.
- 따라서, 본 연구과제에서는 상기에서 분리 확인된 화합물 중 생리활성 평가 결과와 HPLC, TLC 분석이 가능한 지표물질을 선정하여 기준시험법을 마련하였으나, 상기한 바와 같이 phenolic 화합물은 채취 시기별로 함량 변화가 심하고, 생리활성 수준이 낮은 단점을 갖고 있음.
- 따라서, 후속 연구로부터 신규로 선정된 지표물질은 triterpenoid 계열의 oleanolic acid와 ursolic acid [그림 44]임. 상기 화합물은 높은 수준의 생리활성을 갖는 동시에 산지별, 채취시기별 함량 차이가 크지 않은 장점을 갖고 있음. 하지만, oleanolic acid와 ursolic acid는 같은 분자량을 갖고 있는 구조 이성질체로 일반적으로 사용되는 reverse phase C₁₈ 컬럼에서 머무름시간이 일부 겹치는 단점을 갖고 있으며 [그림 18], TLC 분석법에서도 동일한 R_f 값을 보유함으로써 분석이 쉽지 않음.



[그림 44] 기준시험법 개발에 선정된 지표화합물 2종



[그림 45] Oleanolic acid와 ursolic acid의 HPLC 크로마토그램 (상)과 곰보배추 추출물의 HPLC 크로마토그램 (하)

[HPLC: Agilent 1200 series; 검출과장: 210nm; 컬럼: phenomenex gemini C₁₈; 이동상: 15% H₂O (0.2 % phosphoric acid), 85% MeOH; 분석시간: 40분]

- 이 같은 문제를 해결하고 식약처 고시 기준에 맞출 수 있는 시험법을 개발하고자 다양한 컬럼과 이동상을 시험하였고, 그 결과 PAH (polyaromatic hydrocarbon) 컬럼과 ACN, water의 혼합 용매를 이동상을 활용해 분석하여 아래와 같이 HPLC-DAD를 활용한 최적 분석 기법을 개발하였음 [그림 46].

[분석조건]

컬 럼 : Supelco Supercosil LC-PAH (250*4.6mm*5um, Sigma Cat: 58229) 또는 이와 유사한 컬럼

HPLC : Agilent 1200 또는 이와 유사한 HPLC

이 동 상 : ACN (A) : Water (B)

분	A	B
0.0	71.0	29.0
30.0	76.0	24.0
32.0	100.0	0.0
42.0	100.0	0.0
44.0	71.0	29.0
55.0	71.0	29.0

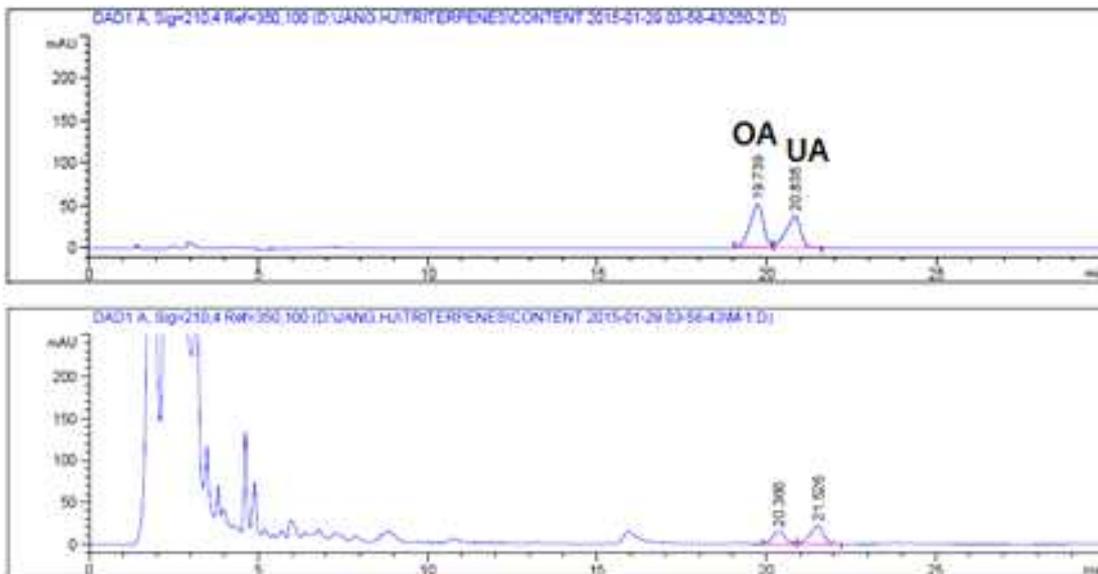
주 입 량 : 10ul

유 속 : 1.0mL/min

검 출 기 : 자외부흡광도계(측정파장: 210.0 nm*)

*Agilent 1200 series HPLC의 DAD는 검출파장 210 nm, Bandwidth (BW) 4, Reference 350 nm, Reference BW 100으로 설정

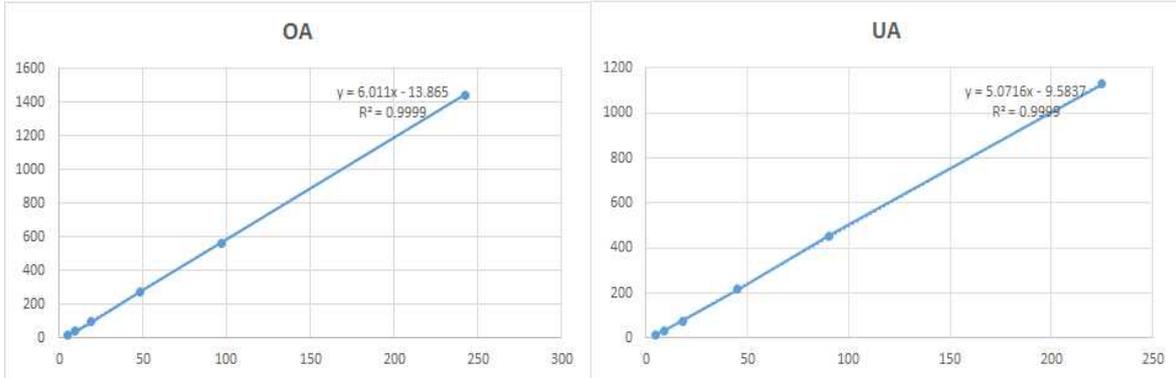
온 도 : 컬럼 30℃, 분석시료 20℃



[그림 46] Oleanolic acid와 ursolic acid의 HPLC 크로마토그램 (상)과 곰보배추 추출물의 HPLC 크로마토그램 (하)

- 상기 분석 조건을 통해 2개의 표준 화합물 피크가 서로 겹치지 않고 분리가 가능하며, 30분의 짧

은 분석 시간을 통한 효율성 증대가 가능해졌고, 표준 화합물의 검량선은 [그림 20]와 같이 계산 되었음.



[그림 47] 표준 화합물의 검량선 (올레아놀릭산: $y=6.011x-13.865$; 우르솔릭산: $y=5.0716x-9.5837$)

- 개발된 HPLC-DAD 분석법을 통해 확립된 1차 함량 범위 (80-120%)는 에탄올 연조엑스 (10:1) 기준 oleanolic acid가 0.242-0.363%, ursolic acid가 0.587-0.881%으로 결정되었으며, 원료 배치 별 함량 평가 결과는 [표 16]와 같음.

[표 16] 표준 화합물의 생산 배치별 함량 평가

표준 화합물	Lot No.	1	2	3	평균
oleanolic acid	함량 (%)	0.245	0.299	0.363	0.303
ursolic acid	함량 (%)	0.531	0.853	0.817	0.734

- 지표 화합물의 **TLC 분석**은 상기한 바와 같이 2개의 지표 성분이 구조 이성질체로 물리 화학적 성상이 매우 유사한 특징을 갖고 있어 어려움이 있음. 따라서 일반적으로 활용되는 silica gel, RP₁₈ TLC 분석 조건에서는 분석이 용이하지 않으므로, 요오드 유도체화를 활용한 TLC 분석 기법을 개발하였으며, 상세 조작법은 아래와 같음 [그림 48].

[조작법]

- 1) 알루미늄 또는 유리 TLC 플레이트에 검액과 표준액을 용량만큼 점적한다.
- 2) 요오드 용액 (요오드 결정을 클로로포름에 1 mg/ml의 농도로 완전히 녹여서 조제)을 전개용 챔버에 약 1 cm의 높이로 채우고 45℃ 수욕상에 방치한다.
- 3) 검액과 표준액이 점적된 TLC 플레이트를 요오드 용액이 담겨있는 챔버에서 점적된 지점 위로 2 cm가 더 올라가도록 전개한다.
- 4) 전개된 TLC 플레이트를 꺼내어 빛을 차단한 상태로 30분간 방치한다 (온도: 40-50℃).
- 5) 방치가 완료된 TLC 플레이트는 전개용매에서 TLC 법에 의해 전개한 후, 발색제를 뿌리고 220-240℃에서 3분간 가열한다.

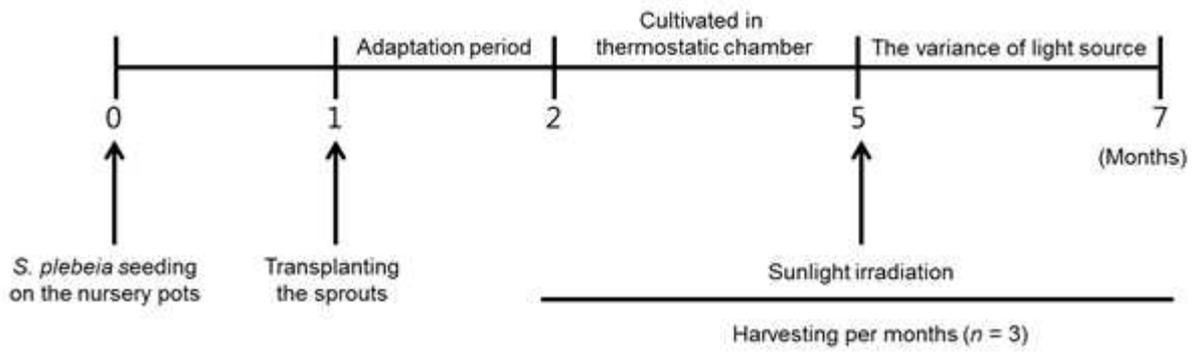


[그림 48] 표준품의 박층크로마토그래피 [Rf 값: UA (0.50), OA (0.71)]

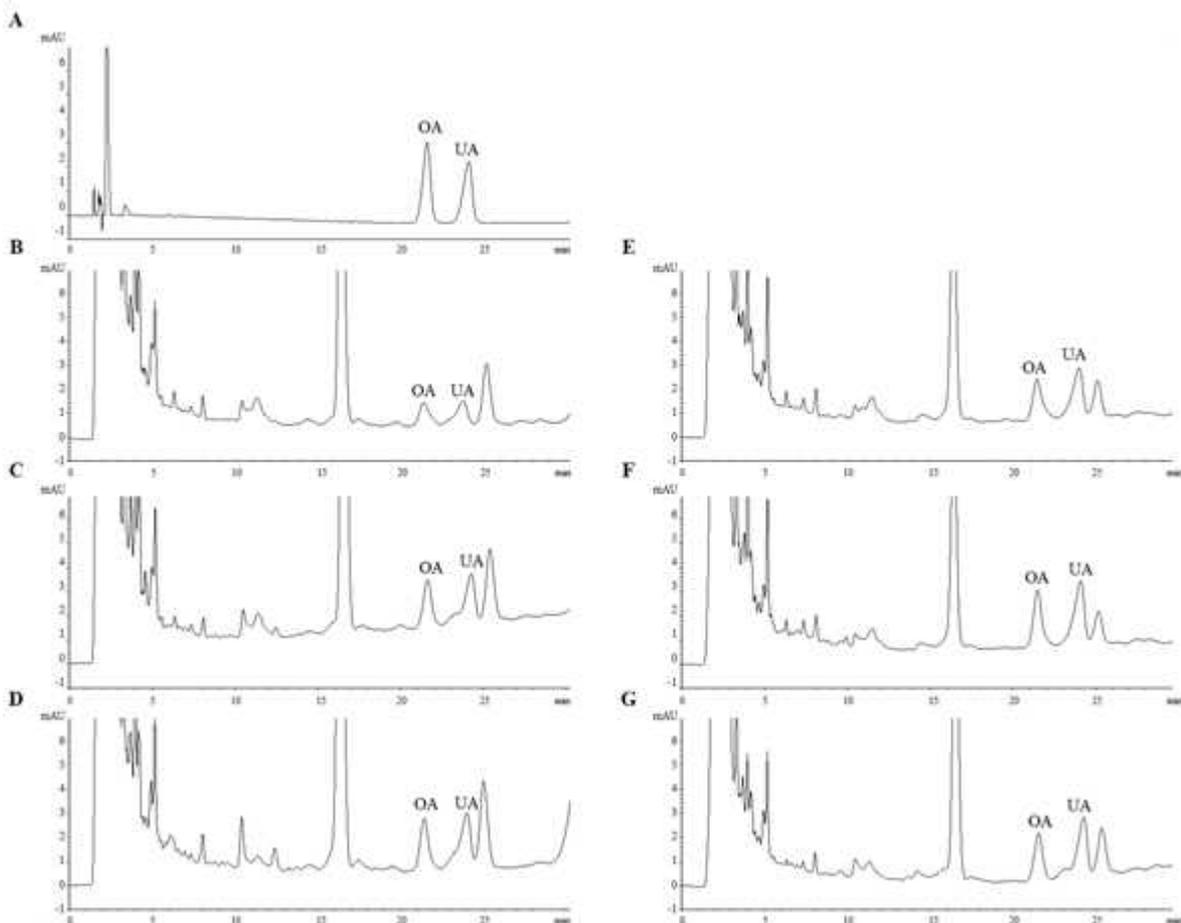
- 상기 채취시기별 곶보배추 시료는 노지에서 채취한 것으로 자연 환경 조건 변화에 민감한 단점이 있어, 정확한 성장 주기별 시료의 구성 화합물 변화를 관찰하기 위해 현재 한국생명공학연구원 전북분원에 위치한 전문 시설을 활용하여 6개월간 재배하였음. 기간 동안, 14일 간격으로 시료를 채취하여 항온항습시설에서 건조하였음. 확립된 분석법을 활용하여 oleanolic acid와 ursolic acid의 함량을 분석하였음. 6개월에서 지표화합물의 함량이 증가하는 것을 확인하였음.



[그림 49] 곶보배추의 성장 주기별 외형 변화



[그림 50] 곰보배추의 재배 조건



[그림 51] 곰보배추 재배시기별 HPLC 크로마토그램 (oleanolic acid와 ursolic acid 함량)

[표 17] 곰보배추 재배시기별 oleanolic acid와 ursolic acid의 함량변화

Samples	2 Months	3 Months	4 Months	5 Months	6 Months	7 Months
	Contents (n = 3)					
Oleanolic acid (mg/g)	0.766 ± 0.003 a	1.246 ± 0.002	1.433 ± 0.015	1.270 ± 0.019	1.546 ± 0.007	1.546 ± 0.027
Ursolic acid (mg/g)	0.915 ± 0.008	1.270 ± 0.006	1.376 ± 0.016	1.604 ± 0.022	2.066 ± 0.037	1.677 ± 0.003

4) 곱보배추 성분프로파일링 분석

○ 목적

- 곱보배추(전남 장흥산) 주정추출물에 대하여 화학적 특징이 최대한 반영된 표준 성분 프로파일링 분석 자료를 확보하는데 있음.
- 표준화된 성분 프로파일링 분석 자료 확보를 통하여 시기별, 지역별 원료의약품에 대한 확인, 조성 및 품질일관성 평가 기준을 제시하는데 있음.
- 또한, 원료의약품의 품질심사 신청 시 제출 자료를 확보하는데 있음.

○ 연구방법

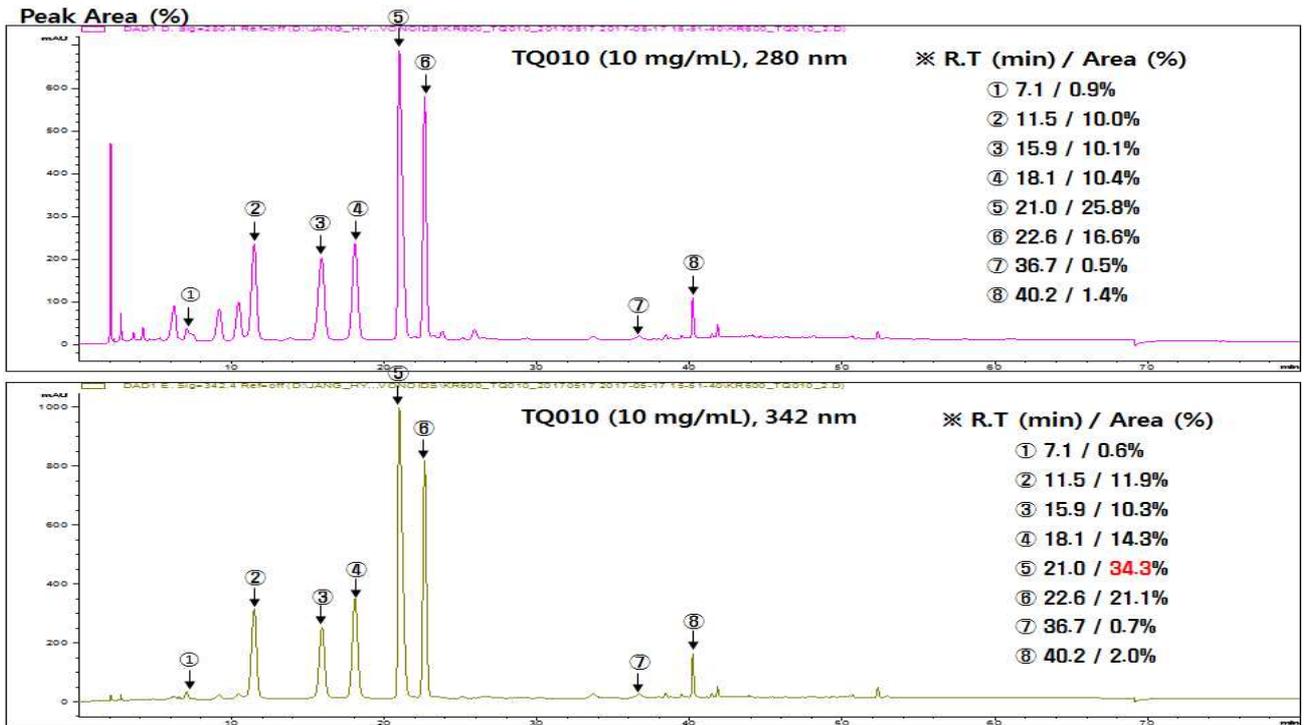
- 재료 및 분석시료 제조
 - 임상 시료 TQ010 [고형분 : 미결정셀룰로오스 = 1:1 (w/w)]
 - 분석표준시료는 시료 100 mg을 10 mL 메탄올에 넣고 초음파추출 (2 h)을 진행한 후, 상층액 (약 8 mL)만을 취하여 감압농축하여 사용함.
 - 전체 피크 면적 대비 1% 이상, 30% 미만의 피크 면적을 갖는 전체 피크 분석
- HPLC 분석 조건 및 방법
 - 분석기기 : Agilent 1200 series
 - 컬럼 : Phenomenex gemini C18 (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm)
 - 파장 : 280 nm, 342 nm
 - flow rate : 1 mL/min
 - 이동상 : 0.5% acetic acid in H₂O : MeOH
 - 시료 : 10 mg/mL, 10 μ L injection
- LC-MS 분석 조건 및 방법
 - 분석기기 : Agilent 1200 series (LC), Agilent 6410B instrument (MS)
 - 컬럼 : Phenomenex Kinetex XB-C18 (2.6 μ m, 2.1 mm \times 50 mm)
 - flow rate : 0.5 mL/min
 - 이동상 : water and acetonitrile containing 0.1 % formic acid
 - Ionization : electrospray ionization interface, positive
 - Framenter potential : 110V
 - Interface heater : 300° C

○ 연구결과

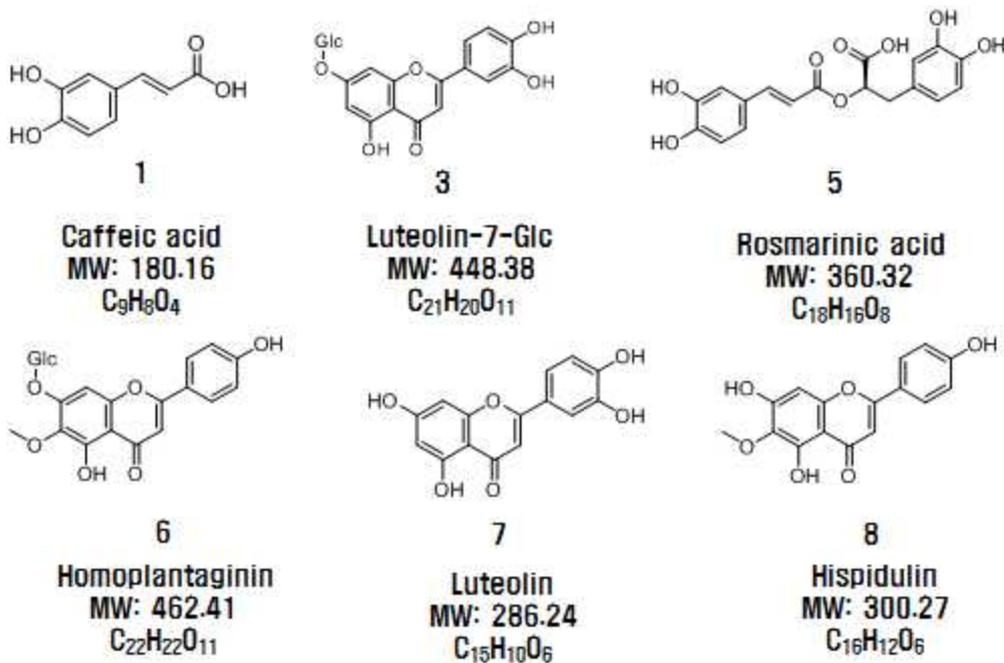
- 곱보배추 주정추출물에 대한 HPLC-DAD 분석
- 표준성분프로파일 설정
 - 전체 피크면적 대비 1% 이상 30% 미만의 피크 면적을 갖는 피크를 표준성분프로파일 설정을 위한 피크로 선정하고, 선택된 피크들의 면적의 합은 전체 피크 면적 대비 50% 이상으로 설정.
- 곱보배추 주정추출물에 대하여 HPLC-DAD 분석을 실시한 결과, 7.1분, 11.5분, 15.9분, 18.1분, 21.0분, 22.6분, 36.7분 그리고 40.2분에서 검출되는 피크를 확인하였음.
- 각 분대에서 검출되는 피크들은 342nm 파장에서 분석한 결과는 각각 0.6%, 11.9%, 10.3%, 14.3%, 34.3%, 21.1% 0.7%, 2.0% 면적을 갖는 것으로 확인되었으며, 280nm 파장에서 분석한 결과는 각각 0.9%, 10.0%, 10.1%, 10.4%, 25.8%, 16.6% 0.5%, 1.4% 면적을 갖는 것으로 확인됨
- 본 연구실에서 분리 정제되어 구조 동정이 완료된 6개 화합물에 대하여 크로마토그래피 분석을 실시한 결과, 곱보배추주정추출물에서는 7.1 분, 15.9 분, 21.0 분, 22.6분, 36.7 분 그리

고 40.2 분에서 분리정제된 화합물들을 확인하였음.

- 11.5분 및 18.1분에 검출되는 피크에 대해서는 LC-MS 분석을 통하여 확인함.



[그림 52] 곰보배추 주정추출물의 HPLC 크로마토그램



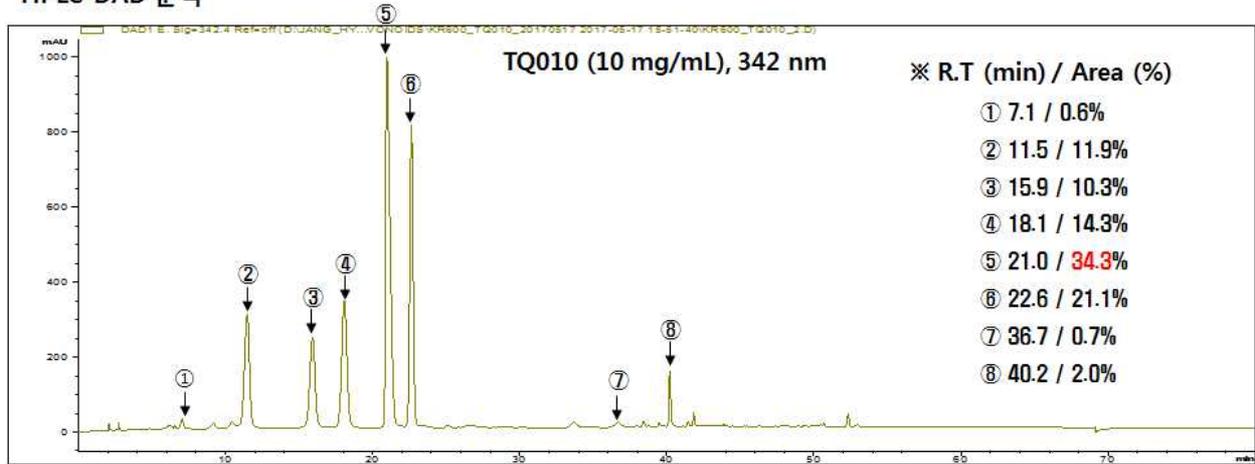
[그림 53] 곰보배추로부터 분리 정제된 화합물의 구조

○ 선택된 피크들에 대한 UV spectrum 분석

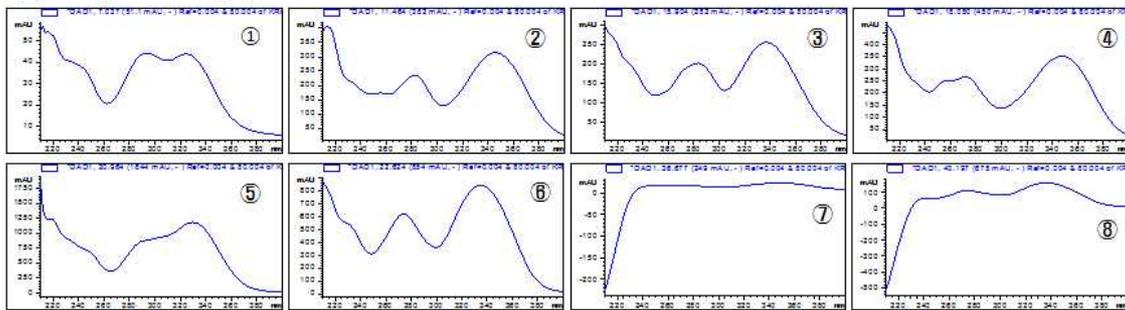
- 피크별 UV spectrum 분석
 - HPLC- DAD 분석을 통하여 UV spectrum을 관찰한 결과, 2번, 3번, 4번 그리고 6번 피크에서 유사한 spectrum 패턴을 관찰할 수 있었음. 따라서, 2, 3, 4, 6번 화합물은 유사한

구조로 유추할 수 있음.

HPLC-DAD 분석



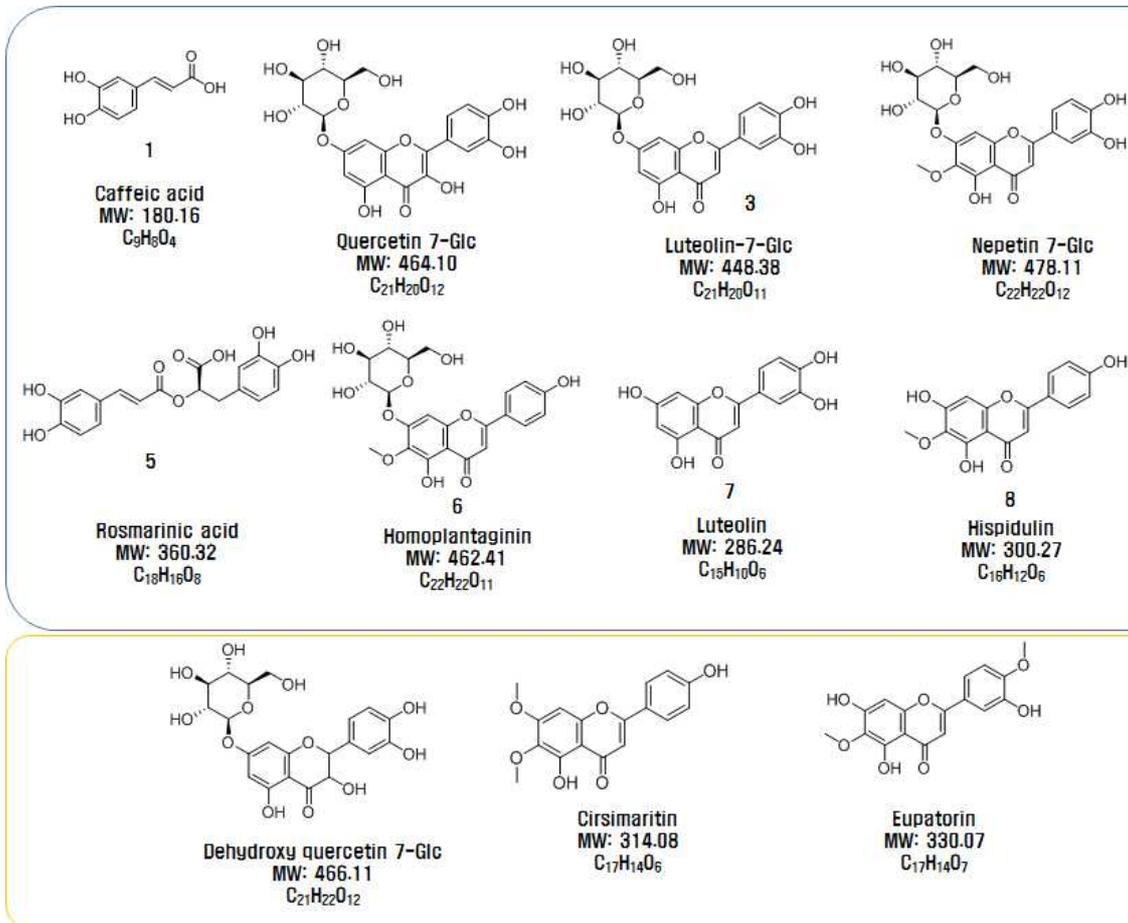
Peak별 UV Spectrum 분석



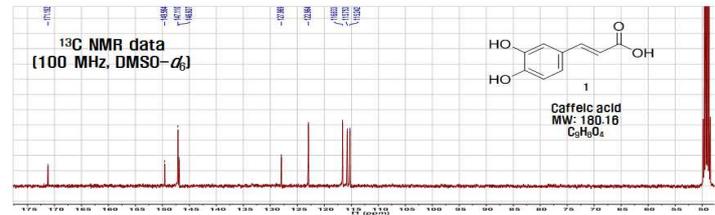
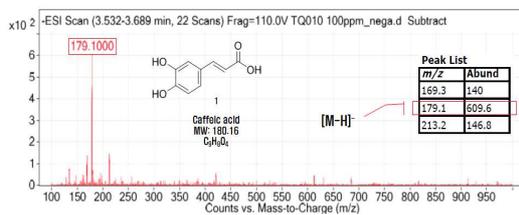
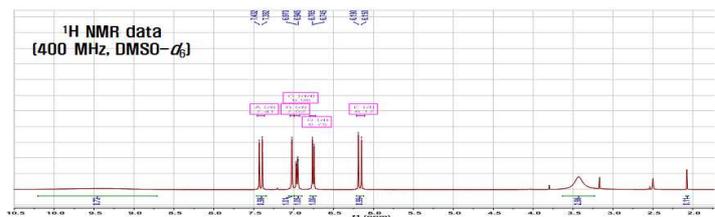
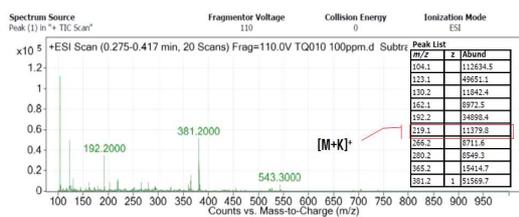
[그림 54] 피크별 UV spectrum

○ 선택된 피크들에 대한 LC-MS 분석을 통한 분자량 확인

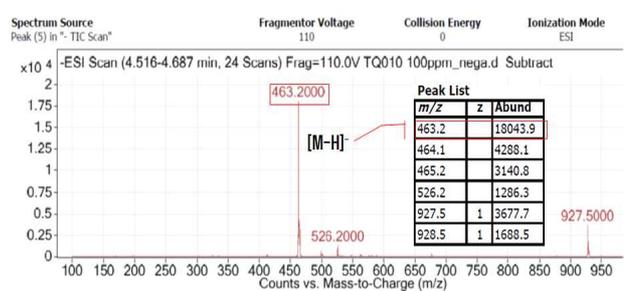
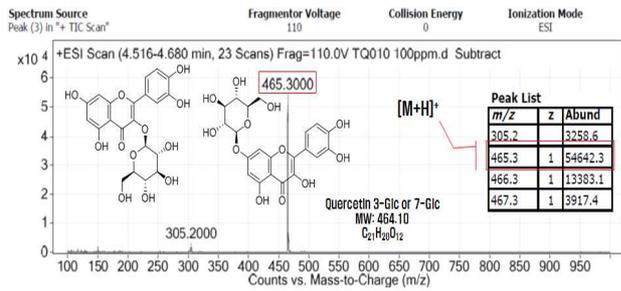
- 피크별 LS-MS 분석을 통한 분자량 확인
 - 고평배추 주정추출물에 대하여 선택된 피크들에 대한 분석 결과, 7.1분, 15.9분, 21.0분, 22.6분, 36.7분 그리고 40.2분에 관찰되는 피크는 각각 caffeic acid, Luteolin-7-glu, rosmarinic acid, homoplantagenin, luteolin, hisidulin의 분자량을 확인할 수 있음
 - 구조가 확인이 되지 않은 11.5분 및 18.1분에 검출되는 피크는 각각 Quercetin 7-Glu or Quercetin 3-Glu, Nepetin 7-Glu의 분자량을 유추 할 수 있음
 - 또한, LC-MS 분석결과 추가적으로 Dehydroxy quercetin 7-Glu, Apigenin 7-Glu, cirsimaritin 및 eupatorin으로 추정되는 분자량을 확인하였음
- 피크별 NMR 분석
 - 7.1분, 15.9분, 21.0분, 22.6분, 36.7분 그리고 40.2분에 관찰되는 피크에 대하여 NMR 분석 결과 최종적으로 각각 caffeic acid, Luteolin-7-glu, rosmarinic acid, homoplantagenin, luteolin, hisidulin로 확인하였음.
- 분석된 MS 및 NMR 결과가 많은 관계로 본 연차실적계획서에서는 7.1분에 관찰되는 피크인 caffeic acid의 MS 및 NMR 결과만 첨가함.



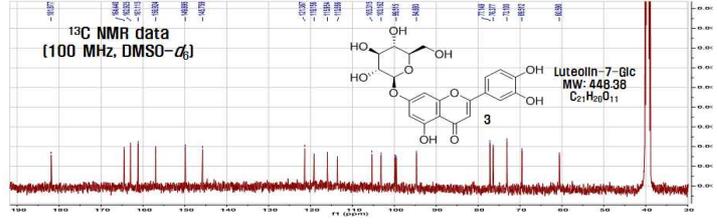
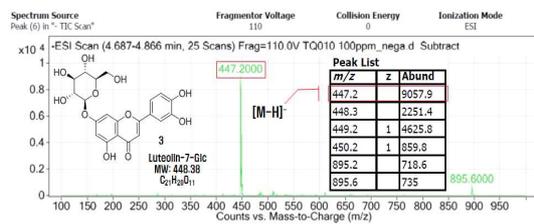
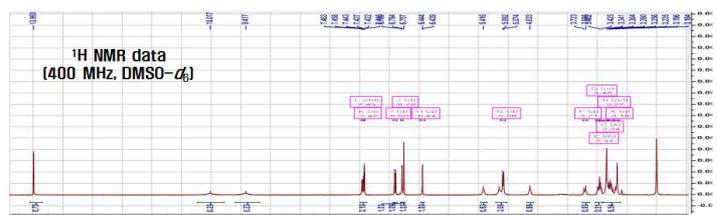
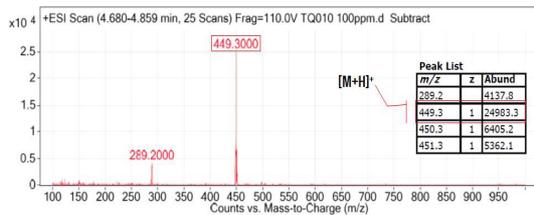
[그림55] LC-MS 분석을 통해 확인된 화합물의 구조



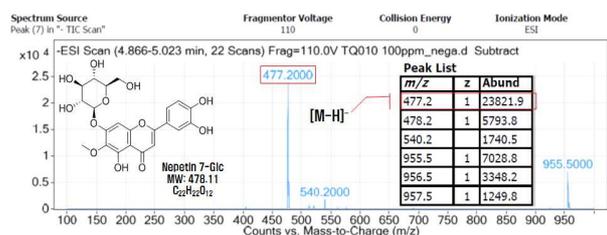
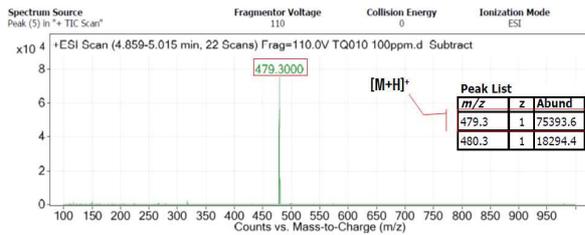
[그림 56] 피크 1 (caffeic acid) 의 MS 및 NMR data



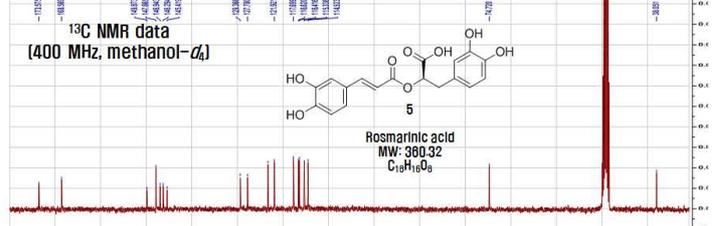
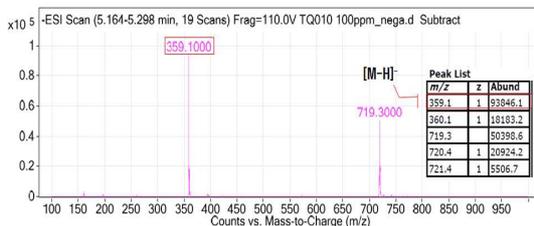
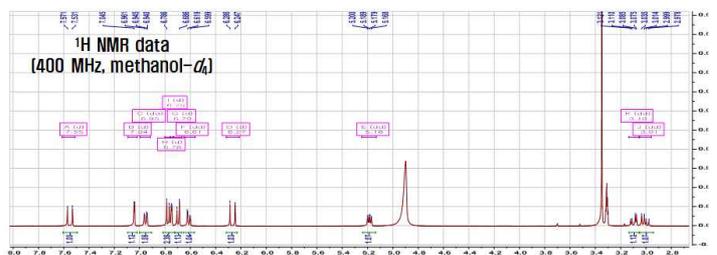
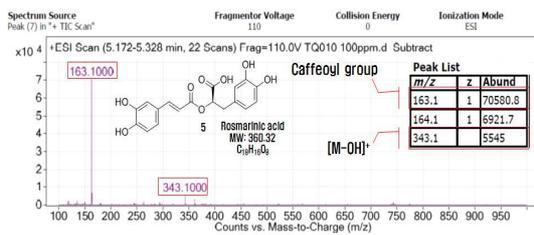
[그림 57] 피크 2(Quercetin 7-Glu,) 의 MS data



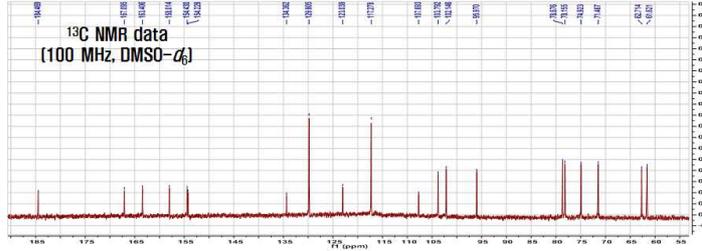
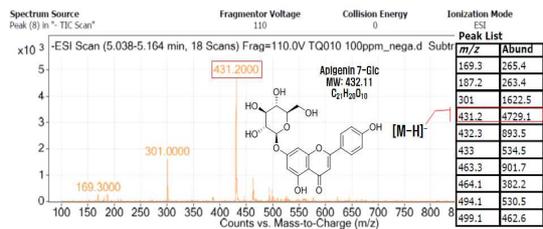
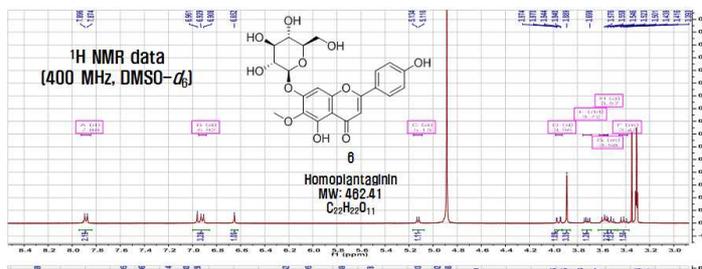
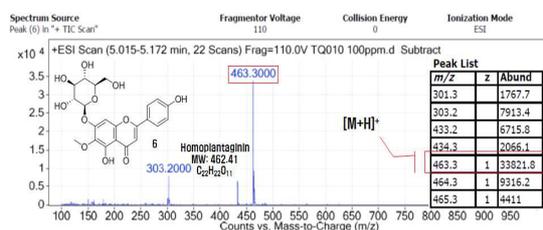
[그림 58] 피크 3 (Luteolin-7-glu) 의 MS 및 NMR data



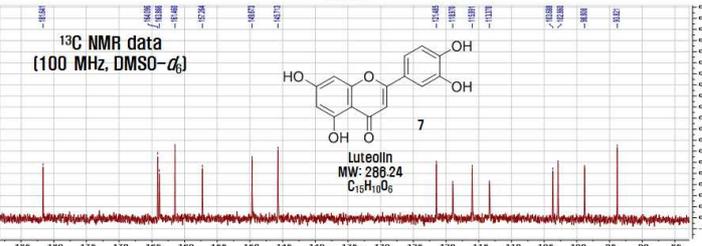
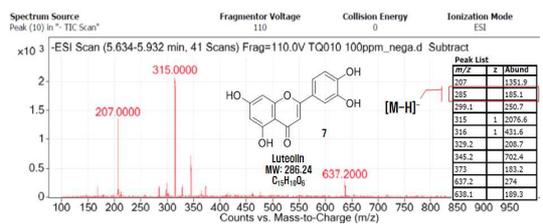
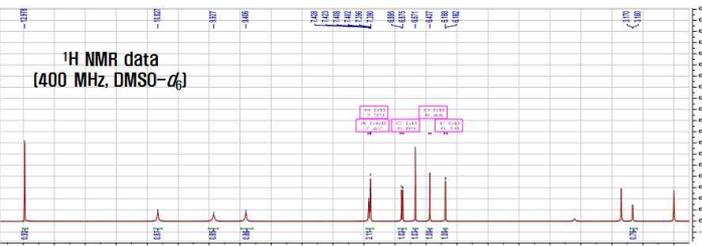
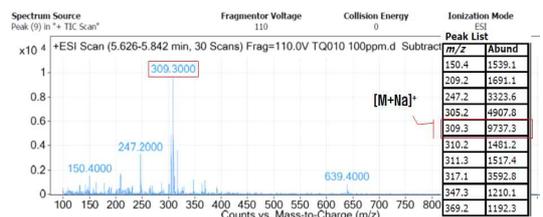
[그림 59] 피크 4 (Nepetin 7-Glu) 의 MS data



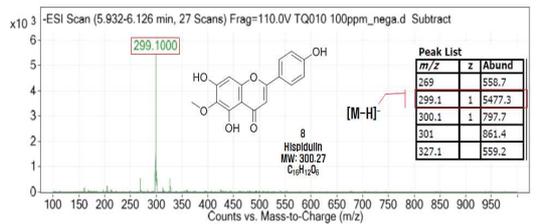
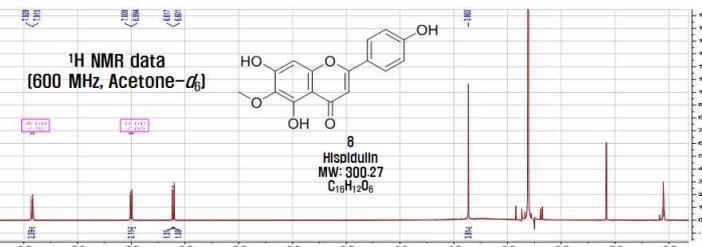
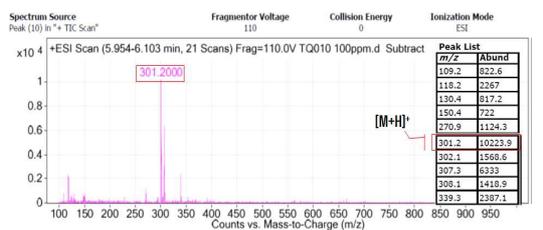
[그림 60] 피크 5 (rosmarinic acid) 의 MS 및 NMR data



[그림 61] 피크 6 (homoplantagenin) 의 MS 및 NMR data



[그림 62] 피크 7 (Luteolin) 의 MS 및 NMR data



[그림 63] 피크 8 (Hispidulin) 의 MS 및 NMR data

○ 표준성분 프로파일링 분석 자료를 이용한 산지별 성분 분석

• 산지별 성분 분석

- 장흥산 곶보배추 주정추출물에 대한 표준 프로파일링 분석 자료를 이용하여 6개 지역 18개 시료에 대한 분석을 실시하였음.
- 제주(1), 경기도(2), 강원도(1), 충청도(4), 전라도(3), 경상도(7): 생약 구매는 인터넷 사이트를 통해서 구입하였으며, 재배 이력을 확인할 수 없었음.
- 분석결과, rosmarinic acid의 함량 변화가 제일 심하게 관찰되었으며, Luteolin 7-Glu 및 Homoplantagin의 함량 변화도 큰 것으로 관찰되었음.

[표 18] 곶보배추에 함유된 페놀릭 및 플라보노이드 화합물의 함량변화(지역별)

Samples	Cultivation area	Analytes (mg / g extract)						Total
		Caffeic acid	Luteolin 7-glucoside	Rosmarinic acid	Homoplantagin	Luteolin	Hispidulin	
KSPA1	Jeju	1.19 ± 0.01	7.24 ± 0.26	63.98 ± 0.77	29.27 ± 0.35	1.46 ± 0.04	2.75 ± 0.04	105.88
KSPB1	Gyeonggi	1.02 ± 0.04	3.90 ± 0.03	120.65 ± 4.30	27.50 ± 1.17	0.66 ± 0.01	0.91 ± 0.02	154.63
KSPB2	Gyeonggi	0.95 ± 0.01	9.19 ± 0.023	94.06 ± 3.19	28.99 ± 0.78	0.91 ± 0.08	1.62 ± 0.03	135.72
KSPC1	Kangwon	0.58 ± 0.03	21.82 ± 0.03	60.36 ± 0.13	34.70 ± 0.34	0.70 ± 0.02	1.06 ± 0.02	119.22
KSPD1	Chungcheong	0.58 ± 0.03	10.30 ± 0.36	45.70 ± 5.92	28.47 ± 0.42	0.63 ± 0.01	1.02 ± 0.01	86.70
KSPD2	Chungcheong	0.60 ± 0.01	11.81 ± 0.25	27.81 ± 2.34	26.40 ± 1.03	0.65 ± 0.01	0.80 ± 0.01	68.08
KSPD3	Chungcheong	0.96 ± 0.06	4.07 ± 0.42	119.80 ± 11.47	16.36 ± 1.89	0.63 ± 0.01	0.90 ± 0.04	142.73
KSPD4	Chungcheong	0.89 ± 0.06	6.48 ± 0.08	138.99 ± 2.63	17.83 ± 0.37	0.62 ± 0.01	0.89 ± 0.05	165.70
KSPE1	Jeolla	0.60 ± 0.05	7.79 ± 2.03	113.81 ± 28.54	27.71 ± 7.03	0.63 ± 0.01	0.90 ± 0.05	151.43
KSPE2	Jeolla	0.63 ± 0.04	9.95 ± 0.24	106.68 ± 1.50	33.50 ± 0.48	0.71 ± 0.05	1.16 ± 0.01	152.63
KSPE3	Jeolla	0.83 ± 0.04	2.80 ± 0.23	44.35 ± 1.48	13.92 ± 1.00	0.77 ± 0.01	1.48 ± 0.06	64.15
KSPF1	Gyeongsang	1.16 ± 0.10	4.41 ± 0.63	110.61 ± 20.27	16.39 ± 2.63	0.68 ± 0.02	1.12 ± 0.11	134.36
KSPF2	Gyeongsang	0.88 ± 0.07	3.88 ± 0.11	130.89 ± 2.27	15.81 ± 0.92	0.63 ± 0.01	1.80 ± 0.01	152.89
KSPF3	Gyeongsang	0.88 ± 0.03	1.89 ± 0.05	65.09 ± 1.07	6.57 ± 0.35	0.62 ± 0.01	0.92 ± 0.04	75.97
KSPF4	Gyeongsang	0.64 ± 0.02	21.45 ± 2.08	80.48 ± 4.78	46.23 ± 2.46	0.80 ± 0.04	1.31 ± 0.07	150.91
KSPF5	Gyeongsang	0.90 ± 0.02	2.81 ± 0.13	82.34 ± 5.92	10.09 ± 0.59	0.62 ± 0.01	0.91 ± 0.09	97.68
KSPF6	Gyeongsang	0.56 ± 0.03	4.98 ± 0.62	66.56 ± 7.81	36.08 ± 4.15	1.57 ± 0.17	2.79 ± 0.27	112.54
KSPF7	Gyeongsang	0.65 ± 0.04	33.28 ± 3.07	92.21 ± 8.88	53.13 ± 6.59	0.82 ± 0.03	1.25 ± 0.05	181.33
TQ010	Jangheung	1.20 ± 0.04	22.88 ± 0.30	81.95 ± 1.04	51.43 ± 0.89	1.37 ± 0.01	2.79 ± 0.03	161.62

5) 곶보배추 엽록체 유전체 분석

- 형태/해부학적 분석자료, 분자계통학적 분석자료, DNA 분석자료 등을 이용한 원료 기원 조사

○ 목표

- 본 연구는 곶보배추의 엽록체유전체를 분석하여, 한국에서 자생하는 ‘등근곶보배추’ 와 ‘참곶보배추’, 재배외래종인 ‘단삼’ 등의 근연분류군과 구별할 수 있는 유전구간 정보를 확보하는데 있음.

○ 연구방법

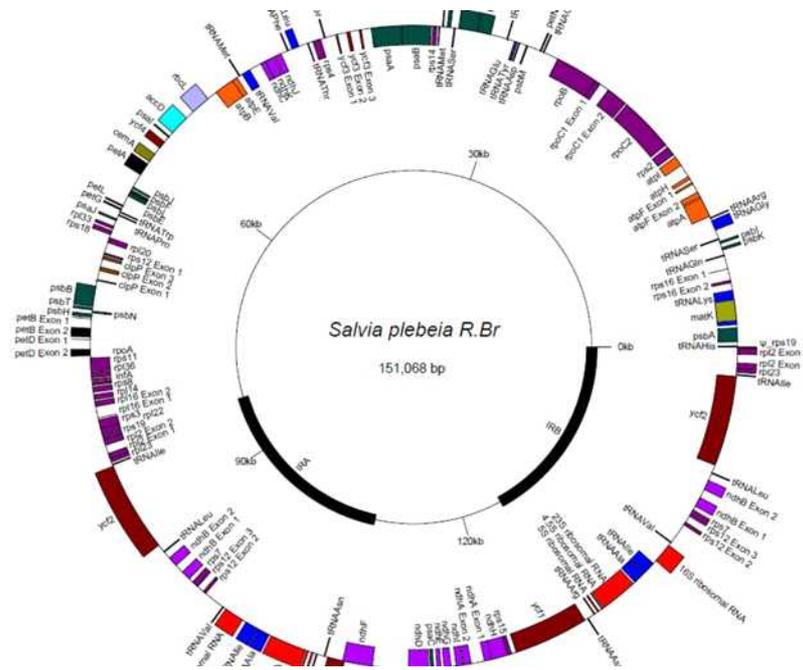
- 한국산 곶보배추류의 분류학적 정보 확보.

- 곶보배추(Salvia)속의 식물을 대한식물도감(이1993), 한국의관속식물속식물지(Park 2007), 한반도고유종(김과박2013), Flora of China (Li & Hedge 1994), 일본의 야생식물(Satakeet al. 1981)을 참조하고, Kew Index에서 식물 이름을 확인하여, 국립생물자원관의 식물표본을 확인하였음.

- 연구재료 및 NGS 데이터생산
 - 고품배추(LAM001)에서 DNA와 RNA를 추출하여, 200bp paired end library를 만들어 HiSeq2000로 분석함. DNA 4G와 RNA 5G 데이터 생산하였음.
- 사용된 엽록체 유전체 분석방법
 - 고품배추(LAM001) NGS 데이터는 Genomic work Bench ver 8.05를 이용해 de novo assemble 분석하였고, 얻어진 콘티그는 Sequencher에서 Assemble하였으며, missing pieces에 대해서는 CLC Genomic work Bench ver8.05를 이용해 NGS 데이터분석을 통하여 확보하였고, 엽록체의 circular구조는 PCR을 이용한 구조검정을 하였으며, 그 연결부위는 Sanger방법을 이용하여 확인하였음.
- 엽록체유전체annotation방법
 - 엽록체 유전체의 annotation은 DOGMA (Wymann et al. 2004)을 이용하였으며, 유전자의 크기는 기존에 알려진 유전자를 근거로한 open reading frame을 기준으로 하였음. tRNA의 경우 tRNAscan (Lowe and Eddy 1997)과ARAGON (Laslett & Canback 2004)를 기준으로 유전자를 찾았으며, 이 유전자는 tRNA 이차구조를 그려서 유전자 유무를 판정하였음. circular 엽록체 유전체는 using GenomeVx를 이용하여 그렸으며, 수동으로 수정하였음

○ 결과

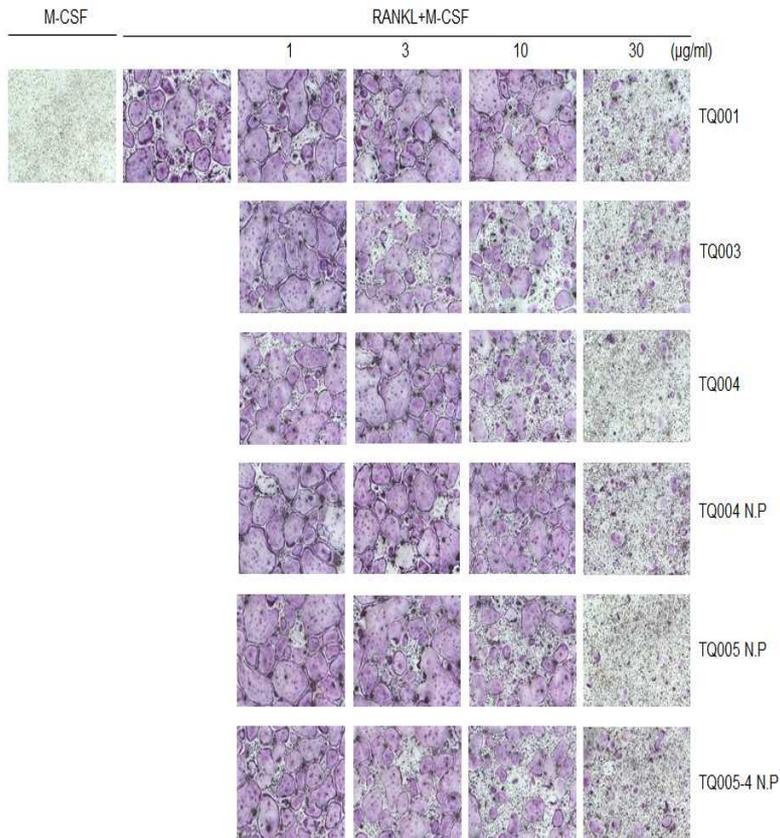
- 한국자생 Salvia3종 중에서 고품배추는 식물분류학적 형질로 볼때, 그 구별이 용이하나, 약용 식물로 재배하는 ‘단삼’ 과 구별 또한 용이하다고 판단되나, 농민적 관점에서 꽃이 작은 Salvia이외의(유전적으로면) 꿀풀과 식물과의 구별이 용이하지 않은 것으로 판단됨.
- 고품배추의 엽록체 유전체를 분석하여, 둥근곶배추와의 유전체를 비교 분석한 결과, IGS구간의 변이가 높았으며, 유전자 구간의 변이도 타분류군에 비해 높은 것으로 나타나 유전자구간의 분자표지를 만드는 것이 유용한 것으로 판단됨
- 고품배추의 엽록체 유전체의 79종류의 단백질 유전자를 녹색식물연구소의 비공개자료인 둥근 곶배추, 참곶배추의 엽록체 유전자 염기서열을 비교분석 한 결과, 58개 유전자에서 479개의 SNP와 8개 유전자에서 14개의 repeat을 포함한 INDEL이 발견되었음.



[그림64] 고품배추의 엽록체 유전체 유전자 지도

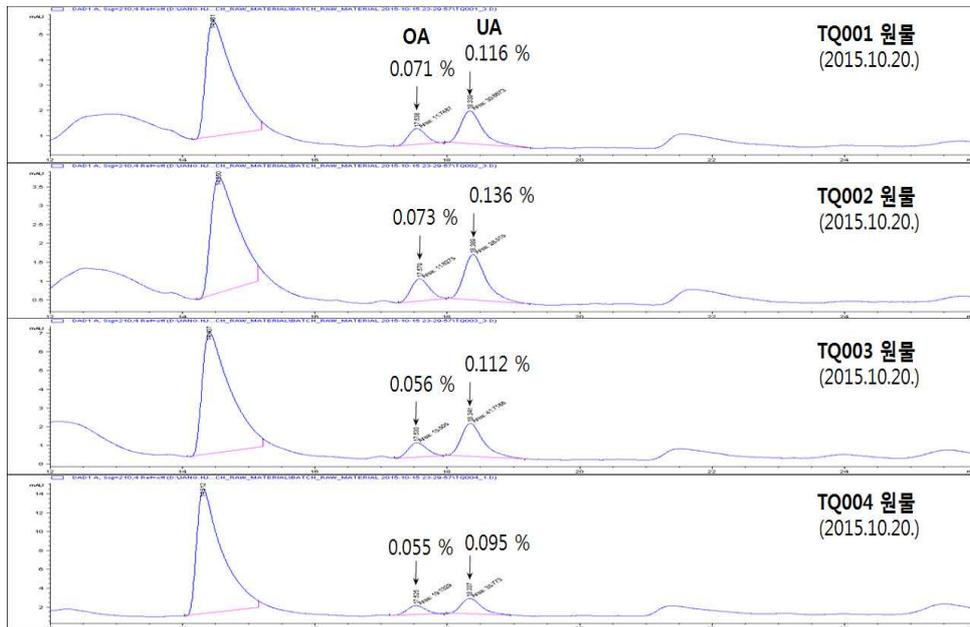
5. 전임상 원료의 활성 검증 및 지표성분 함량 평가

- 전임상 시료인 TQ001, TQ003, TQ004 및 원물에 대한 파골세포 분화억제 실험을 실시하였으며, 30 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 저해활성을 확인하였음. 롯데별 활성의 차이는 없는 것으로 판단됨

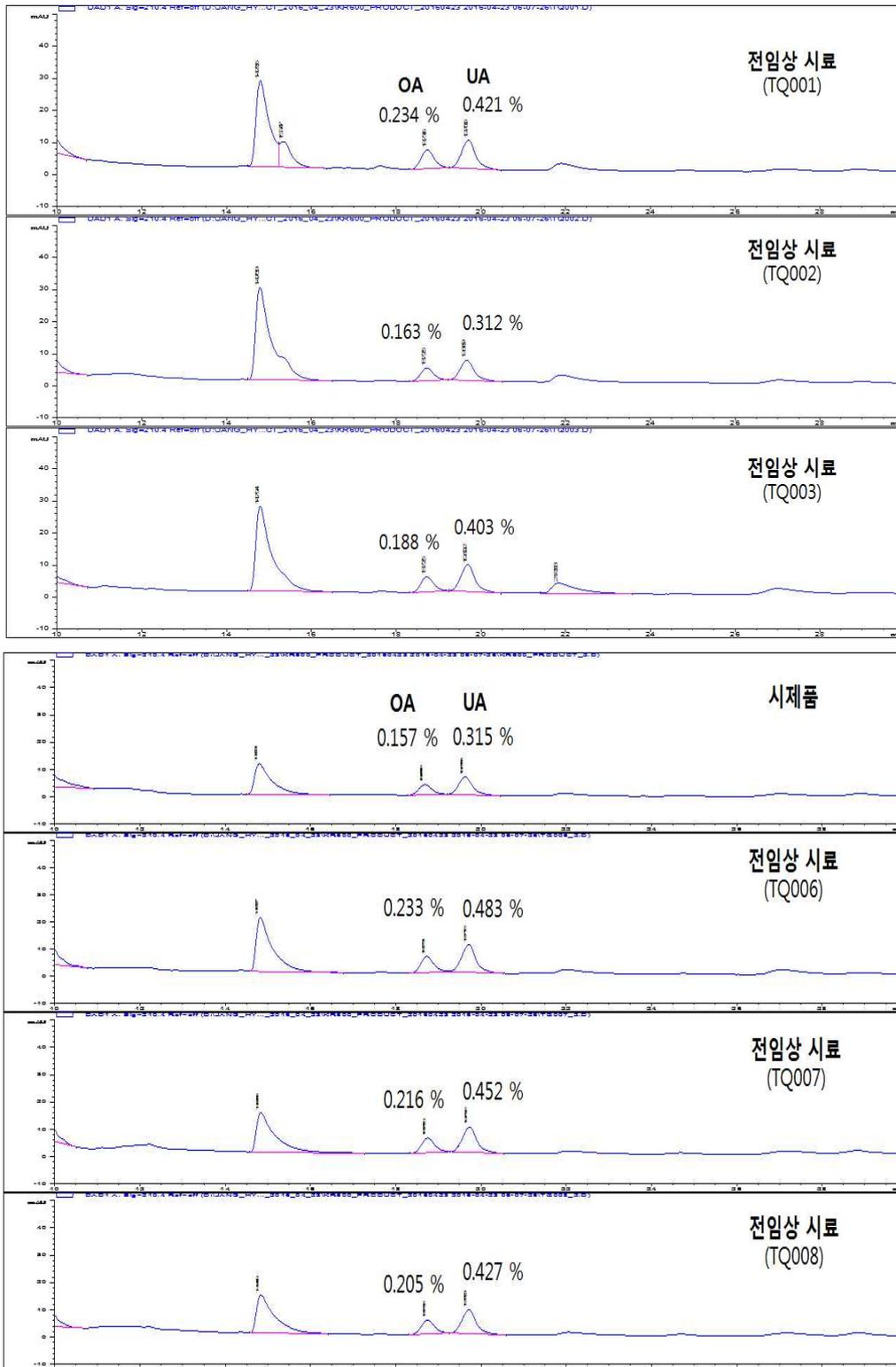


[그림 65] 곰보배추 원료에 따른 파골세포 분화억제 효과

- 전임상 및 임상 시험용 곰보배추 원물에서 도출된 전임상 시료 (TQ001 ~ TQ008) 및 원물에 대해서 기 선정된 지표 화합물들(oleanolic acid 및 ursolic acid)이 기준 시험법 내에 선정된 함량 범위에 적합한지에 대한 HPLC 분석결과 선정된 함량 범위 내에서 분석됨.

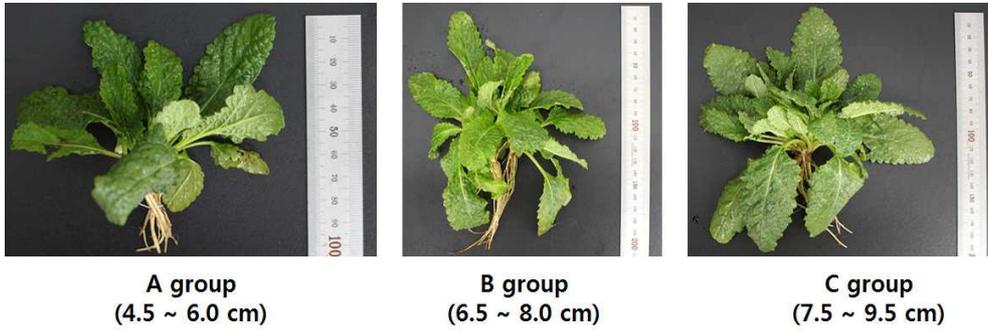


[그림 66] 전임상 시험을 위한 후보 농산물 소재의 품질 평가

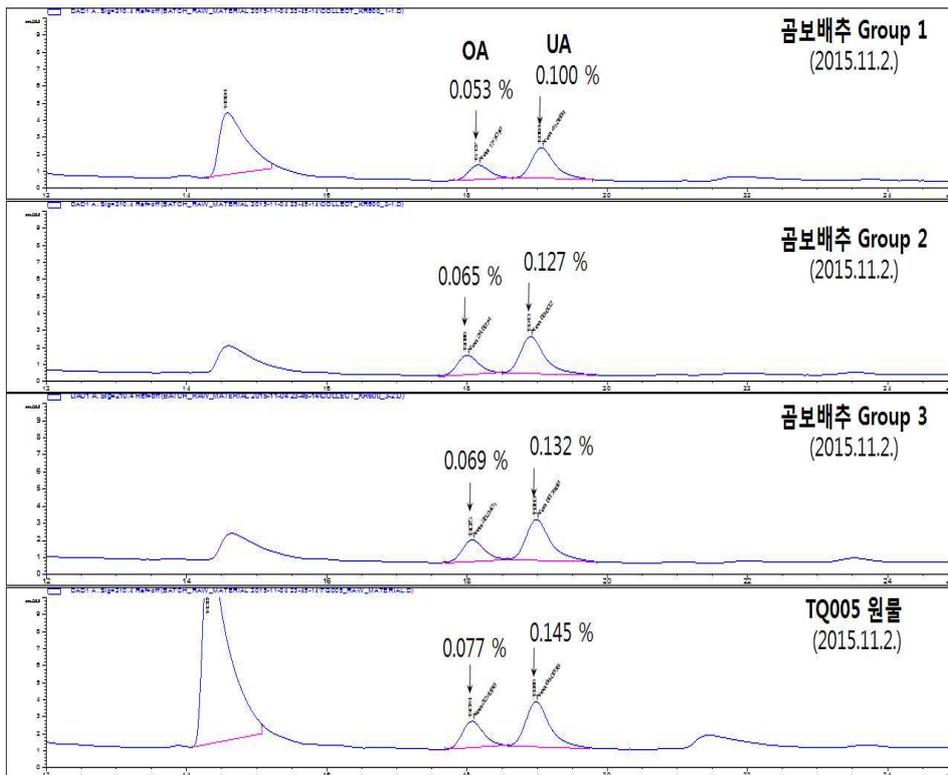


[그림 67] 전임상 시료의 품질평가

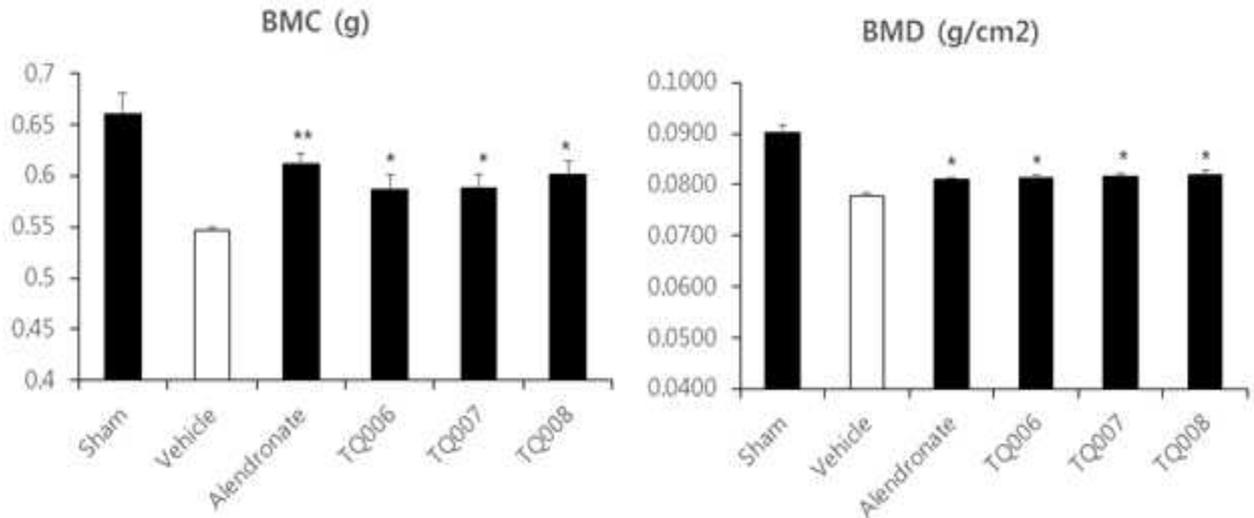
- 재배지 시료의 품질 검사를 위하여 크기에 따라 3 그룹으로 나누어 채취하였으며 채취된 원물은 깨끗이 씻어 말린 후, 지상부만 따로 분리하여 곱게 분쇄 후 기 선정된 기준시험법에 따라 품질 검사 수행



[그림 68] 품질 평가를 위해 채취 된 후보 농산물 소재

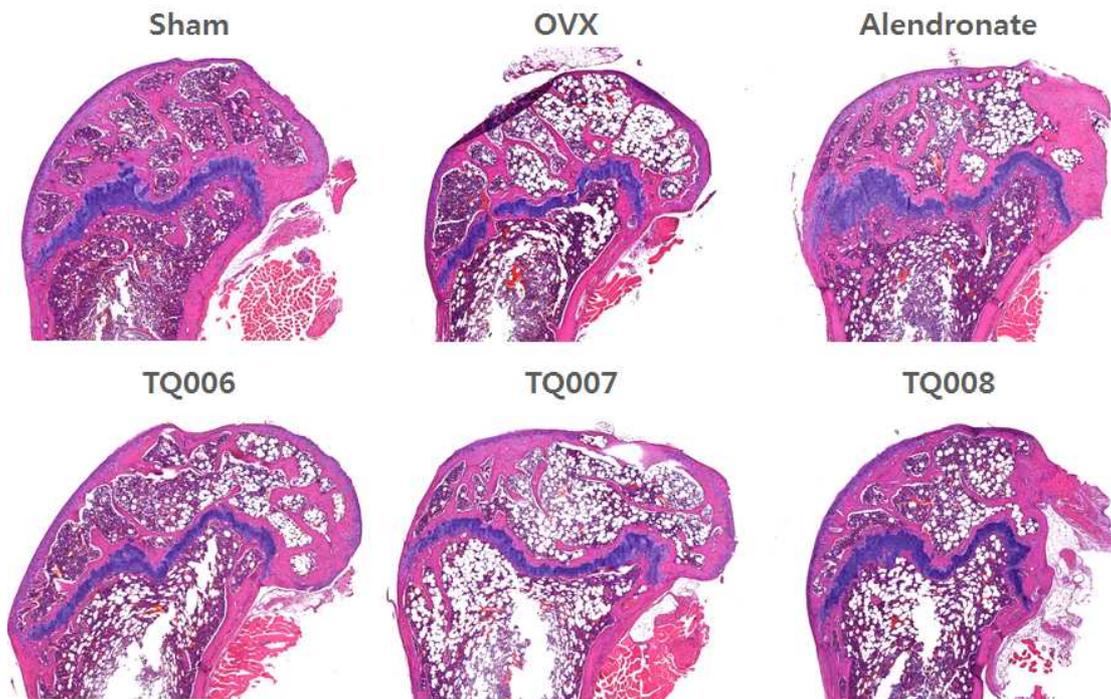


[그림 69] 후보 농산물 소재의 품질 평가



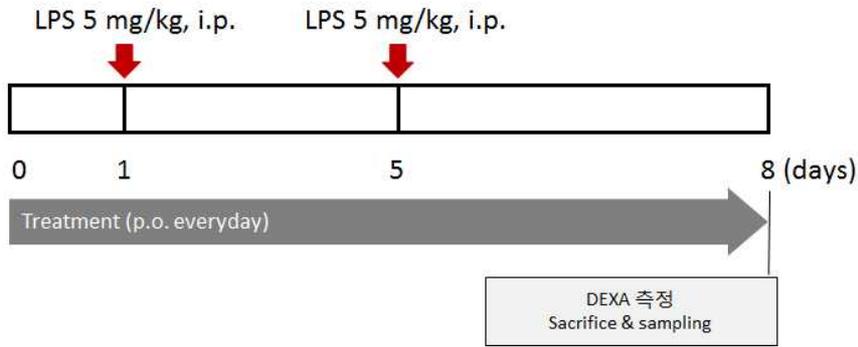
[그림 71] DEXA 측정 결과

- 조직학적 관찰 결과 - 투여실험 종료 후에 마우스의 경골조직을 이용한 조직학적 관찰을 실시한 결과, OVX그룹에서 감소한 골소주 (Trabecular bone, red arrow head)의 숫자가 alendronate투여 그룹에서 뿐만 아니라, TQ006, TQ007, TQ008투여 그룹 모두에서 증가된 것을 관찰 할 수 있었음.



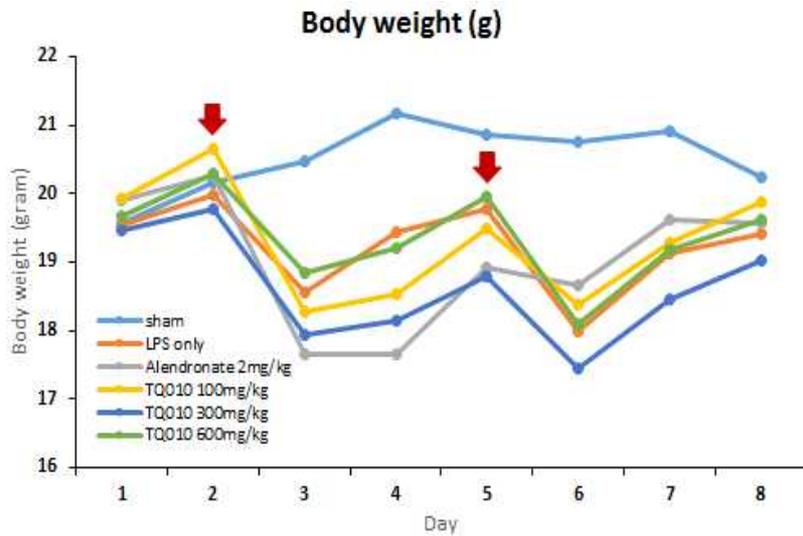
[그림 72] 경골조직의 조직학적 분석

- ▶ LPS유도 골다공증 마우스 모델에서의 임상시료 TQ010의 치료효과 검증
 - 8주령 C57BL/6 암컷 마우스에 2회 LPS를 복강 내 투여하여 염증성 골다공증을 유도하였음.
 - TQ010은 LPS투여 1일 전부터 1일 1회 100, 300, 600 mg/kg농도로 경구투여를 실시하였음.
 - LPS유도 7일간 매일 체중측정 하였고, 실험종료 후에 마취하에 DEXA를 통한 골밀도 측정하였음.



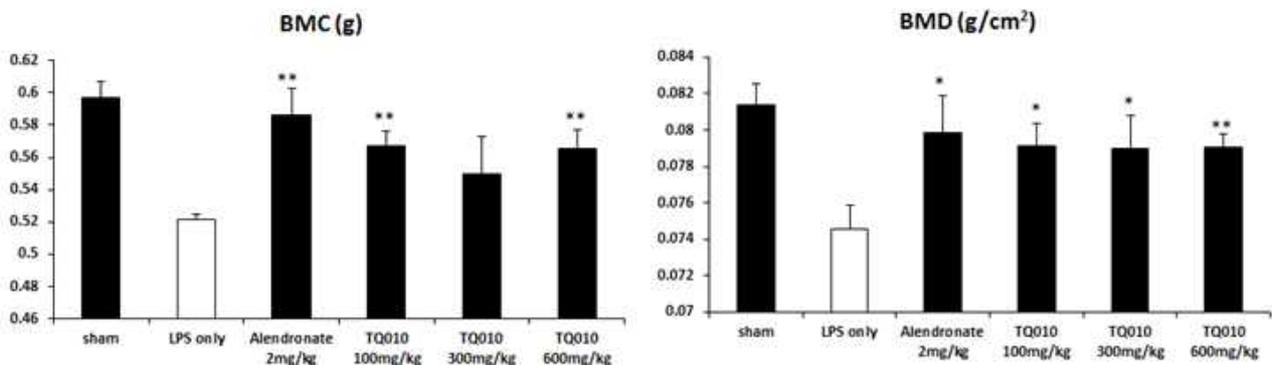
[그림 73] LPS모델 실험 방법

- 체중측정 결과는 LPS투여후 급격히 감소하였으며, 시간이 지나면서 다시 회복하는 것으로 확인되었으며, 투여그룹간의 유의적인 체중차이는 보이지 않았음.



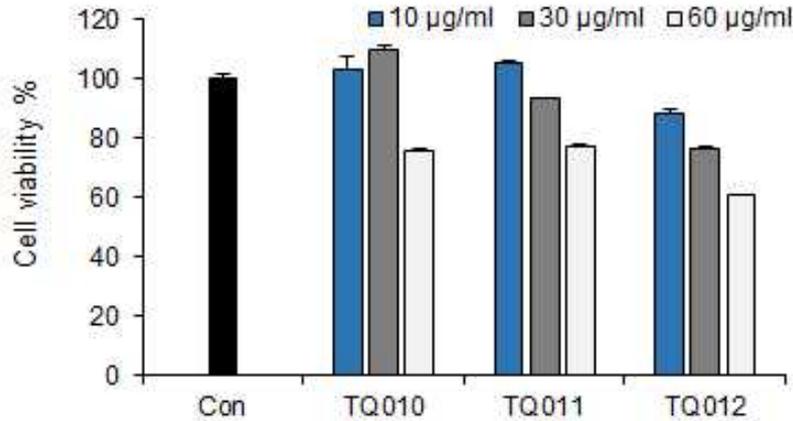
[그림 74] 몸무게변화

- 실험 종료 후, DEXA측정 기기를 이용하여 마취한 상태의 마우스에서 골질량 (Bone mass contents, BMC), 골밀도 (Bone mass density, BMD)를 측정한 결과, positive control인 골다공증 치료제 alendronate 투여 그룹 뿐만 아니라 임상시료 TQ010 (100, 300, 600 mg/kg) 투여그룹에서 모두 유의적으로 골질량 및 골밀도의 회복을 보였음 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

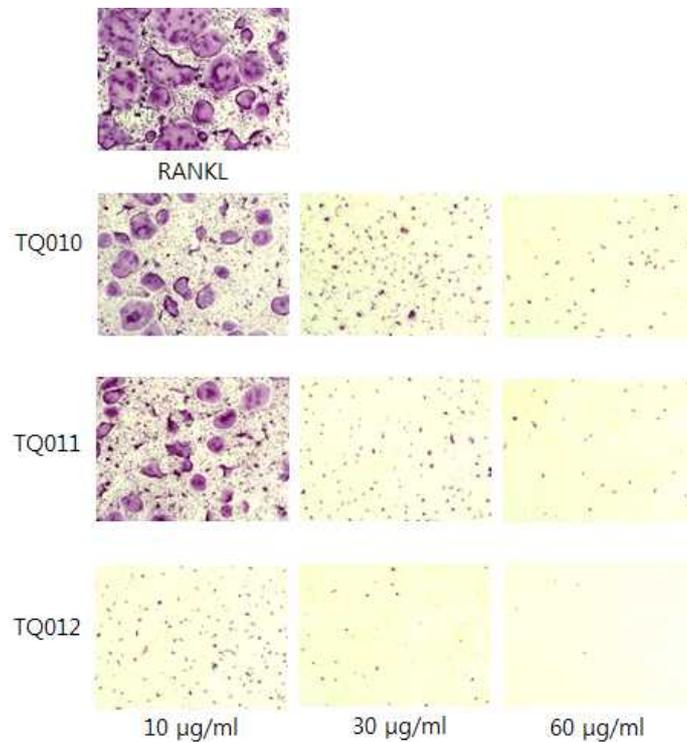


[그림 75] DEXA 측정 결과

- ▶ 임상 시료인 TQ010, TQ011, TQ012에 대한 파골세포 분화억제 실험을 실시하였으며, 10, 30, 60 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 저해활성을 나타내는 것을 확인하였음. TQ012는 다른 전임상 시료와 비교하여 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 우수한 활성을 나타내는 것을 확인하였음. 그러나 다른 전임상 시료와 비교하여 약간의 독성이 있는 것으로 판단됨.



[그림 76] 곰보배추 원료에 따른 세포독성



[그림 77] 곰보배추 원료에 따른 파골세포 분화억제 효과

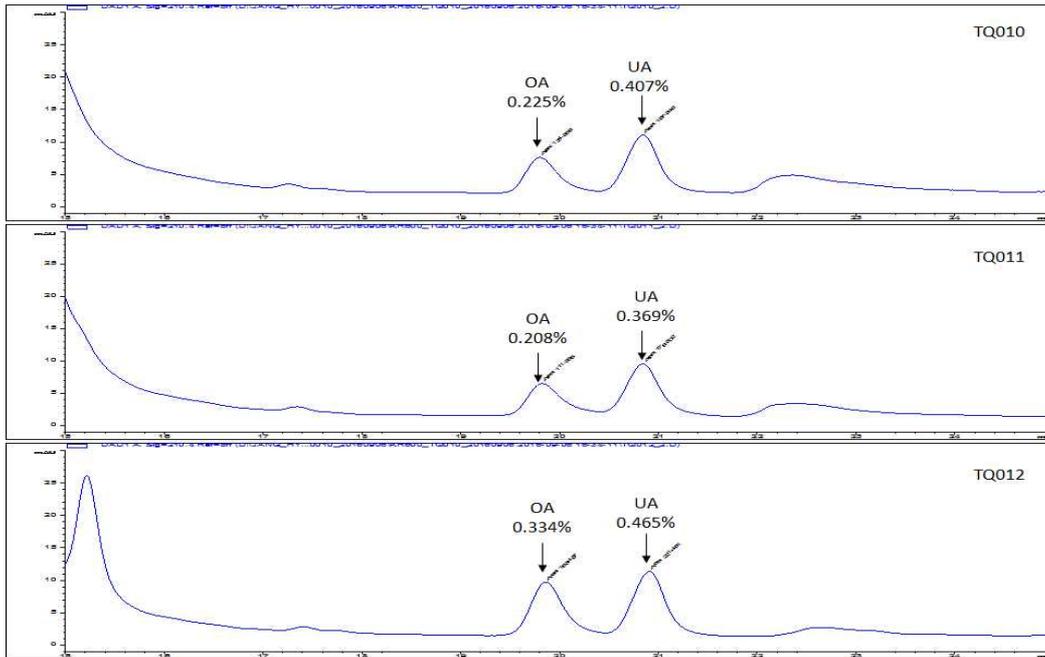
- ▶ 전임상 및 임상 시험용 곰보배추 원료에서 도출된 전임상 시료 (TQ010 ~ TQ012)에 대해서 기 선정된 지표 화합물들(oleanolic acid 및 ursolic acid)이 기준 시험법 내에 선정된 함량 범위에 적합한지에 대한 HPLC 분석을 실시하였음.
 - 분석결과 TQ010, TQ011의 oleanolic acid 함량은 0.225%, 0.208%로 측정되었으며, ursolic acid는 0.407%, 0.369%로 측정되어 기시험법상에서 선정된 함량 범위 내에서 분석됨. 그러나 TQ012의 oleanolic acid 함량은 0.334%, ursolic acid는 0.465%로 측정되어 기시험법상에서 선정

된 함량 범위를 벗어나는 것으로 확인됨.

※ 함량 범위 ($80\% < X < 120\%$)

- $0.173\% < \text{OA 함량} < 0.259\%$

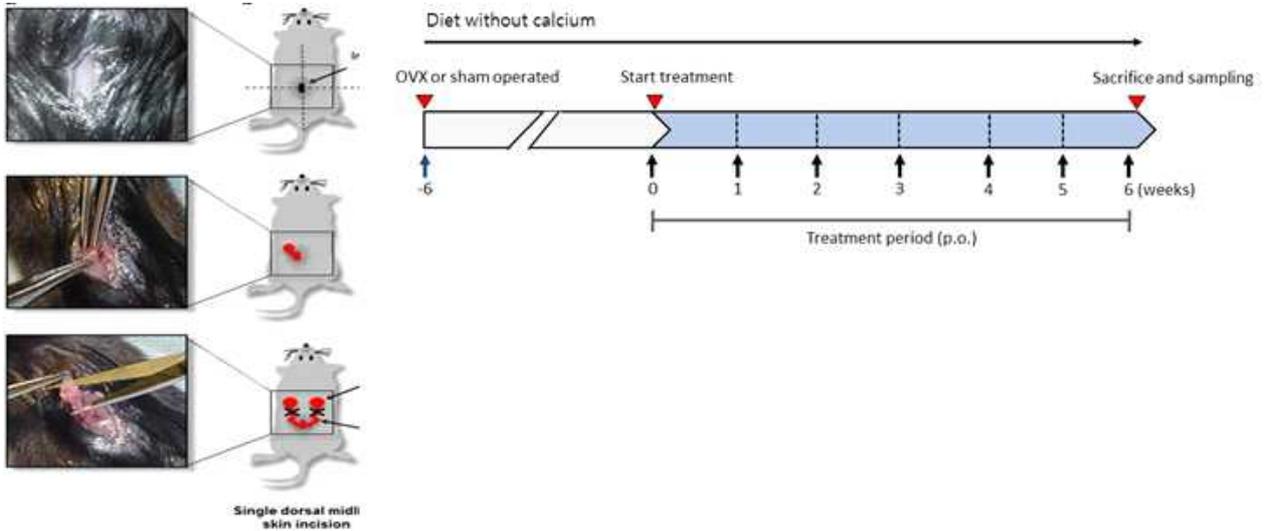
- $0.281\% < \text{UA 함량} < 0.421\%$



[그림 78] 전임상 시료의 품질평가(TQ010~TQ012)

▶ 임상시료 TQ010의 투여횟수에 따른 효능평가

- 임상시료 TQ010 [고형분 : 미결정셀룰로오스 = 1:1 (w/w)]의 투여 횟수에 따른 골다공증 치료효능에 차이가 있는지를 확인하고자 함
- 실험재료 및 방법
 - 마우스 : 8주령 암컷 C57BL/6 마우스 (오리엔트 바이오)
 - 칼슘제거 사료 (AIN-93M diet without calcium, Research Diets)
 - 골다공증 유발을 위한 난소적출술 (Ovariectomy, OVX) - 사람에서 노령화에 따른 에스트로겐 감소와 더불어 나타나는 골다공증의 마우스 모델을 제작 (참고자료 BonKEy Reports, 614 (2014))을 위하여 zoletil, rompun을 복강내 투여하여 전신마취 후, 등쪽 털을 제모하고, 등쪽 절개를 통하여 난소를 노출시킨 후, 봉합사로 결찰 후 난소를 완전히 제거함. 복막, 피부를 봉합 후 소독하고 마취에서 깨어난 후, 케이지로 돌려 놓고 회복
 - 칼슘 제거사료 급여 - 수술 후 6주간 칼슘이 제거된 특수제작 사료를 물과 함께 급여함. 이 후, 그림과 같이 6주간 vehicle (0.5% CMC), 치료제 (Alendronate 2 mg/kg, 1일 1회, 곰보배추 TQ10 (100 mg/kg, 150 mg/kg, 300 mg/kg)를 1일 3회 (TID), 2회 (BID), 1회 (SID), 1일 투여량이 총 300 mg/kg가 되도록 경구투여 실시
 - 투여 종료 후, 골밀도측정 및 조직학적 관찰 실시 - 골밀도 측정기 (Dual-energy x-ray absorptiometry; DEXA)를 이용한 골밀도 변화 측정. 대퇴골 및 경골의 칼슘을 제거한 후, 파라핀 블록을 제작 하여 조직학적 관찰 (TRAP stain)

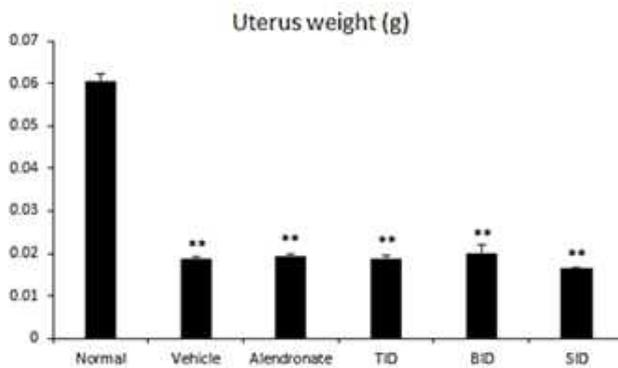


[그림 79] 난소적출 모델 제작 및 난소적출모델 실험 방법

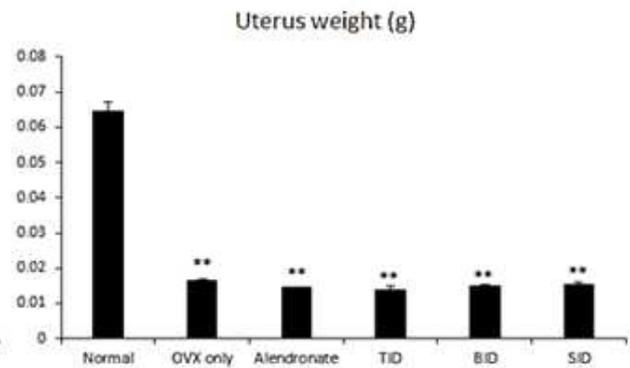
○ 실험결과(1차 실험, 2차 실험)

- 난소무게 측정 - 투여 종료 후, 골다공증 모델제작에 문제가 없음을 확인하기 위하여 자궁의 무게를 측정하였음. 1, 2 차 실험에서 모두 자궁의 무게는 난소적출술을 실시한 그룹에서 모두 유의적으로 감소한 것을 확인하였음 (**p<0.01)

<1차 실험>



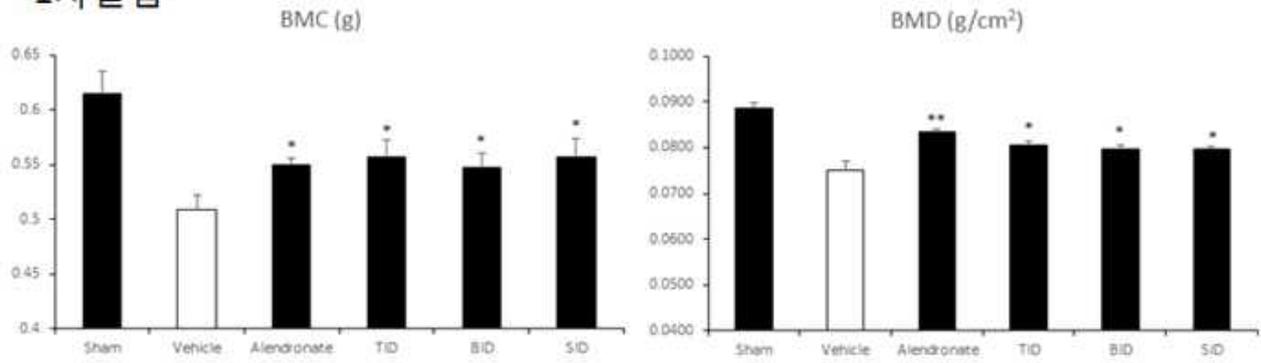
<2차 실험>



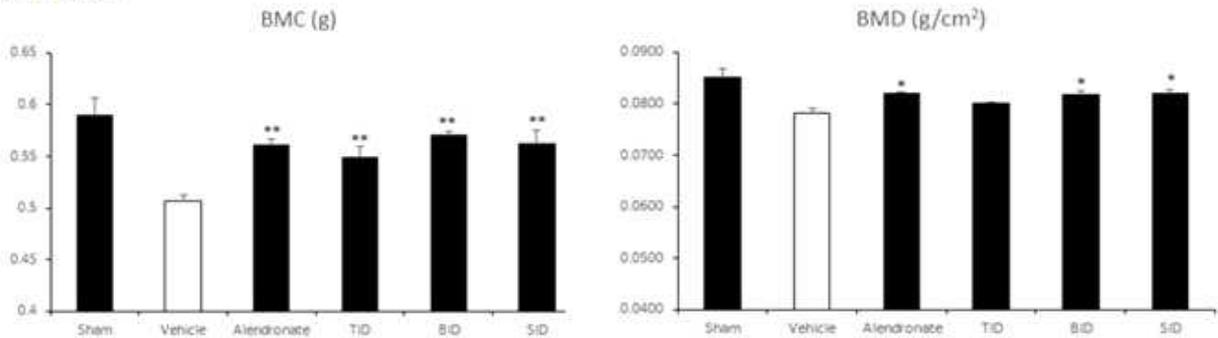
[그림 80] 난소 무게 변화

- DEXA 측정 결과 - 1, 2차 투여실험 종료 후, DEXA측정 기기를 이용하여, 마취한 상태의 마우스에서 골질량 (Bone mass contents, BMC), 골밀도 (Bone mass density, BMD)를 측정하였음. 그 결과, 치료제인 alendronate와 TID, BID, SID그룹에서 BMC, BMD 수치 회복을 보였음 (**p<0.01, *p<0.05)

<1차실험>

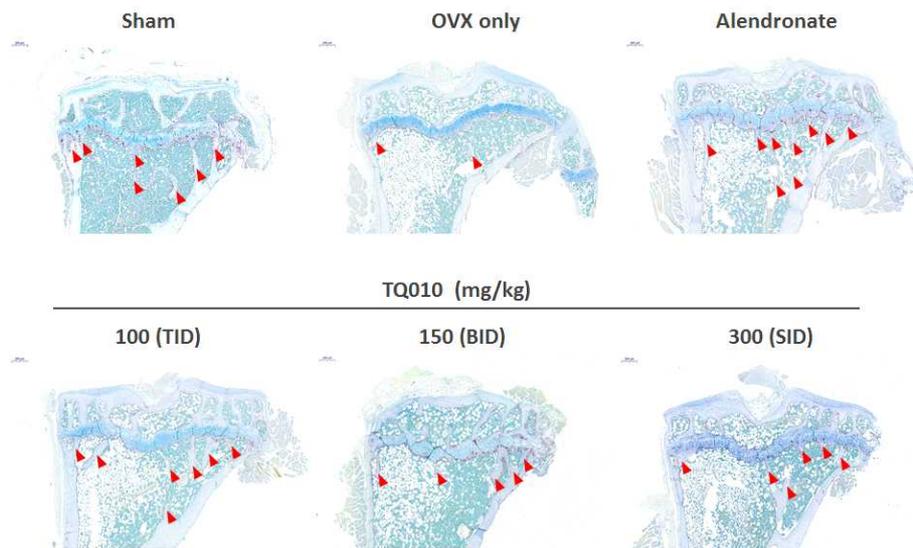


<2차실험>



[그림 81] DEXA 측정 결과

- 조직학적 관찰 결과 - 투여실험 종료 후에 마우스의 경골조직을 이용한 조직학적 관찰을 실시한 결과, OVX그룹에서 감소한 골소주 (Trabecular bone, red arrow head)의 숫자가 alendronate투여 그룹에서 뿐만 아니라, TQ010투여 그룹 모두에서 증가된 것을 관찰 할 수 있었음.



*Red arrow head: trabecular bone

[그림 82] 경골조직의 조직학적 분석

- 본 실험은 임상시료 (TQ10)의 골다공증에 대한 치료효능을 확인하는 실험으로써, 투여횟수에 따른 효능의 차이가 있는지를 검증하였음. 실험 결과, 1차, 2차 실험에서 모두 1일 3, 2, 1회 투여그룹 모두 골다공증 치료효능은 보였으나, 투여 횟수에 따른 유의적인 효능의 차이는 나타나지 않았음.

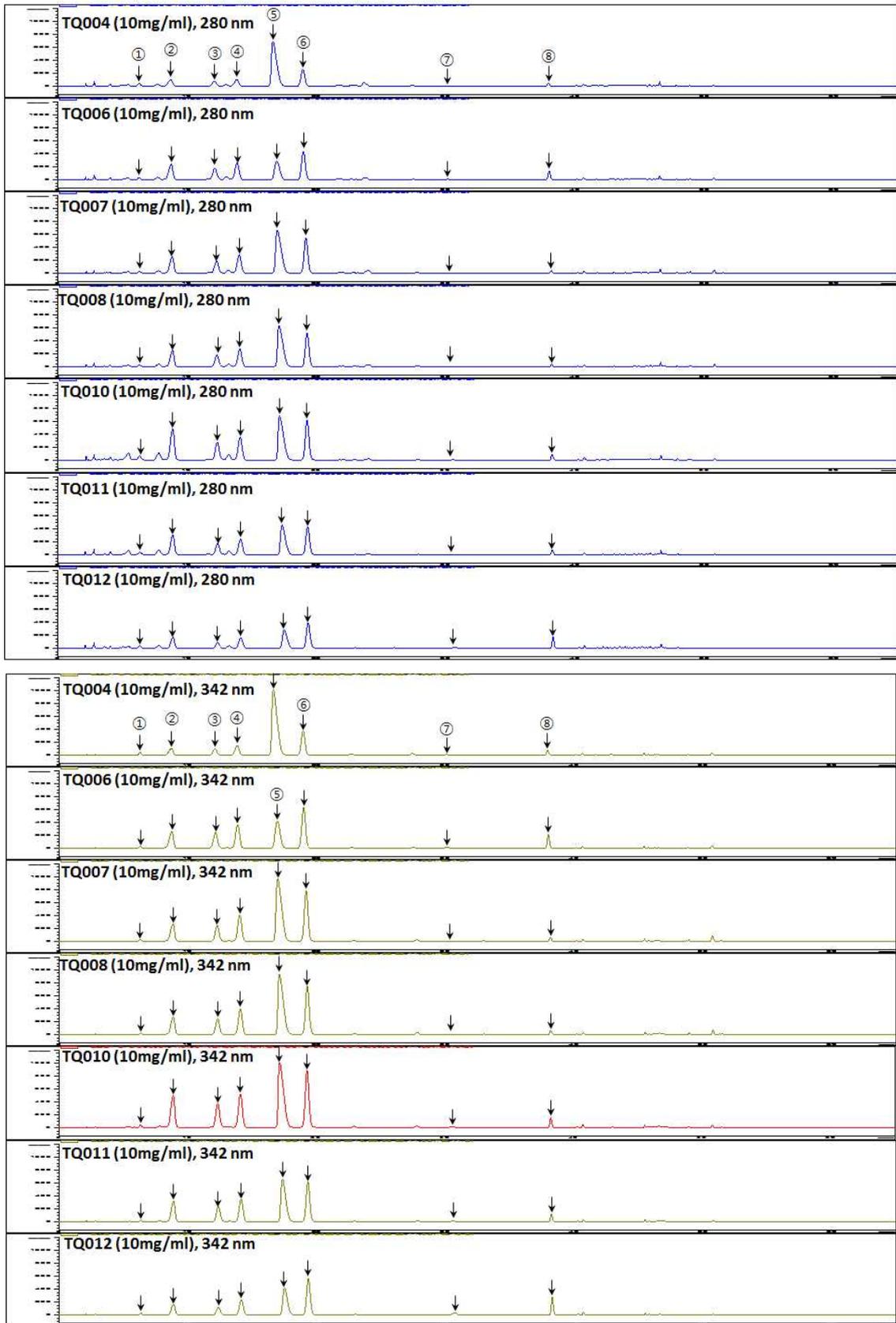
▶ 전임상 및 임상시료에 대한 성분프로파일링 분석

○ 연구방법

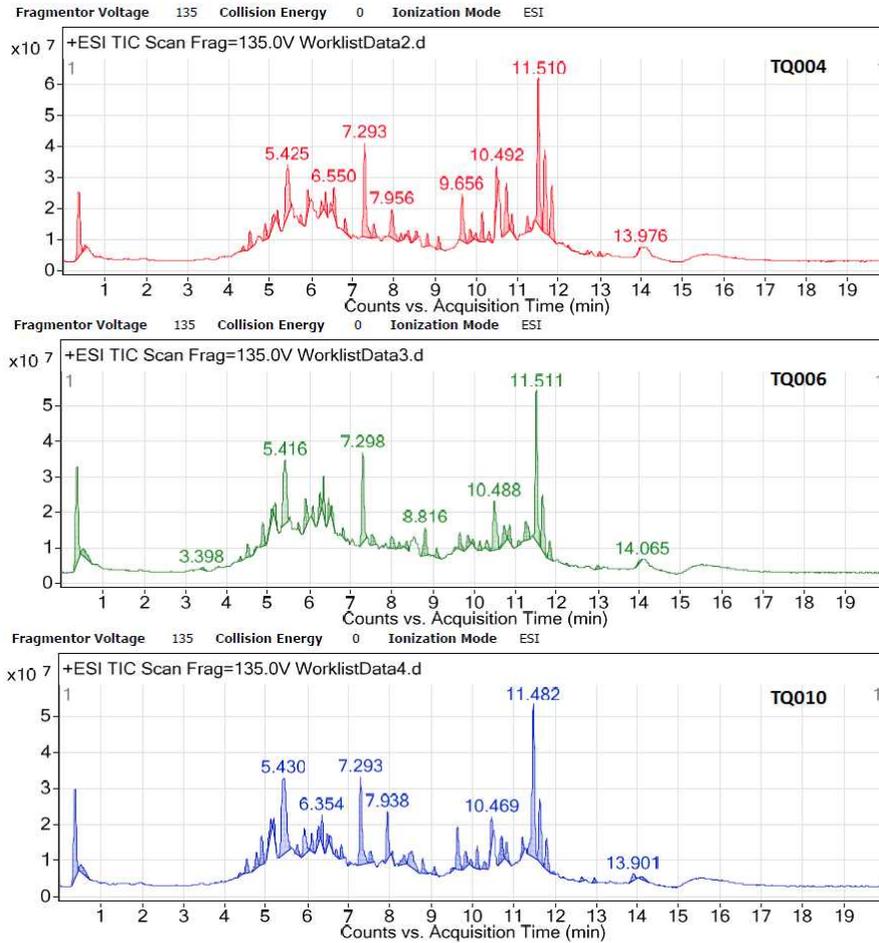
- 재료 및 분석시료 제조
 - 임상 시료 (TQ004, TQ006, TQ007, TQ008, TQ010, TQ011, TQ012) [고형분 : 미결정셀룰로오스 = 1:1 (w/w)]
 - 분석표준시료는 시료 100 mg을 10 mL 메탄올에 넣고 초음파추출 (2 h)을 진행한 후, 상층액 (약 8 mL)만을 취하여 감압 농축하여 사용함.
 - 전체 피크 면적 대비 1% 이상, 30% 미만의 피크 면적을 갖는 전체 피크 분석
- HPLC 분석 조건 및 방법
 - 분석기기 : Agilent 1200 series
 - 컬럼 : Phenomenex gemini C18 (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm)
 - 파장 : 280 nm, 342 nm
 - flow rate : 1 mL/min
 - 이동상 : 0.5% acetic acid in H₂O : MeOH
 - 시료 : 10 mg/mL, 10 μ L injection
- LC-MS 분석 조건 및 방법
 - 분석기기 : Agilent 1200 series (LC), Agilent 6410B instrument (MS)
 - 컬럼 : Phenomenex Kinetex XB-C18 (2.6 μ m, 2.1 mm \times 50 mm)
 - flow rate : 0.5 mL/min
 - 이동상 : water and acetonitrile containing 0.1 % formic acid
 - Ionization : electrospray ionization interface, positive
 - Framenter potential : 110V
 - Interface heater : 300° C

○ 연구결과

- 전임상 및 임상 시료의 성분 프로파일링 분석



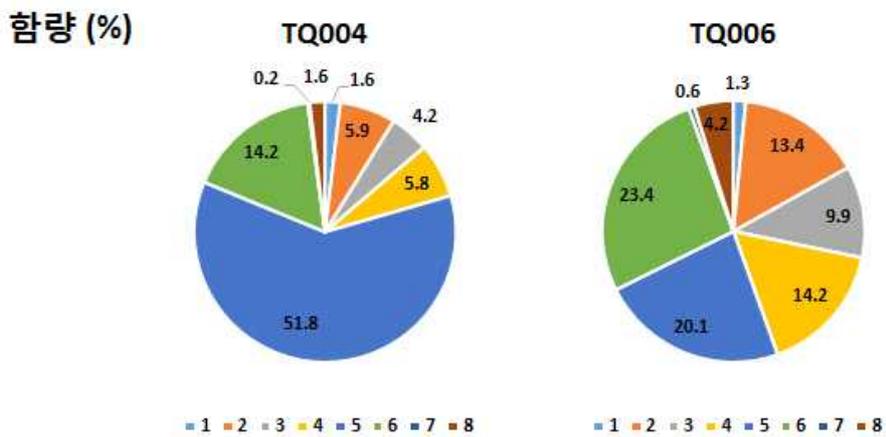
[그림 83] 전입상 및 임상시료(2015~2017)의 HPLC 성분 프로파일링 분석



[그림 84] LC-MS를 분석을 이용한 전임상 및 임상시료의 TIC 크로마토그램

- 1차년도(2015년) 임상시료인 TQ004는 다른 성분들 보다 지표화합물 5번인 rosmarinic acid 함량이 높은 것으로 확인됨. 페놀릭 화합물의 비율은 높고 플라보노이드 화합물의 비율은 낮음. TQ006시료에서부터 차년도 시료와 비교적 유사함.

2015년도 임상 시료

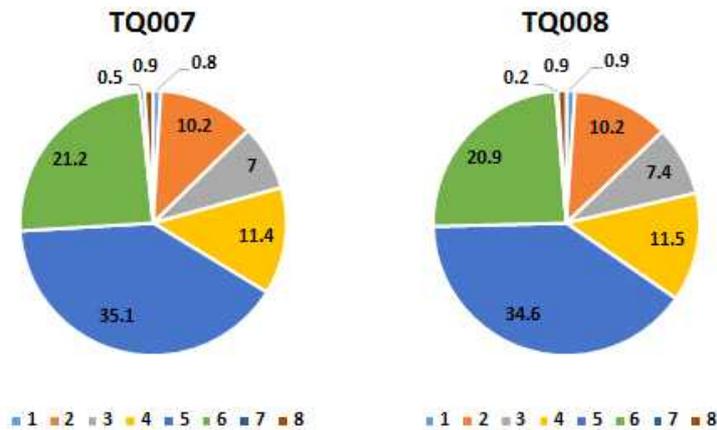


[그림 85] 1차년도 곶보배추 임상시료(2015)의 성분 함량

- 2차년도(2016년) 임상시료인 TQ007과 TQ008는 HPLC 크로마토그램 패턴과 성분함량이 매우 유사함. [성분 함량(%) : ① 0.85 ± 0.05 , ② 10.20 ± 0.01 , ③ 7.20 ± 0.20 , ④ 11.45 ± 0.05 , ⑤ 34.85 ± 0.25 , ⑥ 21.05 ± 0.15 , ⑦ 0.35 ± 0.15 , ⑧ 0.90 ± 0.15]

2016년도 임상 시료

함량 (%)

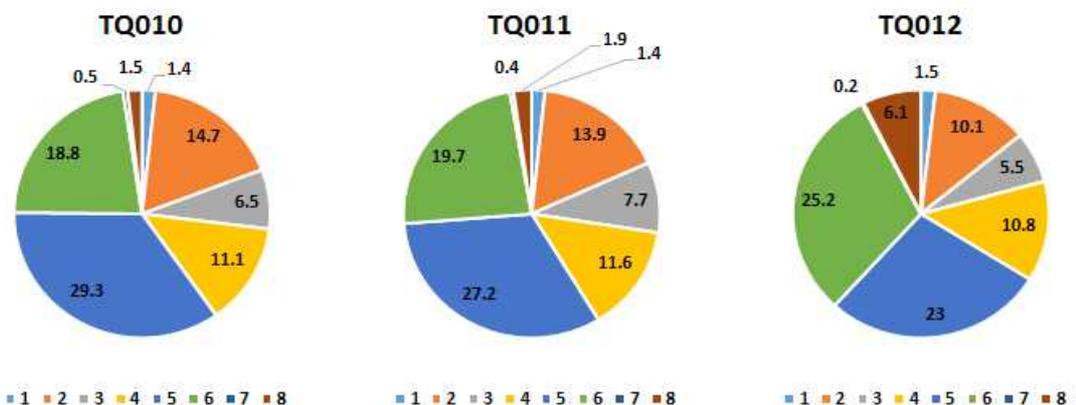


[그림 86] 2차년도 곰보배추 임상시료(2016)의 성분 함량

- 3차년도(2017년) 임상시료 또한 HPLC 크로마토그램 패턴과 성분함량이 유사함. 연차별 임상시료의 분석결과 연차별 기후 조건 및 재배 생육 환경 등의 차이로 인해 각 차년도 시료들의 함량차이를 보였음. 1차년도에는 원물의 공급 등의 제한으로 성분의 함량이 다소 상이하였으나, 2~3차년의 임상시료는 비교적 안정된 함량을 가지는 것으로 확인됨. 하지만 동일 차년도에서도 처음과 후반부 시료가 성분의 차이가 보여짐에 따라 추후 임상시료 제조시 원물의 채집시기 또한 고려해야 할 것으로 사료됨. [성분 함량(%) : ① 1.43 ± 0.03 , ② 12.90 ± 1.42 , ③ 6.57 ± 0.64 , ④ 11.17 ± 0.23 , ⑤ 26.50 ± 1.85 , ⑥ 21.23 ± 2.00 , ⑦ 0.37 ± 0.09 , ⑧ 3.17 ± 1.47]

2017년도 임상 시료

함량 (%)

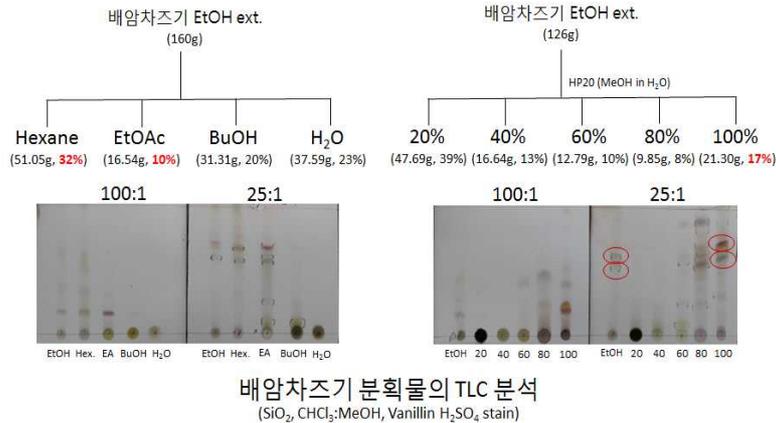


[그림 87] 3차년도 곰보배추 임상시료(2017)의 성분 함량

7. 곰보배추 원물에 독성 및 활성 검증

▶ 곰보배추 활성분획물의 제조

- 전남 장흥 매화농장으로부터 생산된 곰보배추 원물 3 kg를 95% 에탄올 (30 L)에서 추출하여 약 286 g의 에탄올 추출물을 수득.
- 추출물은 유기용매 극성도 및 HP20 컬럼크로마토그래피를 이용하여 활성분획물을 제조하였으며, 수율은 아래와 같음.



[그림 88] 곰보배추 에탄올추출물의 활성분획물 제조

▶ 곰보배추 분획물의 파골세포 분화억제능의 검증

○ 실험재료 및 방법

- 마우스 : 3~5주령 ICR 마우스
- alpha MEM medium, recombinant hM-CSF, recombinant hRANKL
- bone marrow로부터 파골세포 분화

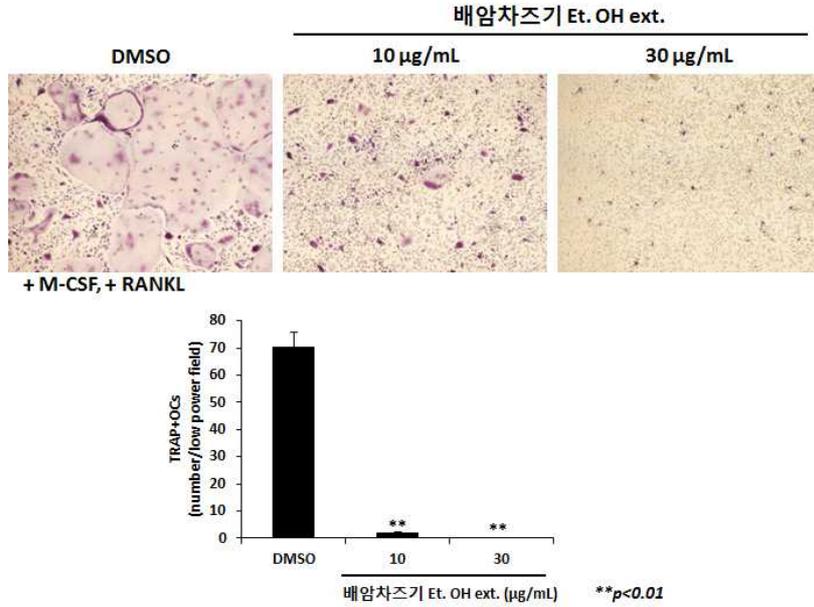
가. 마우스로부터 골수를 채취 후 M-CSF를 첨가하여 3일간 배양

나. 배양한 세포를 회수하여 48 well culture dish에 3×10^4 cells/well을 seeding한 후, M-CSF, RANKL을 첨가하고, 곰보배추 분획물 시료를 각각의 농도로 처리함

다. 5일간 파골세포 분화 후, 분화된 osteoclast를 TRAP staining 하여 확인함

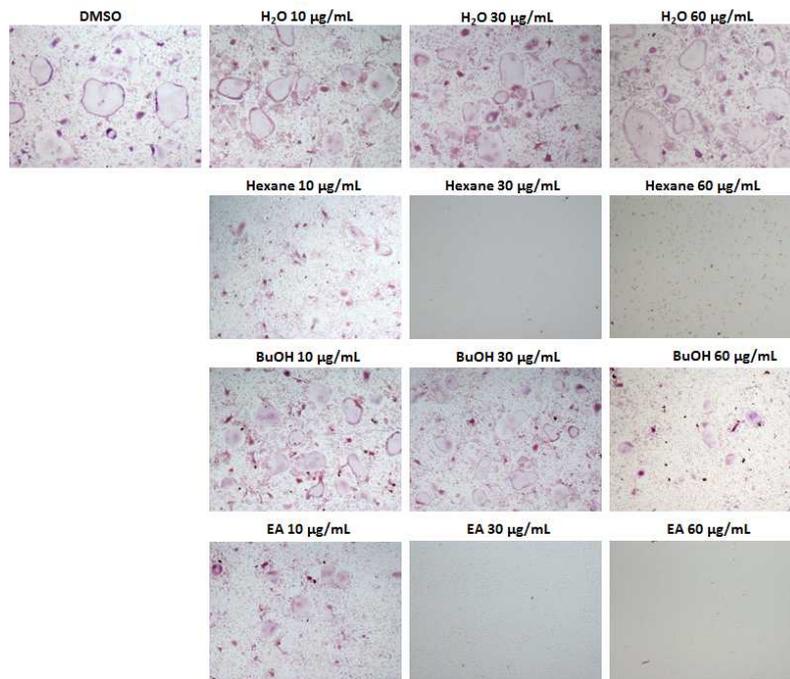
○ 결과

라. 곰보배추 에탄올 추출물 처리 (0, 10, 30 μ g/mL)에 따라 효과적으로 파골세포 분화가 억제되었음을 다시 한 번 확인되었음



[그림 89] 곰보배추 에탄올 추출물의 파골세포분화억제효과

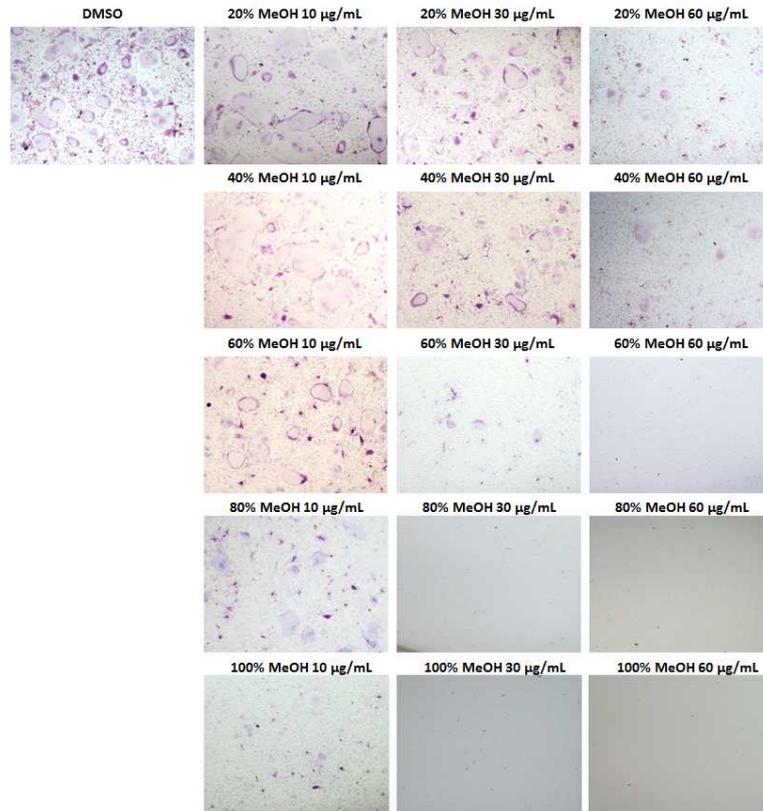
- 곰보배추의 물추출물 (H₂O) 및 부탄올 (BuOH) 추출물처리 세포에서는 파골세포 분화 억제효능이 관찰되지 않았음
- 헥산추출물 (Hexane) 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 경우, 우수한 분화 억제효능을 보였으나 30, 60 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포독성이 관찰되었으며, EA 추출물 10, 30 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 우수한 분화 억제효능을 보였으나 60 $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포독성을 보였음



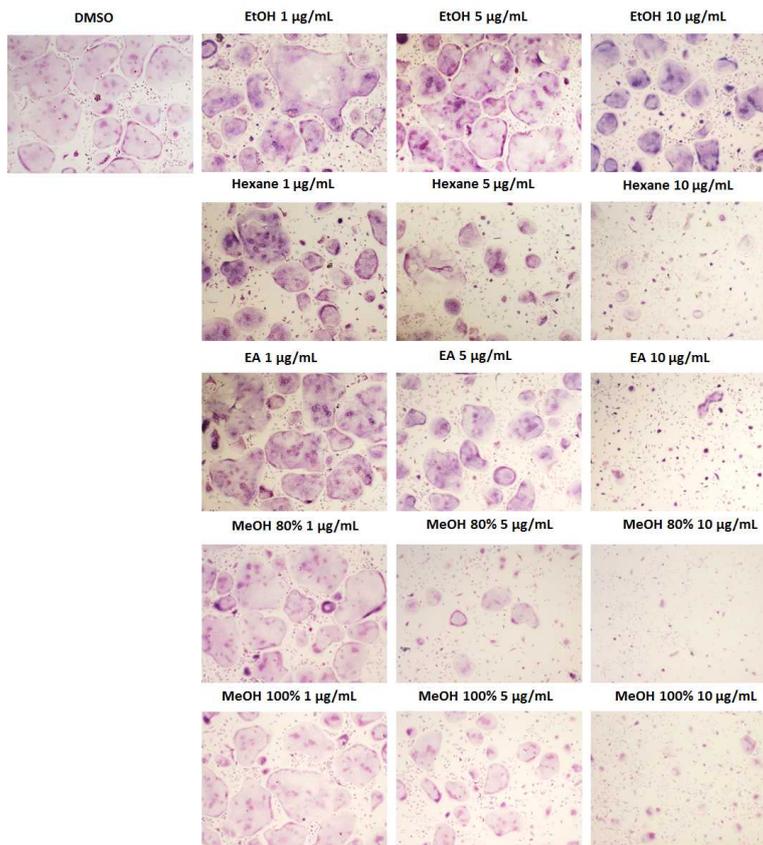
[그림 90] 곰보배추 용매 분획물의 파골세포분화억제효과

- 20%, 40% 메탄올 분획물 (MeOH) 처리시에는 약한 파골세포 분화 억제효능이 보였음. 60%, 80%, 100% 메탄올 분획물에서는 우수한 파골세포 분화 억제효능을 보였으나 고농도에서는 현미경 관찰시 부착된 세포들이 바닥에서 떨어지는 세포독성을 보였음.

- 80%, 100% 메탄올 분획물에 대하여 독성이 나타나지 않는 10 ug/mL이하의 농도에서 재실험을 실시한 결과 5 ug/mL 농도에서도 파골세포 분화 활성을 확인하였음



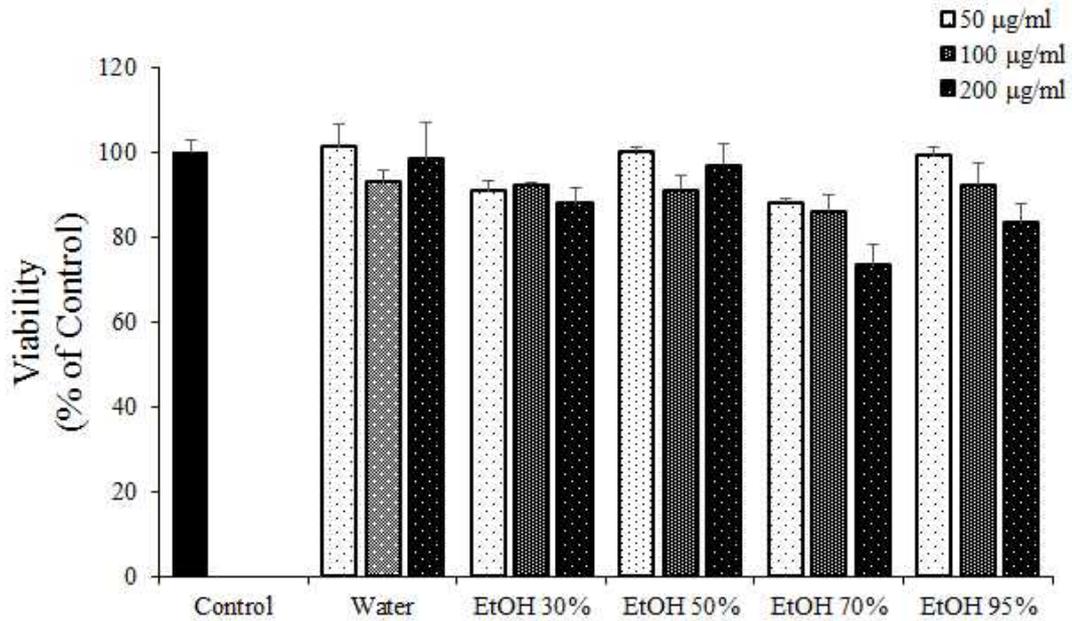
[그림 91] 곰보배추 에탄올 추출물 HP-20 컬럼크로마토그래피 분획물의 파골세포분화억제효과(1차)



[그림 92] 곰보배추 에탄올 추출물 HP-20 컬럼크로마토그래피 분획물의 파골세포분화억제효과(2차)

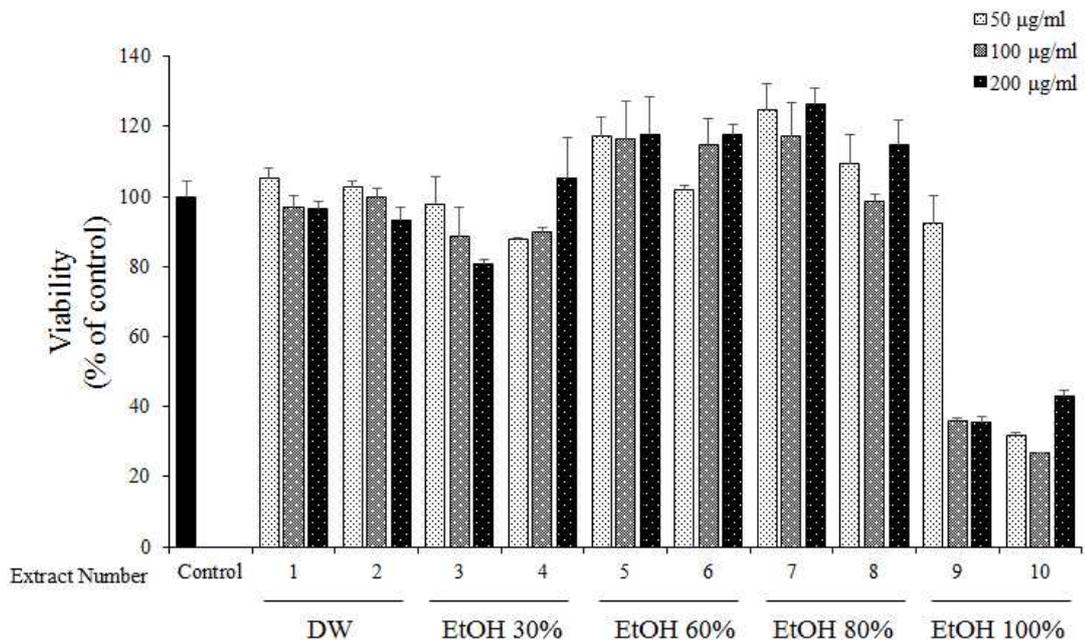
▶ 곱보배추 분획물의 세포 독성 및 활성 검증

- 곱보배추 원물을 95% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30% EtOH, 100% H₂O 을 추출 용매로 추출한 후, 각 추출물에 대하여 간세포인 Hep3B normal 세포에서 독성을 확인하였음. 70% EtOH 추출물 200 μ g/mL 농도에서 독성을 나타냈으며, 다른 분획들은 독성을 나타내지 않았음.



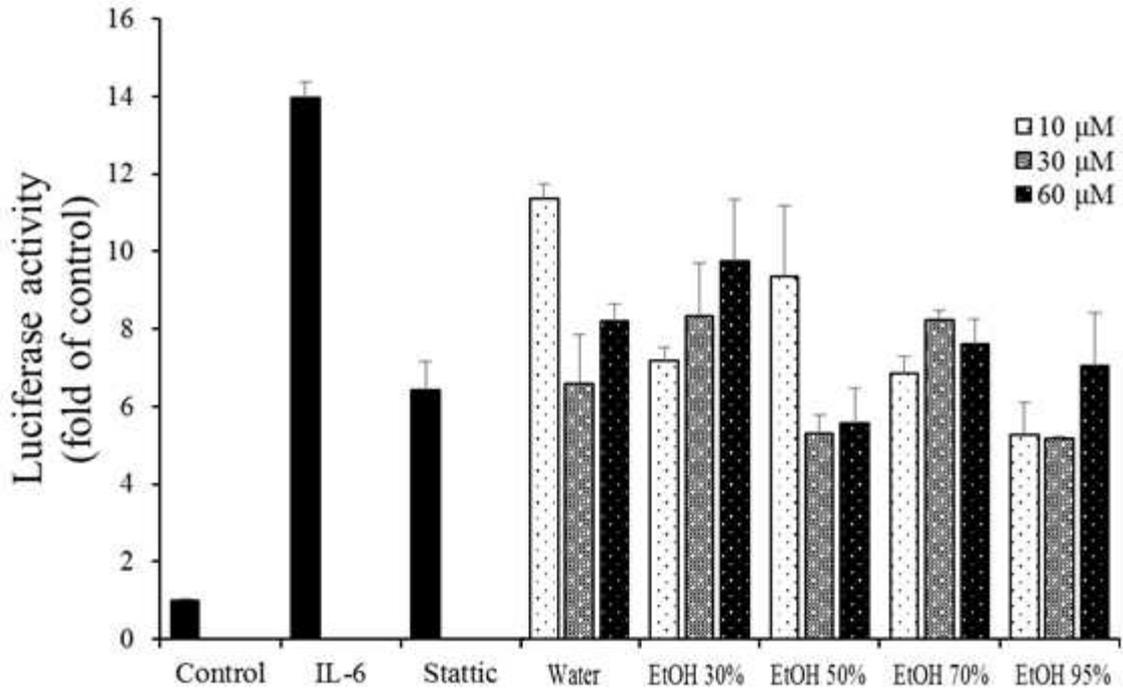
[그림 93] 곱보배추 에탄올 추출물의 세포독성

- 또한, 95% EtOH 추출물을 물로 희석한 후 HP20 컬럼크로마토그래피를 실시하였으며, 각각의 분획물에 대하여 Hep3B normal 세포에서 독성을 확인하였음. 100% EtOH 분획물에서 독성을 나타내는 것을 확인하였으며, 이로부터 곱보배추 95% EtOH 추출물에서 독성을 나타내는 부분은 비극성부분임을 확인하였음.



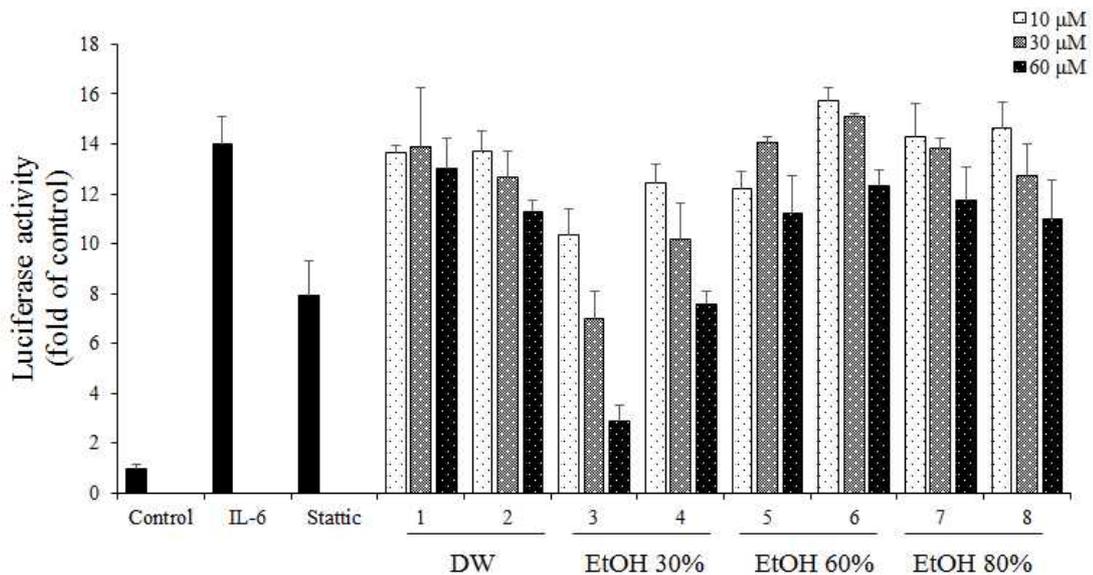
[그림 94] 곱보배추 95%에탄올 추출물 HP-20 컬럼크로마토그래피 분획물의 세포독성

- 95% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30% EtOH, 100% H₂O에 대한 IL-6/STAT3 루시퍼라제 저해활성을 측정된 결과, 95%, 70% 및 50% EtOH 추출물에서 저해활성을 나타내는 것을 확인하였음.



[그림 95] 곰보배추 에탄올 추출물에 대한 IL-6/STAT3 저해활성

- 95% EtOH 추출물을 물로 희석한 후 HP20 컬럼크로마토그래피 분획물에 대한 IL-6/STAT3 루시퍼라제 저해활성을 측정된 결과, 30% EtOH 분획물에서 저해활성이 우수한 것을 확인하였음.



[그림 96] 곰보배추 95%에탄올 추출물 HP-20 컬럼크로마토그래피 분획물에 대한 IL-6/STAT3 저해활성

<제1협동 고려제약주식회사>

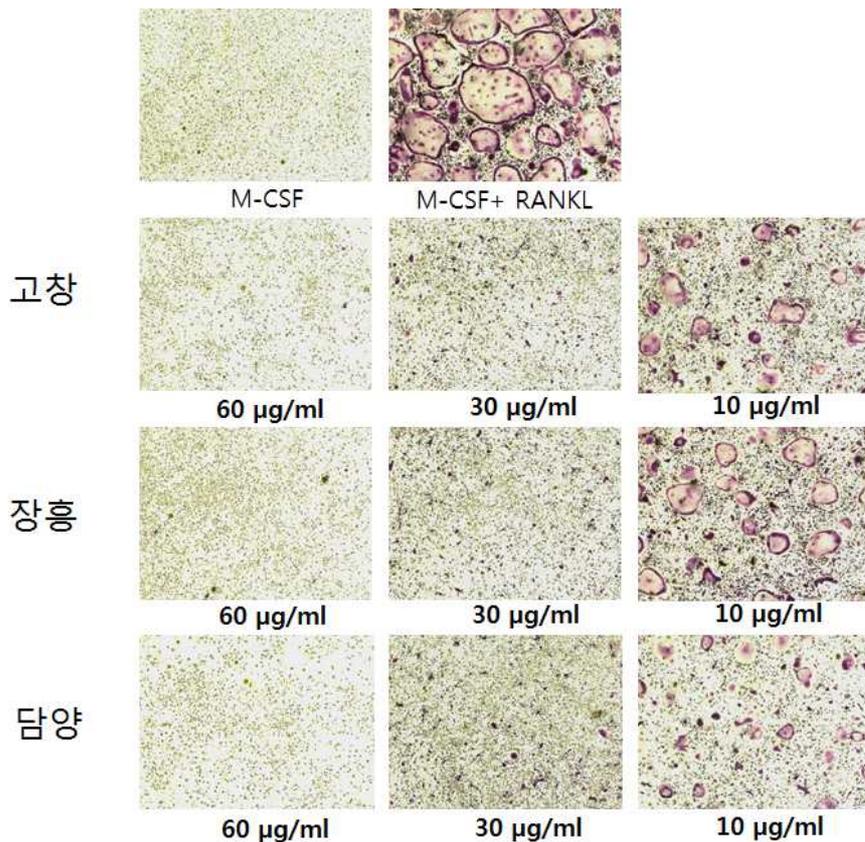
1. 효력시험

1) 산지별 곶보배추의 IL-6/STAT3 활성화와 파골세포 분화 억제 효능 검증

- 곶보배추의 산지별 생리활성의 변화를 관찰하기 위해 국내의 대표적 곶보배추 재배 농장 3곳 (고창, 장흥, 담양)의 샘플을 구매하여 IL-6/STAT3 활성화와 파골세포 분화 억제 효능을 재검증하였음. 일반적으로 농산물 재배가 동일한 장소에서 수년간 지속되기 어려운 점이 있으므로, 산지별 생리활성 평가가 중요함. 실험 결과, IL-6/STAT3 활성화와 파골세포 분화 억제 효과가 기준 이상으로 확인되었음.

[표 19] 산지별 곶보배추의 IL-6/STAT3 활성화 억제 효과

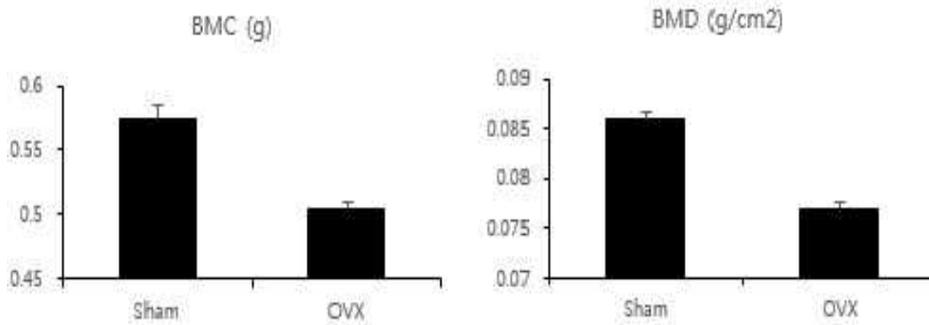
산지	농도 (µg/ml)	Inhibition (%)	Viability (%)
고창	10	88.7	102.4
	30	103.0	105.6
	60	106.2	106.2
장흥	10	79.9	95.1
	30	97.7	95.5
	60	103.0	90.1
담양	10	94.7	92.6
	30	107.0	89.0
	60	109.3	88.1



[그림 97] 산지별 곶보배추의 파골세포 분화 억제 효과

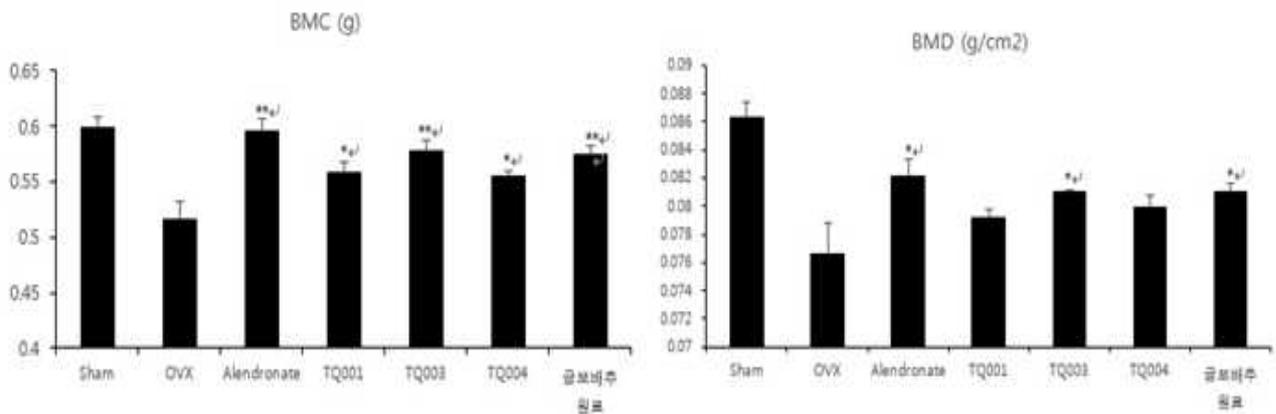
2) 난소적출 골다공증 마우스 모델에서 곰보배추 원료 및 원료 의약품의 효능검증 완료

- 난소적출 골다공증 마우스 모델 제작
 - 7주령 암컷 C57BL/6마우스에서 난소적출술을 실시 한 후, 6주간 칼슘이 제거된 특수제작 사료를 급여한 후, 골다공증이 유발되었음을 dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA)를 통해 확인하였음.



[그림 98] DEXA를 이용한 난소적출술에 의한 골다공증 마우스 모델의 골밀도 저하 측정

- 난소적출 골다공증 마우스 모델을 이용한 곰보배추 원료 및 원료의약품의 치료효능 평가
 - 난소적출술 이후 6주간 칼슘제거 특수사료 급여로 유발된 골다공증 마우스 모델에서, 매일 1회, 6주간 vehicle (0.5% CMC), 치료제 (Alendronate 2 mg/kg), 곰보배추 원료 (500 mg/kg), 원료 의약품 TQ001, TQ003, TQ005 (각각 500 mg/kg)를 경구투여 후, 전신 마취를 통한 DEXA 분석을 실시하였음. 그 결과, 난소적출술 및 칼슘제거 사료 급여로 유발된 골밀도 (bone mineral density, BMD) 및 골 질량 (bone mineral contents, BMC)가 골다공증 치료제로 사용되고 있는 Alendronate 투여군에서 증가되고 있으며, 곰보배추 원료 및 원료의약품 투여군에서도 치료효능이 유의적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었음 ($p < 0.05$, $p^{**} < 0.01$).



[그림 99] DEXA 분석을 통한 곰보배추 원료의약품의 골다공증 치료효능 평가

2. 기준 및 시험법 설정

1) 원료의약품 기준 및 시험법 완료

<시험 방법>

- 배암 차즈기 [*Salvia plebeia* R. Br. (꿀풀과 Labiatae)]의 뿌리를 제외한 지상부를 물로 깨끗이 씻은 후 건조한 건생약 30kg을 세절하고 질량대비 10배의 에탄올을 가하여 교반하면서 5시간이상 환류 추출하고(70~75°C), 10 μm 여과지로 여과한 후 여액을 합하고 에탄올을 감압농축(60°C, 700mmHg 이하)하여 70%의 고형분이 형성 되었을 때 미결정셀룰로오스를 70% 고형분 무게 대비 1:1로 하여 약 3.0kg의 건조엑스를 얻음.
- 이 약은 정량할 때 올레아놀릭산(Oleanolic acid, C₃₀H₄₈O₃:456.70) 0.176%와 우르솔릭산(Ursolic acid, C₃₀H₄₈O₃:456.70) 0.309% 이상을 함유함.
- 확인시험

① 박층크로마토그래프법

- 검 액 : 이 약 약 300mg을 달아 메탄올 10mL를 가하여 완전히 녹인 후 0.45 μm 멤브 레인 필터로 여과하여 검액으로 함.
- 표준액 : 올레아놀릭산표준품 2.5mg 및 우르솔릭산표준품 10mg을 정밀하게 달아 메탄올 10mL를 넣어 녹이고 0.45 μm 멤브레인필터로 여과하여 표준액으로 함.
- 흡착제 : 실리카겔 60F₂₅₄
- 전개용매 : 석유에테르 · 에틸아세테이트 · 아세톤(8.2:1.8:0.2)
- 점적량 : 6 μL
- 전 개 : 약 6cm
- 발색제 : 바닐린-황산시액* 바닐린-황산시액의 조제 : 5% 에탄올성황산용액 · 1% 에탄올성바닐린(1:1)
- 조작법
가. TLC 플레이트에 검액과 표준액을 점적.
나. 요오드 용액(요오드 결정을 클로로포름에 1mg/mL의 농도로 완전히 녹여서 조제)을 전개용 챔버에 약 1cm의 높이로 채우고 45°C 수욕상에 방치.
다. 검액과 표준액이 점적된 TLC 플레이트를 요오드 용액이 담겨있는 챔버에서 점적된 지점 위로 약 2cm정도 올라가도록 전개.
라. 전개된 TLC 플레이트를 꺼내어 차광하고 40~50°C(수욕)에서 30분간 방치.
마. TLC 플레이트를 전개용매에서 약 6cm 전개 후, 발색제를 뿌리고 220~240°C에서 3분간 가열.

② 액체크로마토그래프법

- 이 약을 가지고 다음의 정량법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 피크유지시간 나타냄.

• 순도시험

① 중금속 30ppm이하

- 이 약 약 1g을 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 중금속 시험법 제3법에 따라 시험. 비교액에는 납표준액 3.0mL를 넣음.
- 건조감량 : 5.2% 이하 (2g)
 - 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 건조감량 항에 따라 시 시험할 때 적합하여야함.
- 회 분 : 7.1% 이하 (2g)
 - 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 회분 항에 따라 시험할 때 적합하여야함.
- 산불용성 회분
 - 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법 의 산불용성회분 항에 따라 시험할 때 적합하여야함.

(실측치가 1% 미만일 경우 생략 가능)

• 함량 정량법

- 올레아놀릭산(0.176% 이상), 우르솔릭산(0.309% 이상) : 실측치로 기준설정

① 검액 : 이 약 약 500mg을 정밀하게 달아 50mL 용량플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹이고 (초음파 용해) 표선함. 이 액을 0.45 μm PTFE 필터로 여과하여 검액으로 함.

② 표준액 : 올레아놀릭산표준품 약 17.6mg 및 우르솔릭산표준품 약 30.6mg을 정밀하게 달아 100mL 용량플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹이고(초음파 용해) 표선함. 이 액 10mL를 정확하게 취하여 100mL 용량플라스크에 넣어 표선하고 0.45 μm PTFE 필터로 여과하여 표준액으로 함.

③ 시스템적합성 : 표준액을 6회 반복 주입할 때 피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하, 올레아놀릭산과 우르솔릭산의 분리도는 1.5 이상이어야 함.

④ 기기조건

- 칼럼 : 안지름 4.6mm, 길이 25cm의 스테인레스강관에 5μm의 액체크로마토그래프용 옥타데실실릴실리카겔을 충전한 칼럼

- 이동상 : 세토니트릴 · 물

- 주입량 : 10 μL

- 유속 : 1.0mL/min

- 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장: 210nm)

- 온도 : 칼럼 30℃

[표 20] HPLC 분석용 solvent gradient 조건

min	아세토니트릴	물
0.0	71.0	29.0
30.0	76.0	24.0
32.0	100.0	0.0
42.0	100.0	0.0
44.0	71.0	29.0
55.0	71.0	29.0

⑤ 계산

올레아놀릭산(C₃₀H₄₈O₃) 함량(%)

$$=(A_T/A_S) \times (W_S/W_T) \times (50/1000) \times P$$

A_S:표준액 중 올레아놀릭산의 피크면적

A_T:검액 중 올레아놀릭산의 피크면적

W_S:올레아놀릭산 표준품 채취량(mg)

W_T:검체채취량(mg)

P : 올레아놀릭산의 표준품 순도(%)

우르솔릭산(C₃₀H₄₈O₃) 함량(%)

$$=(A_T/A_S) \times (W_S/W_T) \times (50/1000) \times P$$

A_S:표준액 중 우르솔릭산의 피크면적

A_T:검액 중 우르솔릭산의 피크면적

W_S:우르솔릭산 표준품 채취량(mg)

W_T:검체채취량(mg)

P : 우르솔릭산의 표준품 순도(%)

- 미생물한도시험
 - 이 약을 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 미생물한도시험법에 따라 시험할 때 적합하여야 함.
- 잔류농약시험
 - 이 약을 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 잔류농약시험법에 따라 시험할 때 적합하여야함.
- 보관조건
 - 실온(1~30° C)보관, 차광밀폐용기
- 원생약 함량 기준 설정 근거
 - 실 제조한 곱보배추95%에탄올건조엑스(10→1) 3 batch(TP001, TP002, TP003)의 시험결과에 의하여 기준을 설정하였음.

① 건조감량 : 3.6% 이하

[표 21] 건조감량 측정

구분	TP001	TP002	TP003	설정근거
실측치	3.3%	3.0%	2.8%	실측치의 평균값(3.0%)의 120% 이하

② 회분 : 7.1% 이하

[표 22] 회분 측정

구분	TP001	TP002	TP003	설정근거
실측치	2.8%	5.9%	3.0%	실측치의 최대값(5.9%)의 120% 이하

③ 함량 : 이 약을 정량할 때 올레아놀릭산(Oleanolic acid, C₃₀H₄₈O₃ : 456.70) 0.176% 이상, 우르솔릭산 (Ursolic acid, C₃₀H₄₈O₃ : 456.70) 0.309% 이상 함유.

[표 23] 함량 측정

구분	TP001	TP002	TP003	설정근거	
실측치	OA	0.193	0.194	0.198	실측치의 평균값(OA 0.195%, UA 0.343%)의 90% 이상
	UA	0.342	0.343	0.344	

2) 완제 기준 및 시험법 완료

<시험방법>

- 성상
 - 이 약의 색상 및 모양을 확인.
 - 이 약의 낱알표시여부를 확인.
 - 이물 여부를 확인.
- 확인시험
 - ① 검액 : 이 약 20정 이상을 취하여 고운 가루로 하여 곱보배추95%에탄올건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스혼합물(1:1)로서 약 300mg 해당량을 정밀하게 달아 메탄올 10mL를 넣어 녹이고 0.45 μm PTFE 필터로 여과하여 검액으로 함.
 - ② 표준액 : 올레아놀릭산 표준품 약 2.5mg 및 우르솔릭산 표준품 약 10mg을 정밀하게 달아 메탄

을 10mL를 넣어 녹이고 0.45 μ m PTFE (Polytetrafluoroethylene) 필터로 여과하여 표준액으로 함.

③ 조작 : 알루미늄 또는 유리 TLC 플레이트에 검액과 표준액을 점적함. 요오드 용액(요오드 결정 을 클로로포름에 1mg/mL의 농도로 완전히 녹여서 조제)을 전개용 챔버에 약 1cm의 높이로 채우고 45°C 수욕상에 방치함. 검액과 표준액이 점적된 TLC 플레이트를 요오드 용액이 담겨있는 챔버에서 점적된 지점 위로 2cm가 더 올라가도록 전개함. TLC 플레이트를 꺼내어 차광하여 40~50°C에서 30분간 방치함. TLC 플레이트를 전개용매가 들어 있는 챔버에 다시 넣어 6cm 전개시킨 후, 발색제를 뿌리고 220~240°C에서 3분간 가열 함. 검액의 주반점은 표준액의 주반점과 동일한 R_f 값 및 색상을 나타내야 함.

④ 분석조건

- 흡착제 : 실리카겔 60F₂₅₄
- 전개용매 : 석유에테르 · 에틸아세테이트 · 아세톤 (8.2 : 1.8 : 0.2)
- 점적량 : 6 μ L
- 발색제 : 바닐린 · 황산시액
(5% 황산에탄올용액 및 1% 바닐린에탄올용액을 1:1의 비율로 섞어 사용)

• 함량시험

① 검액 : 이 약 20정 이상을 취하여 평균질량을 구하고 고운 가루로 하여 곱배추95%에탄올건 조엑스(10→1) · 미결정셀룰로오스혼합물(1:1)로서 약 500mg 해당량을 정밀하게 달아 50mL 용량플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹이고 표선함. 이 액을 0.45 μ m PTFE 필터로 여과하여 검액으로 함.

② 표준액 : 올레아놀릭산 표준품 약 15.8mg 및 우르솔릭산 표준품 약 27.8mg을 정밀하게 달아 100mL 용량플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹이고 표선함. 이 액 10mL를 정확하게 취하여 100mL 용량플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 표선하고 0.45 μ m PTFE 필터로 여과하여 표준액으로 함.

③ 조작 : 표준액 및 검액을 가지고 다음 조건에 따라 대한민국약전 일반시험법 중 액체크로마토 그래프법에 따라 시험함.

④ 시스템적합성 : 표준액을 6회 반복 주입할 때 피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하, 올레아놀릭산 및 우르솔릭산의 분리도는 1.5 이상이어야 함.

⑤ HPLC조건

- 검출기 : 자외부흡광광도계(파장 210nm)
- 칼 럼 : 안지름 4.6mm, 길이 25cm의 스테인레스강관에 5 μ m의 액체크로마토그래프용 옥타데 실실릴실리카겔을 충전한 칼럼
- 이동상 : 아세토니트릴 · 물

[표 24] 이동상 조건

분	아세토니트릴	물
0.0	71.0	29.0
30.0	76.0	24.0
32.0	100.0	0.0
42.0	100.0	0.0
44.0	71.0	29.0
55.0	71.0	29.0

- 유 속 : 1.0mL/분
- 오븐온도 : 30°C
- 주입량 : 10 μL
- 계 산

A_S : 표준액 중 올레아놀릭산의 피크면적
 A_T : 검액 중 올레아놀릭산의 피크면적
 W_S : 올레아놀릭산 표준품 채취량(mg)
 W_T : 검체 채취량(mg)
 M : 검체의 평균질량(mg)
 P : 올레아놀릭산 표준품의 순도(%)

$$\text{올레아놀릭산(C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{)의 함량(mg)} = \frac{A_T}{A_S} \times \frac{W_S}{W_T} \times \frac{M}{20} \times \frac{P}{100}$$

A_S : 표준액 중 우르솔릭산의 피크면적
 A_T : 검액 중 우르솔릭산의 피크면적
 W_S : 우르솔릭산 표준품 채취량(mg)
 W_T : 검체 채취량(mg)
 M : 검체의 평균질량(mg)
 P : 우르솔릭산 표준품의 순도(%)

$$\text{우르솔릭산(C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2\text{)의 함량(mg)} = \frac{A_T}{A_S} \times \frac{W_S}{W_T} \times \frac{M}{20} \times \frac{P}{100}$$

- 봉해시험 : 대한민국약전 일반시험법 중 봉해시험법에 따라 시험.
 - 순도시험 : 이 약을 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법 순도시험항에 따라 시험.
 - 제제균일성시험 : 대한민국약전 일반시험법의 제제균일성시험법 중 질량편차시험법에 따라 시험.
 - 미생물한도시험 : 이 약을 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 미생물한도시험법에 따라 시험.
 - 잔류용매시험
- ① 내부표준액 : THF (Tetrahydrofuran) 120.0mg을 정밀히 달아 DMF(Dimethylformamide)를 넣어 50mL로 한 후 이 액 5mL를 정확히 취하고 DMF를 넣어 50mL로 함.
 - ② 표준액 : 에탄올 표준품 600mg을 정밀히 취하여 DMF를 넣어 50mL로 함. 이 용액을 5mL 정확히 취하고 DMF를 넣어 100mL로 한 후 다시 이 액 10mL 및 내부표준액 10mL에 DMF을 넣어 100mL로 함.
 - ③ 검액 : 이 약 1일 최대복용량을 취하여 내부표준액 10mL 넣고 DMF를 넣어 100mL로 함.
 - ④ 시스템적합성 : 표준액을 6회 반복주입할 때 “피크면적의 상대표준편차는 20.0% 이하”, “이론단수는 1,000 이상, 분리도는 2.0 이상” 이어야 함.
 - ⑤ 조작 : 검액 및 표준액을 각각 5mL씩을 취하여 20mL Headspace용 바이알에 넣고 밀봉하여 아래의 분석조건으로 시험함.
 - ⑥ 분석조건
 - 칼럼 : DB-624 ((6% Cyanopropylphenyl) 94% Methyl polysiloxane) 0.53mm×30m capillary column (Film thickness : 3 μm)
 - Head space sampler 조건
 - 평형온도 : 85°C
 - Loop온도 : 95°C
 - 이동라인온도 : 110°C
 - 평형시간 : 30min

- 온도 : 주입구 150°C, 칼럼 55°C(6min hold) to 140°C(at 10°C/min), 검출기 210°C
- 주입량 : 1mL
- Split ratio : 20:1
- Split flow : 110mL/min
- Total flow : 118mL/min
- 검출기 : 불꽃이온화검출기
- 캐리어 : 질소

⑦ 계산

잔류용매(mg/day) =

Ps : 표준액 중 각 용매의 피크 면적

Pt : 검액 중 각 용매의 피크 면적

Is : 표준액 중 THF의 피크 면적

It : 검액 중 THF의 피크 면적

$\frac{P_t}{P_s}$	$\times 100mL$	$\times \frac{\text{표준액농도}(mg/mL) \times \text{1일 최대복용량}(g/day)}{\text{검체체취량}(mg)/\text{1정 평균질량}(mg/정)}$
-------------------	----------------	--

- 미생물한도시험
 - 생약추출물을 함유하는 제제이므로 대한민국약전 미생물한도시험법 중 한천평판표면도말법으로 시험을 실시하였음.
- 미생물한도시험
 - 시험을 실시한 결과 총호기성세균, 총진균 및 특정미생물 모두 균이 검출되지 않았음.



[그림 100] 미생물한도시험 결과

- 기밀도
 - ① PTP포장(케이스, 알루미늄백)
 - 이 약 5판을 가지고 300mmHg 이하로 감압하여 1분간 메칠렌블루용액을 침투시켰을 때 내부로 메칠렌블루용액이 침투되지 않아야 함.
 - ② 병포장
 - 이 약 1병을 가지고 0.5% 메칠렌블루용액에 5분간 침적시켰을 때 병 내부로 메칠렌블루용액이 침투되지 않아야 함.
- 표기사항 : 제조번호, 사용(유효)기간을 확인.

[표 25] 완제의약품 기준설정

시험항목		시험기준	비고
형상		적갈색의 장방형 필름코팅정제	
확인시험	올레아놀릭산	양성	TLC
	우르솔릭산	양성	
함량시험	올레아놀릭산	0.95mg/정 이상	HPLC
	우르솔릭산	1.67mg/정 이상	
붕해시험		60분 이내/물	KP
순도시험	중금속	30ppm 이하	KP
	납	5ppm 이하	
	비소	3ppm 이하	
제제균일성시험	질량편차시험	평균질량 $\pm 5\%$ 이하	KP
미생물한도시험	총호기성세균수	100Q/g 이하	KP
	총진균수	100/g 이하	
	특정미생물	불검출	
잔류용매시험	에탄올	50mg/day 이하	GC, 자사기준
기밀도		기밀이 유지되어야 함	
표기사항		허가사항과 일치	

3. 대량생산 공정법 확립

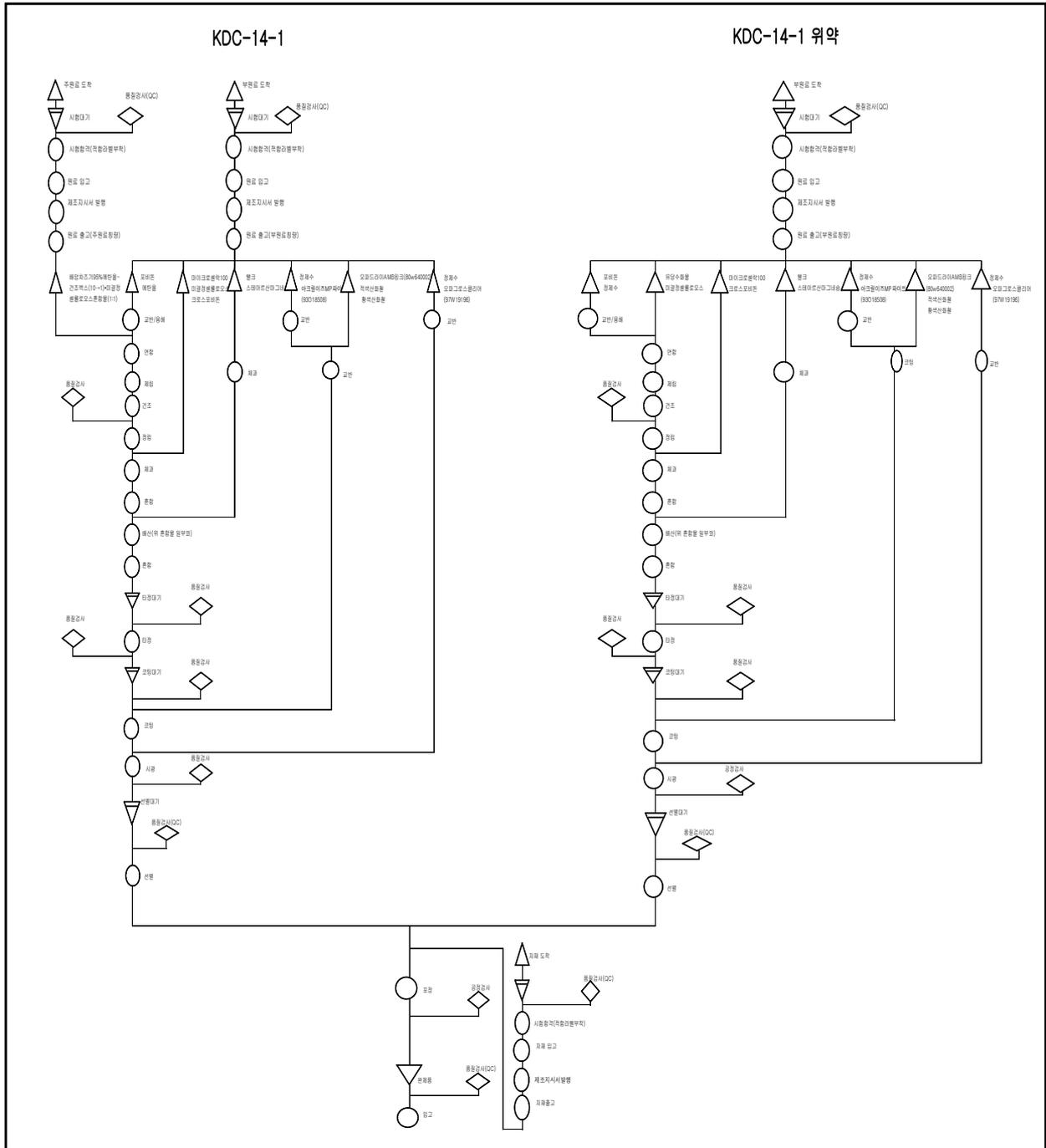
1) 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1) · 미결정셀룰로오스 혼합물(1:1)의 대량생산 공정위한 제조공정도를 확립 완료

- 곰보배추(원생약)과 추출용매(95%에탄올)을 이용한 추출 방법, 여과 및 감압농축에서 최종 포장까지 공정도를 확립하였으며, 원료 및 완제의약품의 제조공정도는 다음과 같음.

[표 26] 대량생산 위한 원료 제조공정도

[제조공정도]

공정번호	공정명칭	원료·시약·용매 등	비 고
1	원료청량	주 성분 : 배암차즈기(별규) 추출용매 : 95%에탄올(KP)	
2	추 출	주 성분 : 공정 1의 주성분 추출용매 : 95%에탄올	-온 도 : 70~75℃ -시 간 : 5시간 -추출용매 : 원생약의 건조중량 대비 10배수(kg/L)
3	여 과	공정 2의 추출액	-재 질 : 카트리지필터 -규 격 : φ10μm
4	감압농축	공정 3의 여과액	-온 도 : 60℃ 이하 -감 압 : 약 650mmHg -건조감량 약 70%가 될 때까지 농축
5	혼 합	주 성분 : 공정4의 농축액 부 형 제 : Avicel pH200	-부형제 : 고품분량=1:1(w/w) -28 rpm
6	건 조	공정 5의 혼합분	-건조방식 : 열풍건조 -건조온도 : 60℃ 이하
7	분 쇄	공정 6의 건조분	-32 Mesh
6	포 장	공정 7의 분말	-이중포장 1차 : 비닐(PE재질) 2차 : 지통(종이압착재질, 두께5mm)



[그림 101] 대량생산을 위한 완제 제조공정도

[표 27] 대량생산을 위한 완제의 중요공정 작업조건

공정		공정변수		작업조건	품질영향	
혼합	결합제 조제	용해 상태		완전 용해		
	과립	혼합시간		60 ~120초(1 ~2분)		
		혼합속도	CH	2,700 ~3,300rpm		
			스크린규격	250Q		
	가동속도	500 ~1,500rpm				
	건조	송풍건조		2 ~4시간	건조감량	
		건조온도		50±5℃		
		건조시간		12 ~20시간		
	정립	스크린규격		055R		
		가동속도		1000 ~2,000rpm		
	혼합	1차 사용한 체 규격		24mesh	성상, 안식각, 탭밀도, 겉보기밀도, 압축률, 함량(균질성)	
		1차 혼합속도		21±1rpm		
		1차 혼합시간		1,200초(20분)		
		2차 사용한 체 규격		35mesh		
2차 혼합속도		21±1rpm				
		2차 혼합시간		180초(3분)		
타정		질량충진깊이		참고값	성상, 질량편차, 용해, 경도, 마손도, 두께, 함량 제제균일성	
코팅 및 시광	코팅액 조제	1차 교반 시간		10분 이상	성상, 질량편차, 용해, 두께, 확이 함량, 미생물 한도, 순도 시험 잔류용매	
		2차 교반 시간		10분 이상		
	코팅	에어압력(kg/cm ²)		5 ~8		
		팬회전수(rpm)		2 ~8		
		액이송설정(rpm)		2 ~5		
			정제온도(℃)			40 ~65
	시광액 조제	교반시간		10분 이상		
		시광	에어압력(kg/cm ²)			5 ~8
	팬회전수(rpm)		4 ~8			
	액이송설정(rpm)		2 ~5			
정제온도(℃)			40 ~65			
건조 10분간	팬회전수(rpm)		4 ~7			
	정제온도(℃)		40 ~65			
포장	병포장	컨베이어컨트롤 수치		1 ~2단	기밀도	
		고주파 Power		45 ~50%		
	PTP 포장	HTR	예열히터(상)			130 ~145℃
			예열히터(하)			130 ~145℃
			실링롤			150 ~200℃
		메인에어압력		6kg/cm ² 이상		
		접착압력		5kg/cm ² 이상		

4. CMC제제 및 제형연구

1) Chemical Manufacturing Control (CMC) 완료

- 성분프로파일
지문분석법 확립 (HPLC, TLC 분석)완료
원생약 유전자 분석 완료
동등성 확보
- GMP
원료의약품 GMP 생산 완료
완제의약품 GMP 생산 완료
QC/QA 확립 완료
분석밸리데이션 확립 완료
안정성시험 (장기, 가속)6개월 확보
- 유해성분
원료 생약 관리 완료(중금속, 잔류농약, toxin, 미생물 등)
원료/완제 의약품 관리 완료
- 성분규명
90% 지표성분 규명 완료
활성성분 규명완료
원료 생약 성분 규명 완료

2) 제제 및 제형 연구 완료

- 고품배추추건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스(1:1)은 생약추출물로서 수분을 흡수하는 성질이 있음. 따라서 수분 흡수 시 성상이 변하거나 봉해가 지연되고, 1정의 질량이 계속 증가할 수 있으므로, 연구 및 제조 시에 상대습도를 제한하도록 하고 보관 시에 수분의 영향을 줄일 수 있는 필름코팅기제 및 포장형태를 고려하였음. 또한 보관 시 수분에 의한 봉해 지연이 없도록 봉해 시간 10분 내외를 목표로 제제연구를 진행하였음.
- 첨가제 배합적합성 연구
 - 고품배추추건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스(1:1)의 제제화 설계에 따라 완제의약품의 구성물질로서의 가능성이 있는 모든 첨가제들에 대해 배합적합성 평가를 하였음. 간단히 고체 상태에서 물리적 접촉을 통해서 함량 변화 정도를 HPLC 분석방법으로 평가하고, 40±2℃, 75±5% RH와 25±2℃, 60±5% RH에서 각각 1개월 간 안정성 보관 조건에 따라 변화를 확인하였음.
- 나정의 제제연구
 - 봉해시간 10분 내외를 목표로 나정의 첨가제를 선택하였음. 또한 고품배추추건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스(1:1)의 입자사이즈가 균일하지 않아 35mesh 체로 체과하여 일정한 사이즈를 갖도록 하였음. 전체 질량 대비 주성분이 차지하는 비중이 커 직접타정의 방법으로는 유동성에 문제가 있어, 포비돈K30과 주성분추출에 사용된 에탄올을 용매로 습식과립의 방법을 통하여 입자사이즈를 크게 만드는 공정이 필요하였음.
- 필름코팅의 제제연구
 - 필름코팅기제로 일반적으로 많이 사용하고 있는 오파드라이흰색(85F18422)와 아사에서 방습필름코팅으로 사용하고 있는 오파드라이AMB핑크(80W640002)와 아크릴이즈MP화이트(93O18508)의 1:1 혼합필름코팅을 고려하였으나, 주성분의 특성을 고려하여 필름코팅기제 결정하였음.
- 고품배추추건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스(1:1)은 주성분의 함량이 600mg으로 캡슐에는 충전이 불가능하여 정제로 제제화를 진행하였음. 생약추출물을 함유하는 제제이므로 용출시험 대신 봉해시험을 실시하여 20분 내에 들도록 제제를 설계하기 위하여 첨가제 및 코팅기제를 선택하였고, 과립, 혼합, 타정 및 필름코팅의 공정으로 구성된 일반방출 필름코팅정제로서 개발하였

음.

• 첨가제 배합적합성

- 고티베추진조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스(1:1)와 첨가제의 배합적합성 시험결과 및 상호작용 시험결과, 고티베추진조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스(1:1) 지표성분인 올레아놀릭산과 우르솔릭산의 함량은 초기값과 유의적인 차이가 없어, 배합적합성과 상호작용에 문제가 없음을 확인할 수 있었음.

[표 28] 첨가제 선택

배합 목적	첨가제명	선정 여부	기능
부형제	마이크로셀락100	선정	주로 직타공정에 사용되는 부형제이다.
	미결정셀룰로오스	선정	주로 건식과립과 직타공정에 사용되는 부형제이다 미결정셀룰로오스 중에서 과립들과 입자 크기가 비슷한 Avicel PH 102를 선정
	유당수화물	-	일반적으로 의약품에 사용되는 부형제이다.
붕해제	크로스카르멜로오스나트륨	-	일반적으로 의약품에 사용되는 붕해제로서 크로스포비돈보다 붕해가 느린 결과를 나타내었다.
	크로스포비돈	선정	입자크기에 따라 다양한 종류가 있으며 자사에서는 Kollidon CL을 사용한 결과 크로스카르멜로오스나트륨보다 우수한 붕해효과를 나타내었다.
결합제	포비돈K30	선정	습식과립에서 주로 결합제로 사용되며 경구용 제제에서 가용화제 코팅제로도 사용된다. 결합제로서는 0.5~5% 사용된다. 등급으로는 K-Value가 12에서 120까지 있으며 일반적으로 많이 사용되는 등급은K30이다.
	히드록시프로필셀룰로오스	-	정제의 결합제, 필름코팅제, 약물제어방출 정제의 matrix로 사용한다. 습식과립이나 건식과립에서 결합제로서 약 2~5% 정도 사용하며 결합제로서는 L type이 주로 사용된다.
활택제	경질무수규산	-	입자 크기가 15nm 정도로 초미세입자이므로 표면적이 넓어 혼합물의 흐름성을 개선시킬수 있으며 흡착제로 사용되기도 한다.
	텔크	선정	스테아르산마그네슘보다 활택력은 떨어지지만 등해에 미치는 영향이 적으므로 적당한 양을 사용하였다.
	스테아르산마그네슘	선정	일반적으로 많이 사용되는 활택제로서 다량 사용시 등해에 영향을 미치므로 적당한 양을 사용하였다.
필름 코팅제	오파드라이핀색 (85F18422)	-	유기용매를 사용하지 않고 경제수를 사용하는 필름코팅제로서 일반적으로 사용되고 있다.
	오파드라이AMB 핑크(80W640002)	선정	배합차즈기건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스(1:1)·마이크로셀락100(1:1)은 생약추출물로서 수분에 취약하므로 일반적인 필름코팅제 대신 수분침투에 강한 오파드라이 AMB 및 아크릴 이즈를 조합하여 사용하였다.
	아크릴이즈MP화이트 (93O18508)	선정	
광택제	오파그로스글리어 (97W19196)	선정	필름코팅된 정제의 청상을 개선하기 위하여 광택제로 사용하였다.
착색제	적색산화철	선정	타르색소를 사용하지 않고 적색 및 광색산화철을 적절히 배합하여 목적색상인 갈색을 조합하였다.
	광색산화철	선정	
용제 (결합력)	에탄올	선정	주정분 추출에 사용되는 용매로서 같은 종류를 사용하여 건류용매의 종류를 줄이고자 하였다.
	이소프로판올	-	

- 나정의 제제연구
 - 부형제는 타정시 일정한 경도를 나타내어 주는 마이크로셀락100과 미결정셀룰로오스를 사용하였고 봉해제는 크로스카르멜로오스와 크로스포비돈 2종을 모두 고려하였으나 봉해력이 더 좋은 크로스포비돈으로 선정하였음. 활택제는 일반적으로 사용되는 텔크와 스테아르산마그네슘을 사용하여 봉해 시간이 6~7분을 나타내었음.
- 필름코팅의 제제연구
 - 제제의 주성분을 고려하여, 오파드라이AMB핑크(80W640002)와 아크릴이즈MP화이트(93O18508)의 1:1 혼합조성의 필름코팅으로 결정하였다. 또한 광택제로 오파그로스클리어(97W19196)를 사용하였음. 필름코팅 후 완제품의 봉해시간은 약 10분을 나타내었음.
- 완제의약품 성상 : 적갈색의 장방형 필름코팅정제

[표 29] 완제의약품 조성

배합목적	성분명	규격	함유량 (mg/정)	함유량 (%,w/w)
주성분	배암차즈기건조엑스(10→1) .미결정셀룰로오스(1:1)	별첨 규격	600.00	69.07
부형제	마이크로셀락100	별첨 규격	100.00	2.45
부형제	미결정셀룰로오스	KP	30.00	11.51
결합제	포비돈K30	KP	21.30	3.45
봉해제	크로스포비돈	NF	50.00	5.76
활택제	텔크	KP	10.00	1.15
활택제	스테아르산마그네슘	KP	10.00	1.15
필름코팅제	오파드라이AMB 핑크(80W640002)	별첨 규격	20.00	2.30
필름코팅제	아크릴이즈MP화이트 (93O18508)	별첨 규격	20.00	2.30
착색제	적색산화철	NF	2.15	0.25
착색제	황색산화철	NF	0.24	0.03
광택제	오파그로스클리어 (97W19196)	별첨 규격	5.00	0.58

[표 30] 포장 형태 : 3가지의 포장 형태 연구

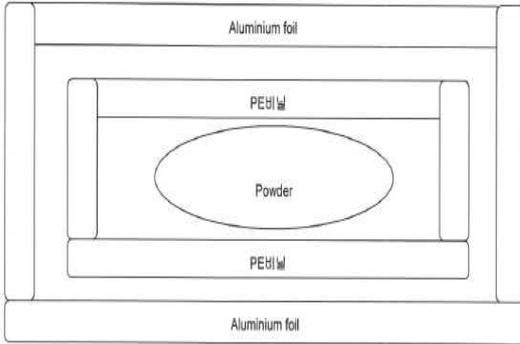
포장형태	포장구성요소	구성재료	제조회사
PTP+은박봉투 포장	PVDC 250/60-204	Polyvinylidene Chloride	한화리더텍
	Al-Foil	Aluminium foil	우진캠
	은박봉투	Aluminium bag	우진캠
병포장	HDPE병 (150mL)	High Density Polyethylene	다솔플라스틱
	LDPE 마개	Low Density Polyethylene	다솔플라스틱
PTP 포장	PVDC 250/60-204	Polyvinylidene Chloride	한화리더텍
	Al-Foil	Aluminium foil	우진캠

5. 포장 적합성시험

1) 원료

[표 31] 포장형태 및 용기

포장형태	포장구성요소	구성재료
PE비닐+일부미봉투 포장	PE비닐	Polyethylene
	은박봉투	Aluminium foil



[그림 102] 용기 포장재 단면도

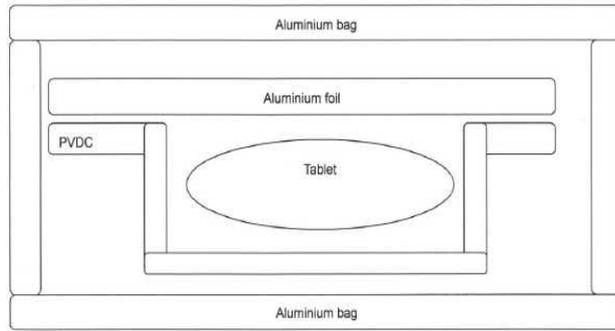
- 시험 기준 및 근거
 - ① 보호성(빛) : 파장 290~450nm에서 투과율 10% 이하
 - ② 보호성(수증기) : 수분투과율이 100mg/day/L를 초과하는 것이 10개 중 1개 이하이고, 200mg/day/L를 초과하는 것이 없을 것
 - ③ 배합적합성 : 용기 및 마개 시스템의 구성 성분과 상호반응을 할 가능성이 낮은 고형원료로 안정성시험을 별도로 실시하여 배합적합성 시험은 생략
 - ④ 안전성 : 주사제용 용기가 아니므로 세포독성시험 생략
 - 용출물 시험
 - 거품 : 3분 이내에 거의 없어짐
 - pH : 검액과 공시험액의 차이는 1.5 이하
 - 과망간산칼륨환원성물질 : 1.0ml 이하
 - 자외가시부흡수스펙트럼 측정
 - 증발잔류물 : 1.0mg 이하
 - ⑤ 성능 : 경구용 고형원료이므로 고려하지 않음
- 폼보배추95%에탄올건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스 혼합물(1:1)의 포장용기에 대한 적합성을 실시하여 제품에 투여될 때까지의 안전성 및 안정성을 보장하는 것을 목적으로 함.

2) 완제

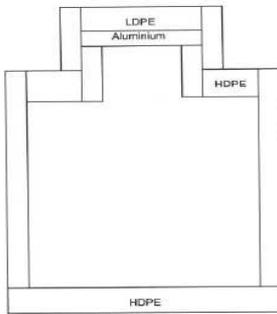
[표 32] 포장형태 및 용기

포장형태	포장구성요소	구성재료
PTP+은박봉투 포장	PVDC250/60-204	Polyvinylidene Chloride
	Al-Foil	Aluminium foil
	은박봉투	Aluminium bag
병포장	HDPE병 150mL	High Density Polyethylene
	LDPE마개	Low Density Polyethylene
PTP 포장	PVDC250/60-204	Polyvinylidene Chloride
	Al-Foil	Aluminium foil

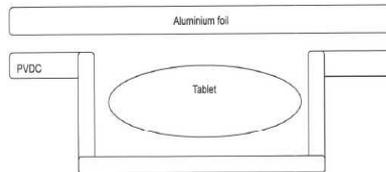
① PTP+은박봉투 포장



② 병포장



③ PTP 포장



[그림 103] 용기 포장재 단면도

• 시험 기준 및 근거

① 보호성(빛) : 파장 290~450nm에서 투과율 10% 이하

② 보호성(수증기)

- PTP+은박봉투포장

: 4팩 중 평균 수분 투과율이 0.5mg/day를 초과하는 팩이 없을 것

- PTP 포장

: 수분투과율이 1mg/day를 초과하는 것이 없어야 하며, 0.5mg/day를 초과하는 것인 10개 중 1개 이하일 것

- 병포장

: 수분 투과율이 25mg/day/L를 초과하는 것이 없어야 하며, 10mg/day/L를 초과하는 것이 10개 중 1개 이하일 것

③ 배합적합성 : 용기 및 마개 시스템의 구성 성분과 상호반응을 할 가능성이 낮은 고형제제로 안정성시험을 별도로 실시하여 배합적합성 시험은 생략

④ 안전성 : 주사제용 용기가 아니므로 세포독성시험 생략

- 용출물 시험

- 거품 : 3분 이내에 거의 없어짐

- pH : 검액과 공시험액의 차이는 1.5 이하

- 과망간산칼륨환원성물질

: 1.0ml 이하

- 자외가시부흡수스펙트럼 측정

- 증발잔류물 : 1.0mg 이하

⑤ 성능 : 경구용 고형제제이므로 고려하지 않음

**6. 제제개선연구: 임상 피험자들의 복용 편리성 및 시험에 영향을 끼치지 않는 제제의 문제점
등을 보안 및 개량 (3차년도)**

1) 원료칭량

- 주성분 : 곱보배추95%에탄올건조엑스(10→1)
- 부형제 : 마이크로셀락100
- 부형제 : 미결정셀룰로오스
- 결합제 : 포비돈K30
- 붕해제 : 크로스포비돈
- 활택제 : 텔크
- 활택제 : 스테아르산마그네슘
- 필름코팅제 : 오파드라이AMB핑크(80W640002)
- 필름코팅제 : 아크릴이즈MP화이트(93O18508)
- 착색제 : 적색산화철
- 착색제 : 황색산화철
- 광택제 : 오파그로스클리어(97W19196)
- 용 제 : 에탄올
- 용 제 : 정제수

2) 결합액의 조제

- 결합제 : 포비돈K30
- 용 제 : 에탄올

3) 과립

- 주성분 : 곱보배추95%에탄올건조엑스(10→1)
- 공정 2의 결합액

4) 건조

- 공정 3의 반제품

5) 정립

- 공정 4의 반제품

6) 혼합

- 공정 5의 반제품
- 부형제 : 마이크로셀락100
- 부형제 : 미결정셀룰로오스
- 붕해제 : 크로스포비돈
- 활택제 : 텔크
- 활택제 : 스테아르산마그네슘

7) 타정

- 공정 6의 반제품

8) 필름코팅액의 조제

필름코팅제 : 오파드라이AMB핑크(80W640002)

필름코팅제 : 아크릴이즈MP화이트(93O18508)

착색제 : 적색산화철

착색제 : 황색산화철

용 제 : 정제수

9) 필름코팅

공정 7의 반제품

공정 8의 필름코팅액

10) 시광액의 조제

광택제 : 오파그로스클리어(97W19196)

용 제 : 정제수

11) 시광

공정 9의 반제품

공정 10의 시광액

12) 포장

공정 11의 반제품

- 시제품 생산 완료



[그림 104] 시제품 사진

7. 안정성시험

1) 온도 25±2℃, 상대습도 60±5% 조건에서 36개월 기간 동안을 안정성 시험 완료

[표 33] 가속시험 조건

제조번호	제조일자	시험항목	시험조건
P001	2016.01.21	온도	60±2℃, (3일, 6일)
		습도	25±2℃, 75±5%RH, (3일, 6일)
		빛	CWF 6000 LUX hour & UV-A 4.5W/m ² (120만 Lux hour)

본 제품의 안정성시험(가속시험)은 제조번호:P001(제조일자:2016.01.21.)에 대하여 온도, 습도, 빛에 대한 영향을 검토하였으며, 노출시킨 시험검체와 노출시키지 않은 대조검체를 비교한 결과 온도, 습도, 빛 모두 성상의 변화나 분해산물의 검출 없이 기준에 적합하였음.

[표34] 가속시험 조건

제조번호	제조일자	시험조건	포장재질1	포장재질2	포장재질3
P001	2016.01.21	40±2℃, 75±5%RH	HDPE용기/ LDPE마개	PVDC/ Al-foil	PVDC/Al-foil/ 은박봉투
P002	2016.01.21	40±2℃, 75±5%RH	HDPE용기/ LDPE마개	PVDC/ Al-foil	PVDC/Al-foil/ 은박봉투
P003	2016.01.21	40±2℃, 75±5%RH	HDPE용기/ LDPE마개	PVDC/ Al-foil	PVDC/Al-foil/ 은박봉투

본제품의 안정성시험(가속시험)은 100정/병(HDPE용기, LDPE마개, 고주파셀)와 100정/PTP(PVDC, Al-foil) 및 100정/PTP(PVDC, Al-foil, 은박봉투)에 대하여 제조번호 P001(제조일자:2016.01.21), P002(제조일자:2016.01.21), P003(제조일자:2016.01.21)을 가지고 시험을 실시하였고, 100정/병(HDPE용기, LDPE마개, 고주파셀) 포장과 100정/PTP(PVDC, Al-foil, 은박봉투) 포장은 특별한 경향 없이 6개월간 안정하여 안전한 포장용기로 확인되었으며, 100정/PTP(PVDC, Al-foil) 포장은 수분에 영향을 받아 봉해가 빨라지는 것으로 추정되어 본 제품의 포장용기로는 적합하지 않은 것으로 나타났음.

[표 35] 장기보존시험 조건

제조번호	제조일자	시험조건	포장재질1	포장재질2	포장재질3
P001	2016.01.21	25±2℃, 60±5%RH	HDPE용기/ LDPE마개	PVDC/ Al-foil	PVDC/Al-foil/ 은박봉투
P002	2016.01.21	25±2℃, 60±5%RH	HDPE용기/ LDPE마개	PVDC/ Al-foil	PVDC/Al-foil/ 은박봉투
P003	2016.01.21	25±2℃, 60±5%RH	HDPE용기/ LDPE마개	PVDC/ Al-foil	PVDC/Al-foil/ 은박봉투

본제품의 안정성시험(장기보존시험)은 100정/병(HDPE용기, LDPE마개, 고주파셀)과 100정/PTP(PVDC, Al-foil) 및 100정/PTP(PVDC, Al-foil, 은박봉투)에 대하여 제조번호 P001(제조일자:2016.01.21), P002(제조

일자:2016.01.21), P003(제조일자:2016.01.21)을 가지고 시험을 실시하였고, 100정/병(HDPE용기, LDPE마개, 고주파셀) 포장과 100정/PTP(PVDC, Al-foil, 은박봉투) 포장은 특별한 경향 없이 사용기간(24개월) 동안 안정하였으며, 100정/PTP(PVDC, Al-foil) 포장은 수분에 영향을 받아 봉해가 빨라지는 것으로 추정되어 본 제품의 포장용기로는 적합하지 않은 것으로 나타났음.

- 안정성시험 결과

[표36] 가혹시험(제조번호 : P001) 결과

시험항목		기 준	온 도		습 도		빛
			3일	6일	3일	6일	120만 Lux hour
성 상		적갈색의 장방형 필름코팅정제	불변	불변	불변	불변	불변
확인시험 (TLC)		양성	양성	양성	양성	양성	양성
합량	올레아놀릭산	0.95mg/정 이상	1.503	1.922	1.480	2.005	1.362
	우르솔릭산	1.67mg/정 이상	2.421	2.461	2.419	3.598	2.292
분해산물		불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

[표 37] 가속시험(HDPE듀마용기, LDPE 마개, 고주파실) 결과

시 험 항 목		시 험 기 준	제 조 번 호	시 험 개 시	1 개 월	2 개 월	4 개 월	6 개 월
성 상		적갈색의 장방형 필름코팅정제	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
확 인		양 성 (TLC)	P001 ~ 3	양성	양성	양성	양성	양성
함 량	올레아놀릭산	0.95mg/정 이상	P001	1.715	1.770	1.710	1.590	1.633
			P002	1.546	1.602	1.541	1.486	1.540
			P003	1.534	1.439	1.507	1.386	1.430
	우르솔릭산	1.67mg/정 이상	P001	3.412	3.188	3.164	2.992	2.761
			P002	2.765	2.901	2.816	2.972	2.823
			P003	2.670	2.541	2.753	2.691	2.543
붕 해		60분 이내 / 물	P001	7분	9분	9분	7분	6분
			P002	8분	9분	9분	9분	7분
			P003	7분	8분	9분	8분	7분
순 도	중금속	30ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
	납	5ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
	비소	3ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
제 제 균 일 성 (질량편차)		평균질량 $\pm 5\%$ 이하	P001	2.0	1.6	2.4	2.3	1.9
			P002	2.9	2.5	2.7	2.2	2.5
			P003	1.8	2.1	4.9	1.7	2.0
미생물한도	총호기성 미생물수	1000/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0
	총진균수	100/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0
	특정세균	불검출	P001 ~ 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
잔류용매 (에탄올)		50mg 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
기 밀 도		기밀이 유지되어야 함	P001 ~ 3	적합	-	-	-	적합

[표38] 가속시험 PTP(PVDC, Al-foil) 결과

시 험 항 목		시 험 기 준	제조번호	시험개시	1개월	2개월	4개월	6개월
성 상		적갈색의 장방형 필름코팅정제	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
확 인		양 성 (TLC)	P001 ~ 3	양성	양성	양성	양성	양성
함 량	올레아놀릭산	0.95mg/정 이상	P001	1.878	1.714	1.717	1.388	1.676
			P002	1.498	1.577	1.546	1.281	1.565
			P003	1.539	1.434	1.489	1.352	1.432
	우르솔릭산	1.67mg/정 이상	P001	3.634	3.124	3.068	2.500	2.721
			P002	2.642	2.891	2.735	2.254	2.866
			P003	2.701	2.550	2.544	2.343	2.537
붕 해		60분 이내 / 물	P001	10분	5분	8분	2분	3분
			P002	10분	5분	9분	2분	2분
			P003	8분	4분	9분	2분	4분
순 도	중금속	30ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
	납	5ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
	비소	3ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
제제균일성 (질량편차)		평균질량 $\pm 5\%$ 이하	P001	1.8	2.1	0.7	1.4	1.6
			P002	2.7	3.0	2.4	3.0	2.4
			P003	2.1	1.8	1.0	2.3	1.4
미생물한도	총호기성 미생물수	1000/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0
	총진균수	100/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0
	특정세균	불검출	P001 ~ 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
잔류용매 (에탄올)		50mg 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
기 밀 도		기밀이 유지되어야 함	P001 ~ 3	적합	-	-	-	적합

[표 39] 가속시험 PTP(PVDC, Al-foil, 은박봉투) 결과

시험항목		시험기준	제조번호	시험개시	1개월	2개월	4개월	6개월
성상		적갈색의 장방형 필름코팅정제	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
확인		양성 (TLC)	P001 ~ 3	양성	양성	양성	양성	양성
함량	올레아놀릭산	0.95mg/정 이상	P001	1.843	1.702	1.655	1.647	1.668
			P002	1.629	1.501	1.535	1.645	1.549
			P003	1.446	1.439	1.438	1.602	1.450
	우르솔릭산	1.67mg/정 이상	P001	3.543	3.114	2.989	2.746	2.389
			P002	2.906	2.670	2.792	2.840	2.821
			P003	2.063	2.550	2.610	2.616	2.673
붕해		60분 이내 / 물	P001	8분	7분	8분	7분	7분
			P002	9분	8분	8분	8분	7분
			P003	9분	7분	8분	6분	8분
순도	중금속	30ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
	납	5ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
	비소	3ppm 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
제제균일성 (질량편차)		평균질량 $\pm 5\%$ 이하	P001	1.5	2.4	0.9	1.8	1.8
			P002	2.2	3.5	1.5	2.8	2.6
			P003	1.9	1.5	2.8	1.8	2.0
미생물한도	총호기성 미생물수	1000/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0
	총진균수	100/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0
	특정세균	불검출	P001 ~ 3	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
잔류용매 (에탄올)		50mg 이하	P001 ~ 3	적합	적합	적합	적합	적합
기밀도		기밀이 유지되어야 함	P001 ~ 3	적합	-	-	-	적합

[표 40] 장기보존시험 100정/병(HDPE용기, LDPE마개, 고주파셀) 결과

시험항목		시험기준	제조번호	시험개시	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
성상		적갈색의 장방형 필름코팅정제	P001 ~ 3	적합						
확인		양성(TLC)	P001 ~ 3	양성						
함량	올레아놀릭산	0.95mg/정 이상	P001	1.715	1.880	1.569	1.641	1.877	1.666	1.540
			P002	1.546	1.705	1.491	1.499	1.630	1.564	1.473
			P003	1.534	1.618	1.387	1.522	1.622	1.494	1.409
	우르솔릭산	1.67mg/정 이상	P001	3.412	3.241	2.829	3.100	3.137	2.809	2.987
			P002	2.765	2.982	2.714	2.667	2.869	2.646	2.782
			P003	2.670	2.969	2.686	2.646	2.853	2.540	2.695
붕해		60분 이내/물	P001	7분	8분	7분	6분	10분	7분	8분
			P002	8분	8분	7분	9분	10분	8분	9분
			P003	7분	7분	6분	8분	7분	5분	7분
순도	중금속	30ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
	납	5ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
	비소	3ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
제제균일성 (질량편차)		평균질량 $\pm 5\%$ 이하	P001	2.0	1.6	1.2	2.0	2.2	2.1	1.8
			P002	2.9	3.9	2.4	3.4	1.8	2.3	2.7
			P003	1.8	2.0	2.0	2.3	1.4	2.4	2.1
미생물한도	총호기성 미생물수	1000/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0	0	0
	총진균수	100/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0	0	0
	특정세균	불검출	P001 ~ 3	불검출						
잔류용매 (에탄올)		50m 이하	P001 ~ 3	적합						
기밀도		기밀이 유지되어야 함	P001 ~ 3	적합	-	-	-	-	-	적합

[표 41] 장기보존시험 PTP(PVDC, Al-foil) 결과

시험항목		시험기준	제조번호	시험개시	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
성상		적갈색의 장방형 필름코팅정제	P001 ~ 3	적합						
확인		양성 (TLC)	P001 ~ 3	양성						
합량	올레아놀릭산	0.95mg/정 이상	P001	1.878	1.792	1.600	1.653	1.921	1.713	1.622
			P002	1.498	1.745	1.495	1.591	1.807	1.570	1.513
			P003	1.539	1.568	1.443	1.489	1.658	1.466	1.367
	우르솔릭산	1.67mg/정 이상	P001	3.634	2.993	2.764	3.205	3.216	2.857	3.179
			P002	2.642	3.074	2.642	3.138	3.181	2.630	2.864
			P003	2.701	3.006	2.896	2.817	2.905	2.461	2.675
붕해		60분 이내/물	P001	10분	7분	6분	7분	5분	4분	3분
			P002	10분	9분	7분	8분	5분	4분	3분
			P003	8분	5분	4분	7분	5분	2분	3분
순도	중금속	30ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
	납	5ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
	비소	3ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
제제균일성 (질량편차)		평균질량 ±5% 이하	P001	1.8	1.2	2.2	1.7	1.7	1.5	1.7
			P002	2.7	2.6	4.0	2.5	2.9	3.1	2.1
			P003	2.1	2.3	2.8	2.0	1.9	1.8	2.0
미생물 한도	총호기성 미생물수	1000/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0	0	0
	총진균수	100/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0	0	0
	특정세균	불검출	P001 ~ 3	불검출						
잔류용매(에탄올)		50mg 이하	P001 ~ 3	적합						
기밀도		기밀이 유지되어야 함	P001 ~ 3	적합	-	-	-	-	-	적합

[표 42] 장기보존시험 PTP(PVDC, Al-foil, 은박봉투) 결과

시험항목		시험기준	제조번호	시험개시	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
성상		적갈색의 장방형 필름코팅정제	P001 ~ 3	적합						
확인		양성 (TLC)	P001 ~ 3	양성						
함량	올레아놀릭산	0.95mg/정 이상	P001	1.843	1.826	1.613	1.631	1.805	1.646	1.603
			P002	1.629	1.750	1.538	1.399	1.739	1.547	1.551
			P003	1.446	1.613	1.449	1.453	1.579	1.491	1.474
	우르솔릭산	1.67mg/정 이상	P001	3.543	3.187	2.057	3.097	3.232	2.770	3.153
			P002	2.906	3.113	2.704	2.934	3.032	2.604	2.935
			P003	2.603	2.989	3.094	2.526	2.809	2.548	2.951
붕해		60분 이내/물	P001	8분	8분	8분	8분	9분	8분	7분
			P002	9분	9분	6분	9분	10분	8분	8분
			P003	9분	6분	8분	8분	8분	5분	6분
순도	중금속	30ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
	납	5ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
	비소	3ppm 이하	P001 ~ 3	적합						
제제균일성 (질량편차)		평균질량 $\pm 5\%$ 이하	P001	1.5	2.3	2.0	1.7	1.3	1.6	1.7
			P002	2.2	3.5	2.7	1.7	3.3	2.4	2.4
			P003	1.9	2.3	2.6	1.9	2.7	1.9	2.4
미생물한도	총호기성 미생물수	1000/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0	0	0
	총진균수	100/g 이하	P001 ~ 3	0	0	0	0	0	0	0
	특정세균	불검출	P001 ~ 3	불검출						
잔류용매(에탄올)		50mg 이하	P001 ~ 3	적합						
기밀도		기밀이 유지되어야 함	P001 ~ 3	적합	-	-	-	-	-	적합

8. 전임상 시험

- 의약품 원료로 사용되는 곰보배추 추출물 (KDC14-1)의 전임상 시험을 위해 충청북도 청주시 청원구에 위치한 전문 전임상 위탁 시험 기관 “(주)바이오독스텍”과 용역 계약을 2014년 10월 31일 체결함.

위탁 시험 용역 계약서

서울시 강남구 논현로 28길 34번지 소재 고려제약㈜ (대표이사 박상훈, 이하 “갑”이라 한다)와 충북 청주시 청원구 연구단지로 53 (오창과학산업단지내) 내 ㈜바이오독스텍 (대표이사 강종구, 이하 “을”이라 한다)은 위탁시험 용역 계약을 다음과 같이 체결한다.

□ 위탁과제명 : “KDC14-1”에 대한 안전성시험

- 1) PK 예비시험(MD 포함) (LC/MS/MS)
- 2) 조제물분석 Validation(HPLC) (2종 분석)
- 3) 조제물분석 Validation(LC/MS/MS)
- 4) 설치류 단회투여독성시험(랫드-경구)
- 5) 설치류 4주 반복 DRF 독성시험(랫드-경구)
- 6) TK validation (랫드- Full validation)(LC/MS/MS)
- 7) TK validation (비글견- partial validation)(LC/MS/MS)
- 8) 설치류 13주 반복투여 독성시험+ 4주회복시험+TK(랫드-경구)
(조제물농도분석포함)
- 9) 설치류 26주 반복투여 독성시험+ 4주회복시험+TK(랫드-경구)
(조제물농도분석포함)
- 10) 비설치류 4주 반복 DRF 독성시험(비글견-경구)
- 11) 비설치류 13주 반복투여 독성시험+4주 회복시험+ TK
(비글견-경구)
- 12) 비설치류 39주 반복투여 독성시험(비글견-경구)+
4주회복시험+ TK
- 13) 유전독성-복귀돌연변이시험(조제물농도분석포함)
- 14) 유전독성-염색체이상시험(조제물 농도분석포함)
- 15) 유전독성-소핵시험(조제물농도분석포함)
- 16) 안전성약리-중추신경계(랫드-경구)(조제물농도분석포함)
- 17) 안전성약리-호흡기계(랫드-경구)(조제물농도분석포함)
- 18) 안전성약리-심혈관계(비글견-경구)(조제물농도분석포함)
- 19) 안전성약리-hERG Assay (HEK-293Cell)(조제물농도분석포함)

□ 위탁시험비 : 알금[십억구천만]원(₩1,090,000,000, VAT 별도)

□ 위탁시험기간 : [2014]년 [11]월 [10]일 부터 (또는 계약체결일 부터)
[2017]년 [2]월 [28]일 까지

[그림 105] 전임상 위탁시험 용역계약서

1) HPLC 조제물 분석 validation 완료 (첨부1. HPLC조제물 분석 보고서)

- 본 시험은 HPLC 를 이용하여 시험물질인 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)의 조제물 농도 분석법 보증을 위한 validation 및 안정성을 확인하기 위해 실시하였음. 분석 결과 QC 시료를 6 회 반복 측정 한 피크면적 및 retention time 의 정밀성은 판정기준을 모두 만족하였음. 검량선 용액 5 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 범위에서 측정 한 직선성은 상관계수와 정확성의 판정기준을 모두 만족하였음. 표준물질의 피크는 분석에 충분한 형상을 나타내었으며, 이동상, 희석용매 및 부형제가 표준물질의 피크에 영향을 주는 성분은 검출되지 않았음. 일내재현성의 결과 50, 350 및 400 mg/mL 농도의 조제물에서 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였음. 이상의 결과로부터 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)의 조제물 농도 분석을 위한 본 분석법은 적합하며, 0.5% CMC-Na 수용액 내에서 50 및 350 mg/mL 농도의 조제물은 균질하였고 실온 4시간 및 냉장 7 일간 안정한 것으로 확인됨. 또한, 400 mg/mL 농도의 조제물은 균질하였으며, 실온 4 시간 동안 안정한 것으로 확인되었음.
- 표준원액을 실온에서 4 시간 방치 및 냉장 (4.9 ~ 5.5 $^{\circ}\text{C}$) 에서 8 일간 보관 후 안정성을 확인한 결과, 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였음. 50, 350 및 400 mg/mL 농도의 조제물을 autosampler 내에서 일정시간 동안 방치 후 안정성을 확인한 결과, 31 시간 동안 초기농도에 대한 변동률 및 정밀성은 판정기준을 모두 만족하였음. 50, 350 및 400 mg/mL 농도의 조제물에서 상층, 중층 및 하층의 균질성을 확인한 결과, 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였음. 50, 350 및 400 mg/mL 농도의 조제물을 실온에서 4 시간 방치, 50 및 350 mg/mL 농도의 조제물을 냉장 (4.9 ~ 5.5 $^{\circ}\text{C}$) 에서 7 일간 보관 후 안정성을 확인한 결과, 초기농도에 대한 변동률 및 정밀성은 판정기준을 모두 만족하였음. QC 시료 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였음.

[표 43] HPLC 조제물 분석 QC 시료 정밀성 및 정확성은 판정

(A) Day 0

a) Oleoic acid

Concentration of QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3				
20	19.96	19.98	19.75	19.90	0.13	0.65	99.50

b) Ursolic acid

Concentration of QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3				
20	21.62	21.59	21.43	21.55	0.10	0.46	107.75

(B) Day 8

a) Oleoic acid

Concentration of QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3				
20	19.60	19.63	19.68	19.64	0.04	0.20	98.20

b) Ursolic acid

Concentration of QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3				
20	19.69	19.62	19.81	19.71	0.10	0.51	98.55

2) LC/MS/MS 조제물 분석 validation 완료 (첨부2. LC/MS/MS 조제물 분석 보고서)

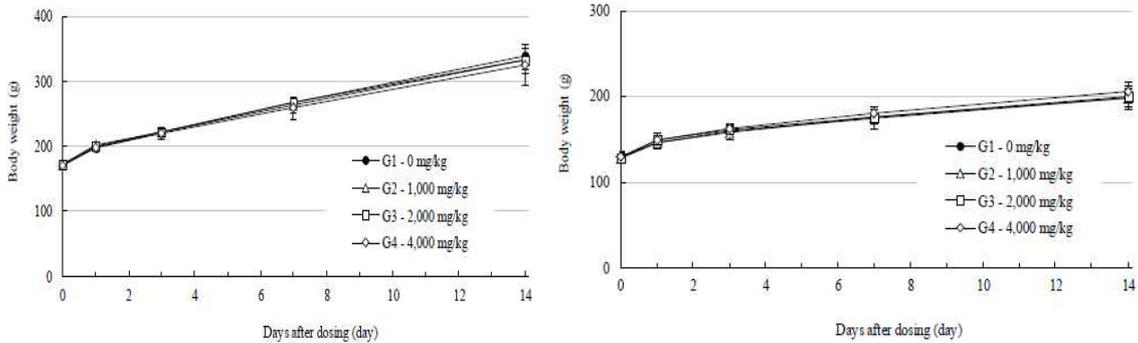
- 본 시험은 LC/MS/MS를 이용하여 시험물질인 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)의 조제물 농도 분석법 보증을 위한 validation 및 안정성을 확인하기 위해 실시하였음. 분석 결과 QC 시료를 6 회 반복 측정된 피크면적 및 retention time 의 정밀성은 판정기준을 모두 만족하였음. 검량선 용액 0.005 ~ 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 범위에서 측정된 직선성은 상관계수와 정확성의 판정기준을 모두 만족하였음. 표준물질의 피크는 분석에 충분한 형상을 나타내었으며, 이동상, 희석용매 및 부형제가 표준물질의 피크에 영향을 주는 성분은 검출되지 않았음. 일내재현성의 결과 0.1 및 200 mg/mL 농도의 조제물에서 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였음. 이상의 결과로부터 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)의 조제물 농도 분석을 위한 본 분석법은 적합하며, 0.5% CMC-Na 수용액 내에서 0.1 및 200 mg/mL 농도의 조제물은 균질하였고 실온 4시간 및 냉장 7 일간 안정한 것으로 확인됨.
- 표준원액을 실온에서 4 시간 방치 및 냉장 (5.2 ~ 6.8°C) 에서 7 일간 보관 후 안정성을 확인한 결과, 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였으며, 0.1 및 200 mg/mL 농도의 조제물을 autosampler 내에서 일정시간 동안 방치 후 안정성을 확인한 결과, 13 시간 동안 초기농도에 대한 변동률 및 정밀성은 판정기준을 모두 만족하였음. 0.1 및 200 mg/mL 농도의 조제물에서 상층, 중층 및 하층의 균질성을 확인한 결과, 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였음. 0.1 및 200 mg/mL 농도의 조제물을 실온에서 4 시간 방치 및 냉장 (5.2 ~ 6.8°C) 에서 7일간 보관 후 안정성을 확인한 결과, 초기농도에 대한 변동률 및 정밀성은 판정기준을 모두 만족하였음. QC 시료 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 정밀성 및 정확성은 판정기준을 모두 만족하였음.

[표44] LC/MS/MS 조제물 분석 QC 시료 정밀성 및 정확성은 판정

(A) Day 0							
a) Oleanolic acid							
Concentration of QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3				
0.02	0.02246	0.02313	0.02155	0.02238	0.00079	3.53	111.90
b) Ursolic acid							
Concentration of QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3				
0.02	0.02044	0.02046	0.01852	0.01981	0.00111	5.60	99.05
(B) Day 7							
a) Oleanolic acid							
Concentration of QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3				
0.02	0.02255	0.02161	0.02231	0.02216	0.00049	2.21	110.80
b) Ursolic acid							
Concentration of QC sample ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
	No.1	No.2	No.3				
0.02	0.02135	0.02108	0.02154	0.02132	0.00023	1.08	106.60

3) 단회투여독성시험(렛드) 완료 (첨부3. 렫드 단회경구투여 독성시험 보고서)

- 시험물질인 곰보배추 95%에탄올건조엑스(10→1)를 Sprague-Dawley 계 암수 6 주령 렫드에 단회 경구투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였음.
- 본 시험의 조건 하에서 곰보배추 95%에탄올건조엑스(10→1)를 렫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 4,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단됨.

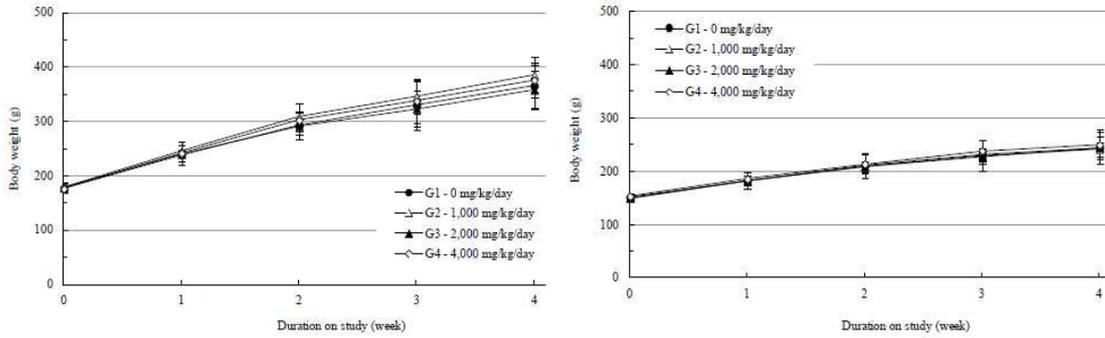


[그림106] 단회투여 독성시험에서의 SD 렫드 male 및 female body weights

- 군구성은 시험물질 시험물질 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg 투여군과 대조군 (0.5% CMC-Na 수용액) 의 4 군으로 하고, 암수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였음. 투여 후 14 일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였음. 암수 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았음. 일반증상에서는 암수 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일에 시험물질 색변이 관찰되었으나, 투여 후 2 일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았음. 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았음.

4) 4주 반복 용량결정(DRF) 시험(렛드) 완료 (첨부4. 렫드 4주 DRF 시험 보고서)

- 본 시험은 곰보배추 95%에탄올건조엑스(10→1)를 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 렫드에 4 주간 1일 1회 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 보다 장기적인 반복독성시험의 투여용량을 설정하기 위하여 실시하였음.
- 본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 부검시 육안적 검사에서 시험물질 투여에 의한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았음.
- 일반증상 관찰 결과, 시험물질 색변이 암수 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg/day 투여군에서, 투여후의 유연이 암수 4,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰되었으나 독성학적인 의미는 없는 것으로 판단됨.
- 장기중량 측정 결과, 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군과 암수 4,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 상대중량의 증가가 관찰되었으나, 본 시험조건 만으로는 독성학적으로 의미 있는 변화로 보기 어려웠음.
- 이상의 결과로부터, 보다 장기적인 반복독성시험의 고용량을 4,000 mg/kg/day로 설정하고, 공비 2 를 적용하여 2,000 및 1,000 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단됨.

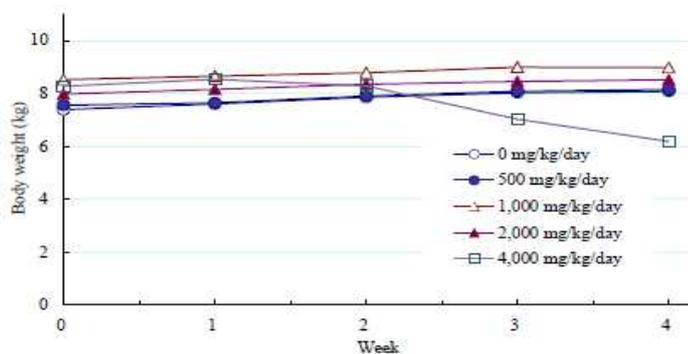


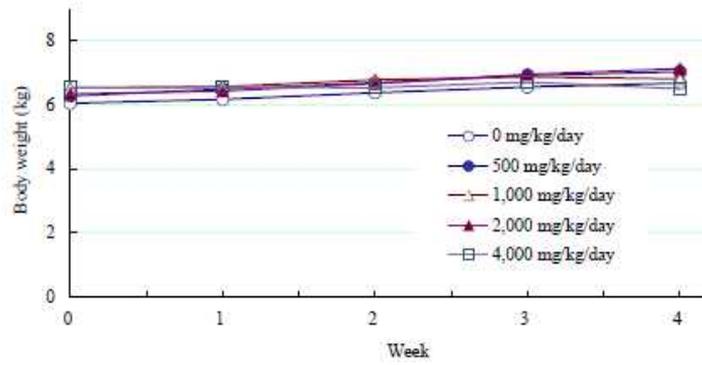
[그림107] 4주 반복 용량결정 시험에서의 SD 랫드 male 및 female body weights

- 군구성은 시험물질 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg/day의 3개의 용량과 대조군 (0.5% Carboxymethylcellulose sodium salt 수용액)의 4군으로 하고, 군당 암수 각 5 마리에 4주간 반복 경구 투여하였음.
- 관찰기간 동안 일반증상관찰, 체중 측정, 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사를 수행하였음.

5) 4주 반복 용량결정(DRF) 시험(비글견) 완료 (첨부5. 비글견 4주 DRF 시험 보고서)

- 본 시험은 비글견을 이용하여 암수 각 군당 1 마리에 시험물질인 곰보배추95% 에탄올건조엑스(10 →1)를 0 (대조군), 500, 1000, 2000 및 4000 mg/kg/day의 용량으로 4 주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 26주 반복투여 독성시험에서 용량설정의 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였음.
- 투여기간 중, 암수 모든 시험군에서 사망동물은 발생하지 않았으나, 1,000 mg/kg/day 이상의 용량에서 설사 또는 연변, 구토 및 유연 등 증상이 산발적 또는 지속적으로 관찰되고, 시험물질 혼입변이 관찰되었음. 체중에서는 암수 4,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 2주부터 체중 감소가 관찰되고, 수컷에서는 투여 2주부터 사료 섭취량의 감소 및 거식이 관찰되었음. 뇨 검사에서는 암수 4,000 mg/kg/day 투여군에서 케톤체 또는 산성노가 관찰되고, 혈액학적 검사에서는 암수 4,000 mg/kg/day 투여군에서 상대 및 절대 망상적혈구의 감소가 관찰됨. 장기 중량에서는 암수 4,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 절대 또는 상대 중량의 증가경향이 관찰되었으며, 조직병리학적 검사에서 수컷은 1,000 mg/kg/day, 암컷은 2,000 mg/kg/day 이상의 용량에서 문맥주위 글리코겐 공포화 및 난원형세포 과형성 소견이 용량의존적으로 관찰되었음. 그 외, 혈액생화학적 검사 및 부검에서는 시험물질의 투여에 의한 변화가 관찰되지 않았음.
- 이상의 결과 의해, 암수 비글견을 이용한 26주 반복투여 독성시험에서는 고용량을 2,000 mg/kg/day 으로 설정하는 것이 바람직하다고 판단됨.





[그림 108] 4주 반복 용량결정 시험에서의 비글견 male 및 female body weights

- 군구성은 시험물질 500, 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg/day의 4개의 용량과 대조군 (0.5% Carboxymethylcellulose sodium salt 수용액)의 5군으로 하고, 군당 암수에 4주간 반복 경구 투여하였음.
- 관찰기간 동안 일반증상관찰, 체중 측정, 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사를 수행하였음.
- 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사를 수행하였음.

6) TK validation(랫드) 완료 (첨부6. 랫드 TK validation 보고서)

- 본 시험에서는 Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (이하 LC/MS/MS)를 이용하여 Sprague-Dawley (SD) 랫드 혈장 중 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 동시 분석방법에 대한 유효성 검증 (이하 validation)을 실시하였음.
- 아래 표는 validation 항목의 결과로, 본 기관에서 확인한 분석방법은 SD 랫드 혈장 중 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 농도 측정에 적용 가능하다고 판단됨.

[표 45] 랫드 혈장에서의 oleanolic acid 분석

생체시료 (항응고제)	SD 랫드 혈장 (헤파린 나트륨)	
표준물질 / 내부표준물질	Oleanolic acid / Betulinic acid	
정량범위 (가중치, 상관계수 r)	2 ng/mL ~ 100 ng/mL ($1/X^2$, ≥ 0.9965)	
선택성	적합 (알수 각 3마리)	
생체시료 효과	적합 (알수 각 3마리)	
MA-QL 및 MA-QH	정확성	96.3% 및 96.5%
	정밀성	6.3% 및 3.7%
캐리오버	적합	
시험 내 재현성	적합	
LLOQ	정확성	107.0%
	정밀성	4.7%
QL, QM 및 QH	정확성	93.7%, 100.9% 및 102.6%
	정밀성	2.1%, 3.2% 및 3.0%
시험 간 재현성 (3일)	적합	
LLOQ	정확성	99.0%
	정밀성	7.0%
QL, QM 및 QH	정확성	97.3%, 102.0% 및 101.4%
	정밀성	3.6%, 7.3% 및 2.8%
회수율	적합	
표준물질 (QL, QM 및 QH)	회수율	98.0%, 89.7% 및 92.7%
	정밀성	0.7% ~ 3.9%
내부표준물질	회수율	92.5%
	정밀성	3.8% 및 4.8%
희석의 타당성 (5배 희석)	적합	
5F-DQC	정확성	98.7%
	정밀성	1.4%
안정성	적합	
냉·해동 안정성	냉동 (-25°C ~ -10°C)/실온	3회
	초저온냉동 (-80°C ~ -60°C)/실온	3회
단기 안정성	실온	24시간
장기 안정성	냉동 (-25°C ~ -10°C)	39일
	초저온냉동 (-80°C ~ -60°C)	39일
전처리 시료의 안정성	Preset 10°C	28.5시간
표준원액 안정성	실온	6시간
(Oleanolic acid)	냉장 (2°C ~ 8°C)	32일
표준원액 안정성	실온	6시간
(Betulinic acid)	냉장 (2°C ~ 8°C)	32일

[표 46] 랫드 혈장에서의 ursolic acid 분석

생체시료 (항응고제)	SD 랫드 혈장 (헤파린 나트륨)	
표준물질 / 내부표준물질	Ursolic acid / Betulinic acid	
정량범위 (가중치, 상관계수 r)	2 ng/mL ~ 100 ng/mL ($1/X^2$, ≥ 0.9983)	
선택성	적합 (알수 각 3마리)	
생체시료 효과	적합 (알수 각 3마리)	
MA-QL 및 MA-QH	정확성	107.0% 및 101.9%
	정밀성	6.3% 및 3.8%
캐리오버	적합	
시험 내 재현성	적합	
LLOQ	정확성	105.9%
	정밀성	6.5%
QL, QM 및 QH	정확성	95.3%, 98.4% 및 101.2%
	정밀성	12.5%, 4.5% 및 4.4%
시험 간 재현성 (3일)	적합	
LLOQ	정확성	102.9%
	정밀성	9.1%
QL, QM 및 QH	정확성	101.2%, 104.0% 및 103.8%
	정밀성	5.9%, 5.3% 및 3.1%
회수율	적합	
표준물질 (QL, QM 및 QH)	회수율	77.3%, 91.4% 및 92.9%
	정밀성	0.5% ~ 13.8%
희석의 타당성 (5배 희석)	적합	
5F-DQC	정확성	105.3%
	정밀성	1.4%
안정성	적합	
냉·해동 안정성	냉동 (-25°C ~ -10°C)/실온	2회
	초저온냉동 (-80°C ~ -60°C)/실온	2회
단기 안정성	실온	24시간
장기 안정성	냉동 (-25°C ~ -10°C)	39일
	초저온냉동 (-80°C ~ -60°C)	39일
전처리 시료의 안정성	Preset 10°C	52시간
표준원액 안정성	실온	6시간
(Ursolic acid)	냉장 (2°C ~ 8°C)	57일

- SD 랫드 혈장 중 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 농도 측정을 위해 Betulinic acid를 내부표준물질로 사용하였으며, SD 랫드 혈장 50 μ L로부터 Oleanolic acid, Ursolic acid 및 Betulinic acid를 Ethyl acetate / Hexane (4:1, v/v)로 추출하고, 질소 농축한 후 재용해하여 LC/MS/MS로 측정하였음.

7) TK validation(비글) 완료 (첨부7. 비글견 TK validation 보고서)

- 본 시험에서는 Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (이하 LC/MS/MS)를 이용하여 비글견 혈장 중 Oleanolic acid 비글견 혈장 중 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 농도 측정을 위해 Betulinic acid를 내부표준물질로 사용하였으며, 비글견 혈장 50 μ L로부터 Oleanolic acid, Ursolic acid 및 Betulinic acid를 Ethyl acetate / Hexane (4:1, v/v)로 추출하고, 질소 농축한 후 재용해하여 LC/MS/MS로 측정하였음. 및 Ursolic acid의 동시 분석방법에 대한 유효성 검증 (이하 validation)을 실시하였음.
- 아래 표는 validation 항목의 결과로, 본 기관에서 확인한 분석방법은 비글견 혈장 중 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 농도 측정에 적용 가능하다고 판단됨.

[표 47] 비글견 혈장에서의 oleanolic acid 분석

생체시료 (항응고제)	비글견 혈장 (헤파린 나트륨)	
표준물질 / 내부표준물질	Oleanolic acid / Betulinic acid	
정량범위 (가중치, 상관계수 r)	2 ng/mL ~ 100 ng/mL* ($1/X^2$, ≥ 0.9980)	
선택성	부적합* (알수 각 3마리)	
생체시료 효과	적합 (알수 각 3마리)	
MA-QL 및 MA-QH	정확성	108.3% 및 100.8%
	정밀성	0.9% 및 2.7%
캐리오버	적합	
시험 내 재현성	적합	
LLOQ	정확성	96.4%
	정밀성	4.7%
QL, QM 및 QH	정확성	102.5%, 100.3% 및 98.3%
	정밀성	1.0%, 2.0% 및 1.0%
시험 간 재현성 (3일)	적합	
LLOQ	정확성	100.3%
	정밀성	3.5%
QL, QM 및 QH	정확성	104.3%, 104.1% 및 101.8%
	정밀성	2.6%, 4.0% 및 3.1%
회수율	적합	
표준물질 (QL, QM 및 QH)	회수율	84.8%, 91.7% 및 89.1%
	정밀성	0.7% ~ 10.2%
내부표준물질	회수율	89.3%
	정밀성	4.7% 및 8.8%
회색의 타당성 (5배 희석)	적합	
5F-DQC	정확성	96.5%
	정밀성	2.4%
안정성	적합	
냉·해동 안정성	냉동 (-25°C ~ -10°C)/실온	3회
	초저온냉동 (-80°C ~ -60°C)/실온	3회
단기 안정성	실온	24시간
장기 안정성	냉동 (-25°C ~ -10°C)	31일
	초저온냉동 (-80°C ~ -60°C)	31일
전처리 시료의 안정성	Preset 10°C	50시간

[표 48] 비글견 혈장에서의 ursolic acid 분석

생체시료 (항응고제)	비글견 혈장 (헤파린 나트륨)	
표준물질 / 내부표준물질	Ursolic acid / Betulinic acid	
정량범위 (가중치, 상관계수 r)	2 ng/mL ~ 100 ng/mL* (1/X ² , ≥ 0.9968)	
선택성	적합 (약수 각 3마리)	
생체시료 효과	적합 (약수 각 3마리)	
MA-QL 및 MA-QH	정확성	114.6% 및 112.0%
	정밀성	2.8% 및 2.2%
캐리오버	부적합*	
시험 내 재현성	적합	
LLOQ	정확성	101.0%
	정밀성	10.7%
QL, QM 및 QH	정확성	106.7%, 102.8% 및 101.0%
	정밀성	0.7%, 2.4% 및 0.8%
시험 간 재현성 (3일)	적합	
LLOQ	정확성	100.4%
	정밀성	1.4%
QL, QM 및 QH	정확성	103.5%, 104.8% 및 100.4%
	정밀성	3.0%, 3.6% 및 2.1%
회수율	적합	
표준물질 (QL, QM 및 QH)	회수율	90.3%, 93.6% 및 87.9%
	정밀성	1.2% ~ 5.6%
희석의 타당성 (5배 희석)	적합	
5F-DQC	정확성	94.7%
	정밀성	3.4%
안정성	적합	
냉-해동 안정성	냉동 (-25°C ~ -10°C)/실온	3회
	초저온냉동 (-80°C ~ -60°C)/실온	3회
단기 안정성	실온	24시간
장기 안정성	냉동 (-25°C ~ -10°C)	31일
	초저온냉동 (-80°C ~ -60°C)	31일
전처리 시료의 안정성	Preset 10°C	50시간

8) 유전독성시험 - 복귀돌연변이시험 완료 (첨부8. 유전독성-복귀돌연변이 보고서)

- 본시험의 용량을 설정하기 위해, 10,000 $\mu\text{g/plate}$ [곰보배추95%에탄올 건조엑스(10→1)로 5,000 $\mu\text{g/plate}$]를 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 2,500, 625, 156 및 39.1 $\mu\text{g/plate}$ 로 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA98 균주의 2,500 $\mu\text{g/plate}$ 이상, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 625 $\mu\text{g/plate}$ 이상, 존재하의 TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 10,000 $\mu\text{g/plate}$ 에서 관찰되었음. 대사활성화비존재하 WP2uvrA(pKM101) 균주, 존재하의 TA98 및 WP2uvrA(pKM101) 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았음.
- 따라서, 본시험의 용량은 오판과 같이 설정하였으며, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였음.
- 시험물질 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주) 및 트립토판 요구성 대장균 (WP2uvrA(pKM101) 균주)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 대해 각각 검토하였음.
- 본시험의 결과, 시험물질군에서 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이 콜로니 수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았음. 또한, 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이 콜로니 수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였음.
- 이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)의 유전자돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단됨.

[표 49] 복귀돌연변이시험 용량 설정

균주명	S9 mix	본시험의 용량 ($\mu\text{g/plate}$)
TA98	-	2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1
	+	10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625
TA100, TA1535, TA1537	-	625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5
	+	10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
WP2uvrA(pKM101)	-/+	10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625

[표 50] 복귀돌연 Colonies수 측정

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	0.5% CMC-Na solution	0	17 , 21 , 20	19	2
		78.1	23 , 21 , 18	21	3
		156	23 , 30 , 29	27	4
	Test substance	313	19 , 19 , 23	20	2
		625	18 , 15 , 17	17	2
		1,250	22 , 25 , 28	25	3
		2,500†	23* , 19* , 23*	22	2
2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	584 , 590 , 605	593	11	
TA100	0.5% CMC-Na solution	0	99 , 98 , 101	99	2
		19.5	99 , 100 , 95	98	3
		39.1	111 , 97 , 99	102	8
	Test substance	78.1	107 , 95 , 94	99	7
		156	93 , 90 , 101	95	6
		313	99* , 102* , 94*	98	4
		625	80* , 80* , 91*	84	6
Sodium azide (SA)	1.5	552 , 580 , 574	569	15	
TA1535	0.5% CMC-Na solution	0	14 , 12 , 14	13	1
		19.5	14 , 12 , 11	12	2
		39.1	13 , 12 , 10	12	2
	Test substance	78.1	16 , 17 , 21	18	3
		156	7 , 8 , 11	9	2
		313	15 , 10 , 13	13	3
		625	13* , 11* , 14*	13	2
Sodium azide (SA)	1.5	472 , 466 , 484	474	9	
TA1537	0.5% CMC-Na solution	0	12 , 9 , 9	10	2
		19.5	6 , 7 , 6	6	1
		39.1	11 , 8 , 9	9	2
	Test substance	78.1	9 , 9 , 7	8	1
		156	8 , 6 , 7	7	1
		313	6 , 7 , 7	7	1
		625	9* , 7* , 6*	7	2
9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	588 , 594 , 602	595	7	
WP2uvrA (pKM101)	0.5% CMC-Na solution	0	118 , 130 , 121	123	6
		625	140 , 127 , 131	133	7
		1,250	161 , 149 , 169	160	10
	Test substance	2,500†	160 , 143 , 136	146	12
		5,000†	121 , 148 , 142	137	14
		10,000†	158 , 164 , 147	156	9
		2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)	0.005	972 , 886 , 994	951

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

†: Precipitation

0.5% CMC-Na solution : 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	0.5% CMC-Na solution	0	25 , 27 , 28	27	2
		625	25 , 25 , 28	26	2
		1,250	40 , 44 , 32	39	6
	Test substance	2,500†	34 , 32 , 30	32	2
		5,000†	24 , 24 , 30	26	3
		10,000†	25 , 30 , 24	26	3
2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	342 , 358 , 366	355	12	
TA100	0.5% CMC-Na solution	0	107 , 98 , 117	107	10
		313	115 , 108 , 102	108	7
		625	109 , 91 , 96	99	9
	Test substance	1,250	108 , 96 , 97	100	7
		2,500†	121 , 101 , 105	109	11
		5,000†	83 , 78 , 81	81	3
10,000†	52* , 50* , 63*	55	7		
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	648 , 664 , 622	645	21	
TA1535	0.5% CMC-Na solution	0	9 , 8 , 11	9	2
		313	10 , 11 , 8	10	2
		625	8 , 12 , 9	10	2
	Test substance	1,250	13 , 9 , 13	12	2
		2,500†	11 , 10 , 14	12	2
		5,000†	16 , 13 , 13	14	2
10,000†	8* , 9* , 7*	8	1		
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	108 , 112 , 100	107	6	
TA1537	0.5% CMC-Na solution	0	14 , 15 , 11	13	2
		313	14 , 12 , 12	13	1
		625	15 , 13 , 16	15	2
	Test substance	1,250	15 , 12 , 13	13	2
		2,500†	14 , 16 , 13	14	2
		5,000†	8 , 11 , 11	10	2
10,000†	8* , 6* , 8*	7	1		
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	142 , 144 , 158	148	9	
WP2uvrA (pKM101)	0.5% CMC-Na solution	0	137 , 143 , 126	135	9
		625	176 , 188 , 179	181	6
		1,250	187 , 176 , 171	178	8
	Test substance	2,500†	173 , 175 , 175	174	1
		5,000†	185 , 176 , 169	177	8
		10,000†	189 , 188 , 175	184	8
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	482 , 494 , 502	493	10	

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

†: Precipitation

0.5% CMC-Na solution : 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution

9) 유전독성시험 - 염색체이상시험 완료 (첨부9. 유전독성-염색체이상시험 보고서)

- 본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 10,000 $\mu\text{g/mL}$ [곰보배추95%에탄올 건조엑스 (10→1)로 5,000 $\mu\text{g/mL}$]를 최고용량으로 하고, 이하 5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1 및 39.1 $\mu\text{g/mL}$ 로 세포증식억제시험을 실시한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재 하에서 세포독성이 관찰되었음. 50% 이상 세포증식을 억제하는 용량은 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 156 $\mu\text{g/mL}$ 이상 및 존재하는 625 $\mu\text{g/mL}$ 이상, 연속처리법의 대사활성화비존재하는 313 $\mu\text{g/mL}$ 이상이었음.
- 따라서 본시험의 최고용량은 세포증식을 약 55% 이상 억제하는 용량으로 하여 설정하였으며, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였음.
- 시험물질 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)의 염색체이상 유발성 유무를 검토하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용하여 염색체이상시험을 실시하였음.
- 본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재 하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았음. 또한, 각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상으로 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었음.
- 이상의 결과로부터 본 시험조건 하에서 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)는 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 판단됨.

[표 51] 염색체이상시험 용량 설정

계열	S9 mix	본시험의 용량 ($\mu\text{g/mL}$)
단시간처리법	-	140, 70.0, 35.0, 17.5
	+	560, 280, 140, 70.0
연속처리법	-	180, 90.0, 45.0, 22.5

[표 52] 염색체이상 출현빈도

Test substance	Dose (µg/mL)	RPD (%)	SP mix	Trt-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations								Number of cells with numerical aberrations			Others ^{a)}				
						ctb	csb	cte	cse	frg	gap		total (%)		end	pol		total (%)			
											ctg	csg	gap-	gap+							
0.5% CMC-Na solution	0	100	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test substance	17.5	99.3	-	6-18	100	not observed															
					100	not observed															
	35.0	101	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	70.0†	97.9	-	6-18	100	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
					100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	140†	73.1	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC	0.1	83.5	-	6-18	100	1	0	17	1	0	0	0	0	56*	56	0	0	0	0		
					100	9	0	30	0	0	0	0	0	(28.0)	(28.0)	0	0	0	0	0	0
0.5% CMC-Na solution	0	100	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test substance	70.0†	94.1	+	6-18	100	not observed															
					100	not observed															
	140†	95.6	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
					100	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	280†	82.1	+	6-18	100	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	3	0	0	0	0
					100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	560†	41.4	+	6-18	100	1	0	1	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0
					100	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B[a]P	20	24.4	+	6-18	100	10	0	19	1	0	0	0	48*	48	0	0	0	0	0	0	
					100	2	0	23	0	0	0	0	(24.0)	(24.0)	0	0	0	0	0	0	0
0.5% CMC-Na solution	0	100	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Test substance	22.5†	94.4	-	24-0	100	not observed															
					100	not observed															
	45.0†	84.0	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	90.0†	63.5	-	24-0	100	0	0	0	0	0	1	0	1	0.5	2	0	0	0	0	0	0
					100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	180†	47.0	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.5	1	0	0	0	0	0
					100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMC	0.1	72.9	-	24-0	100	12	0	31	0	0	0	0	74*	74	0	0	0	0	0	0	
					100	10	0	28	0	0	0	0	(37.0)	(37.0)	0	0	0	0	0	0	0

Aberration; ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, frg: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene, 0.5% CMC-Na solution : 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution

RPD : Relative Population Doubling, Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap

a) Others: were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

†: Precipitation

Significant difference from negative control by fisher's exact test : * p<0.01

Historical control values of structural aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Structural aberration cells without gap (%) (Mean±S.D.)			Range (%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	129	0.1	±	0.2	0	<5
	+	6-18	129	0.1	±	0.3	0	<5
	-	24-0	123	0.1	±	0.2	0	<5
Positive	-	6-18 ^{a)}	117	21.0	±	4.9	10≤	35.8*
	+	6-18 ^{b)}	129	20.2	±	5.1	10≤	35.5*
	-	24-0 ^{b)}	113	31.1	±	7.5	10≤	53.6*

Historical control values of numerical aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Numerical aberration cells (%) (Mean±S.D.)			Range (%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	129	0.2	±	0.3	0	<5
	+	6-18	129	0.2	±	0.4	0	<5
	-	24-0	123	0.2	±	0.4	0	<5

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, 0.5% methyl cellulose 1500centipoise solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution, Acetone, Tetrahydrofuran, etc.

a : Mitomycin C (0.1 µg/mL)

b : Benzo[a]pyrene (20 µg/mL)

N : The total number of chromosome aberration test

The above historical control values were obtained from the data pooled from Jan. 3, 2013 to Apr. 25, 2015.

* : The range was calculated by the control limit from Mean+3S.D.

10) 유전독성시험 - 소핵시험 완료 (첨부10. 유전독성-소핵시험 보고서)

- 본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 4,000 mg/kg [곰보배추95%에탄올 건조엑스 (10→1)로 2,000 mg/kg/day]을 최고용량으로 하고, 이하 2,000, 1,000, 500 및 250 mg/kg으로 용량설정시험을 실시한 결과, 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 사망동물은 관찰되지 않았음. 투여 후 2일에 1,000 mg/kg 이상의 용량에서 암수 모두 시험물질 색변이 관찰되었음.
- 따라서, 본시험의 최고용량은 4,000 mg/kg으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (2,000 및 1,000 mg/kg)의 시험물질군을 설정하였음. 또한, 음성대조군에는 0.5% CMC-Na 수용액을, 양성대조군에는 Mitomycin C를 설정하였음.
- 검체 제작 설정시험에서는 용량설정시험에서 설정된 최고용량 (4,000 mg/kg)을 투여한 후, 투여 후 24, 48 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵유발은 증가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 설정하였음.
- 시험물질 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발 유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구투여하여 검토하였음.
- 본시험의 결과, 시험물질군의 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았음. 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았음.
- 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 유의하게 증가하였음. 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았음.
- 이상의 결과로부터 시험물질 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)는 본 시험의 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발성은 없는 것으로 판단됨.

[표 53] 소핵유발 출현빈도

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE	
Negative control	0.5% CMC-Na solution	0	P.O.	24	1101	167 / 500	1 / 2000
					1102	184 / 500	1 / 2000
					1103	187 / 500	1 / 2000
					1104	152 / 500	1 / 2000
					1105	154 / 500	0 / 2000
					Total	844 / 2500	4 / 10000
					% (Mean±S.D.)	33.8 ± 3.27	0.040 ± 0.022
Test Substance	1,000	P.O.	24	1201	168 / 500	0 / 2000	
				1202	159 / 500	1 / 2000	
				1203	123 / 500	1 / 2000	
				1204	137 / 500	1 / 2000	
				1205	169 / 500	0 / 2000	
				Total	756 / 2500	3 / 10000	
					% (Mean±S.D.)	30.2 ± 4.07	0.030 ± 0.027
Test Substance	2,000	P.O.	24	1301	149 / 500	0 / 2000	
				1302	154 / 500	0 / 2000	
				1303	181 / 500	2 / 2000	
				1304	167 / 500	2 / 2000	
				1305	156 / 500	1 / 2000	
				Total	807 / 2500	5 / 10000	
					% (Mean±S.D.)	32.3 ± 2.56	0.050 ± 0.050
Test Substance	4,000	P.O.	24	1401	162 / 500	0 / 2000	
				1402	196 / 500	1 / 2000	
				1403	158 / 500	1 / 2000	
				1404	124 / 500	0 / 2000	
				1405	192 / 500	1 / 2000	
				Total	832 / 2500	3 / 10000	
					% (Mean±S.D.)	33.3 ± 5.85	0.030 ± 0.027
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	141 / 500	126 / 2000
					1502	172 / 500	120 / 2000
					1503	158 / 500	131 / 2000
					1504	157 / 500	135 / 2000
					1505	162 / 500	144 / 2000
					Total	790 / 2500	656† / 10000
					% (Mean±S.D.)	31.6 ± 2.24	6.560 ± 0.455

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

MMC: Mitomycin C

S.D.: Standard Deviation

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Nonochromatic erythrocyte

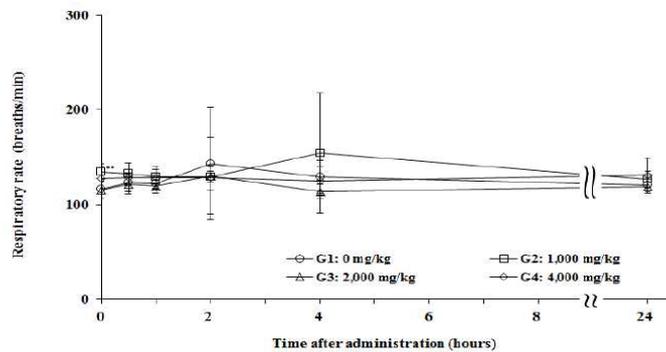
MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

0.5% CMC-Na solution: 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution

Significant difference from negative control by Kastenbaum & Bowman; † p<0.01

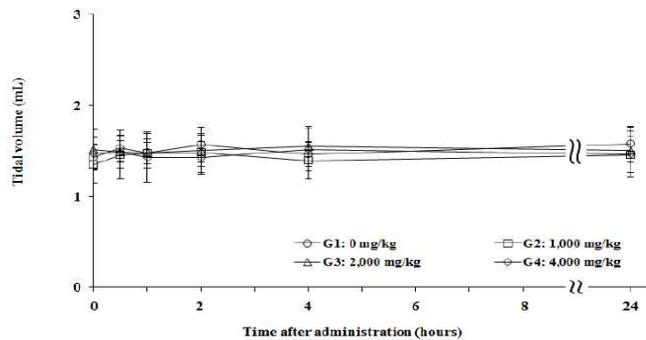
11) 안전성약리시험 - 호흡기계 완료 (첨부11. 안전성약리-호흡기계 보고서)

- 군구성은 대조군과 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 총 4 군으로 설정하여 각 군당 6 마리씩 투여하였고, 대조군은 부형제인 0.5% CMC-Na 수용액을 투여하였음.
- 호흡기능에 관한 시험물질의 잠재적인 영향은 whole body plethysmography 를 이용하여 호흡기계 parameters 를 투여 전 (0 시간), 투여 후 0.5, 1, 2, 4 및 24 시간째에 측정하여 평가하였음.
- 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 분당호흡수, 1 회 호흡량 및 분당호흡량은 투여 후 모든 측정시점에서 시험물질의 투여에 의한 변화는 나타나지 않았음.
- 본 시험은 6 주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫드에 시험물질인 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1) 를 단회 경구투여하고, 무마취·무구속 상태 하에서 호흡기계 parameter (분당호흡수 (respiratory rate), 1 회 호흡량 (tidal volume) 및 분당호흡량 (minute volume))를 측정하여 호흡기계에 미치는 영향을 평가하였음.
- 이상의 결과로부터, 본 시험 조건하의 랫드를 이용한 단회 경구투여에서, 시험물질인 곰보배추 95%에탄올건조엑스(10→1)는 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg 용량에서 호흡기계에 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨.



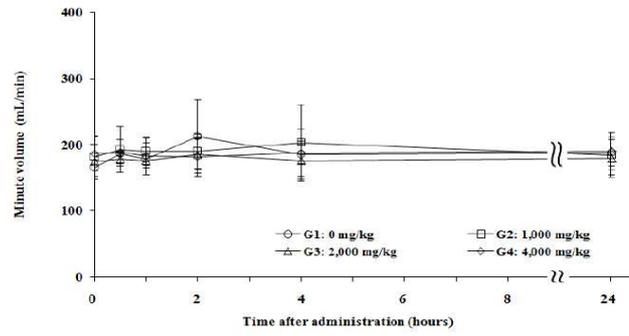
Values are mean ± S.D., N=6
 **p<0.01, Significantly different from the control group (G1) by Dunnett's t-test

[그림 109] Respiratory rate



Values are mean ± S.D., N=6
 No statistically significant differences were noted in the control group (G1) and the test substance dosing groups (G2-G4).

[그림 110] Tidal volume



Values are mean \pm S.D., N=6

No statistically significant differences were noted in the control group (G1) and the test substance dosing groups (G2-G4).

[그림 111] Minute volume

12) 안전성약리시험 - 중추신경계 (첨부12. 안전성약리-중추신경계 보고서)

- 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 이동구획수 및 일어서기 횟수는 투여 후 0.5, 1, 2 및 4 시간째에서 대조군과 비교하여 감소하는 경향을 나타냈고, 이 중 2,000 및 4,000 mg/kg 용량의 시험물질투여군의 투여 후 0.5 시간째의 이동구획수는 통계학적으로 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 시험물질의 원료인 고펜배추 (*Salvia plebeian*)의 주요 성분인 polyphenol 화합물이 진정효과 (sedative)를 나타내는 것으로 알려진 것에 기인된 변화로 사료됨. 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg 용량의 시험물질투여군은 기능관찰시험의 그 외 parameter에서는 시험물질의 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았음.

[표 54] 중추신경계 검사 중 일반증상 관찰

Group/ Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical findings ^{*)}				
		Experiment date				
		2/22	2/23	2/24	2/25	2/26
G1 0	1101	-	-	-	-	-
	1102	-	-	-	-	-
	1103	-	-	-	-	-
	1104	-	-	-	-	-
G2 1,000	1201	-	-	-	-	-
	1202	-	-	-	-	-
	1203	-	-	-	-	-
	1204	-	-	-	-	-
G3 2,000	1301	-	CS	-	-	-
	1302	-	-	CS	-	-
	1303	-	-	-	CS	-
	1304	-	-	-	-	CS
G4 4,000	1401	-	CS	-	-	-
	1402	-	-	CS	-	-
	1403	-	-	-	CS	-
	1404	-	-	-	-	CS

^{*)} Clinical findings were observed prior to conduct of FOB.

-, No Observable Abnormality

CS: Compound-colored stool

Group/ Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical findings ^{*)}				
		Experiment date				
		2/29	3/1	3/2	3/3	3/4
G1 0	1105	-	-	-	-	-
	1106	-	-	-	-	-
	1107	-	-	-	-	-
	1108	-	-	-	-	-
G2 1,000	1205	-	-	-	-	-
	1206	-	-	-	-	-
	1207	-	-	-	-	-
	1208	-	-	-	-	-
G3 2,000	1305	-	-	-	-	-
	1306	-	-	-	-	-
	1307	-	-	-	-	-
	1308	-	-	-	-	CS
G4 4,000	1405	-	CS	-	-	-
	1406	-	-	CS	-	-
	1407	-	-	-	CS	-
	1408	-	-	-	-	CS

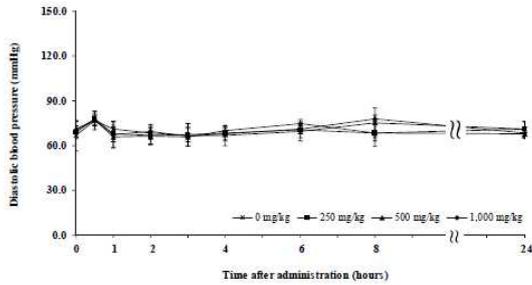
^{*)} Clinical findings were observed prior to conduct of FOB.

-, No Observable Abnormality

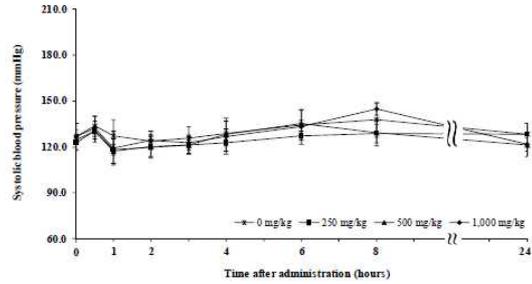
CS: Compound-colored stool

13) 안전성약리시험 - 심혈관계 (첨부13. 안전성약리-심혈관계 보고서)

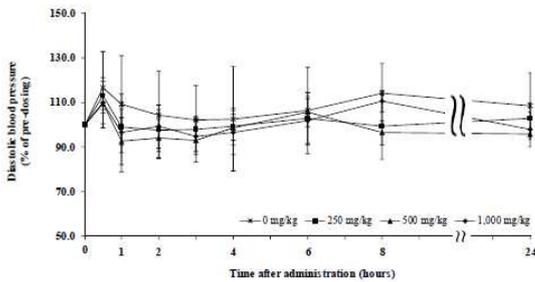
- 혈압 (수축기, 이완기 및 평균 혈압), 심박수 및 심전도의 parameters (PR, QRS, QT 및 QTc interval)에서, 250, 500 및 1,000 mg/kg 용량의 시험물질의 투여에 의한 변화는 나타나지 않았음. 체온에서, 250, 500 및 1,000 mg/kg 용량의 시험물질의 투여에 의한 변화는 나타나지 않았음. 일반증상관찰에서, 250, 500 및 1,000 mg/kg 용량의 시험물질 투여 시에 시험물질의 투여에 의한 영향으로 사료되는 구토 (Vomiting)가 관찰되었음. 이상의 결과로부터, 본 시험 조건하의 비글견을 이용한 단회 경구 투여에서, 시험물질인 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)는 250, 500 및 1,000 mg/kg 용량에서 심혈관계에 미치는 영향이 없는 것으로 판단됨.



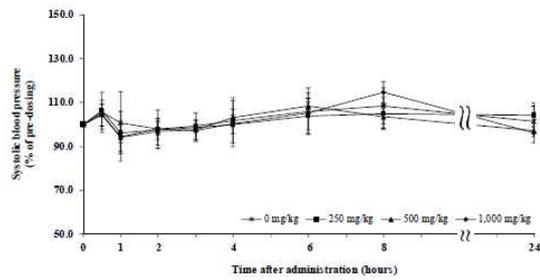
Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.
No statistically significant differences were noted between the control values (0 mg/kg) and the test substance dose level values (250, 500 and 1,000 mg/kg).



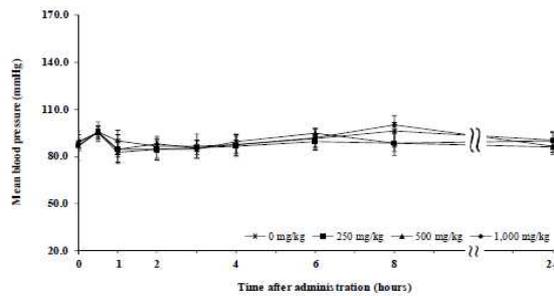
Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.
No statistically significant differences were noted between the control values (0 mg/kg) and the test substance dose level values (250, 500 and 1,000 mg/kg).



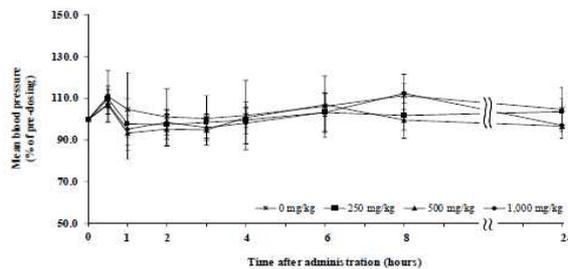
Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.



Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.

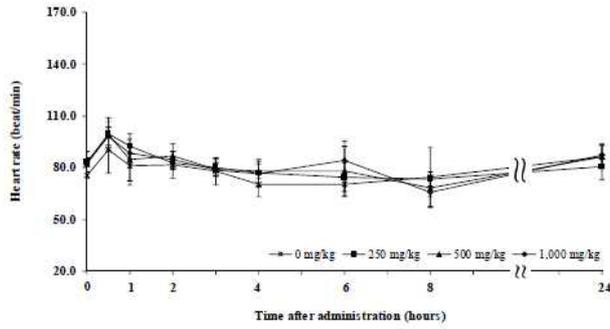


Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.
No statistically significant differences were noted between the control values (0 mg/kg) and the test substance dose level values (250, 500 and 1,000 mg/kg).

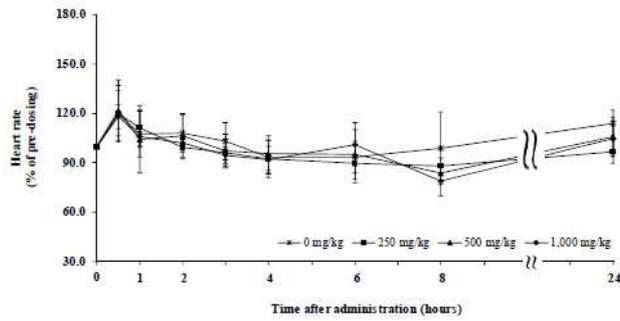


Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.

[그림 112] 혈압 측정

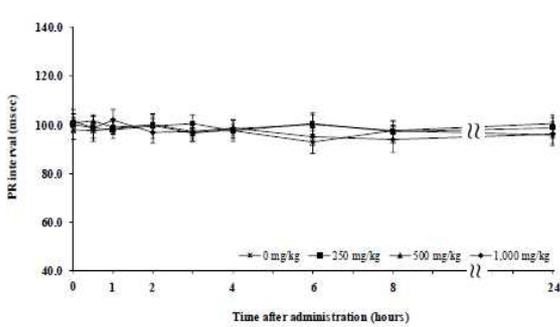


Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.
 No statistically significant differences were noted between the control values (0 mg/kg) and the test substance dose level values (250, 500 and 1,000 mg/kg).

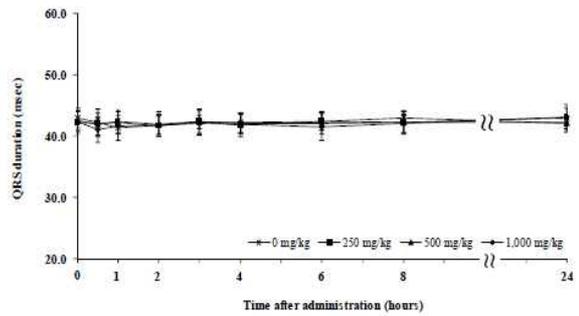


Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.

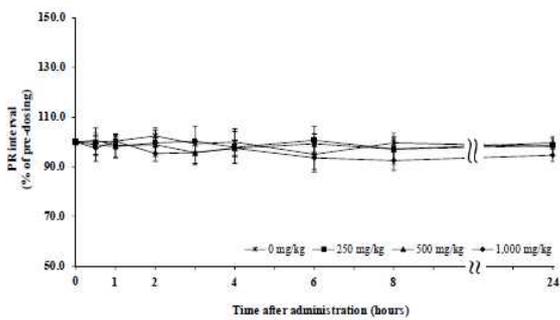
[그림 113] 심박 수 측정



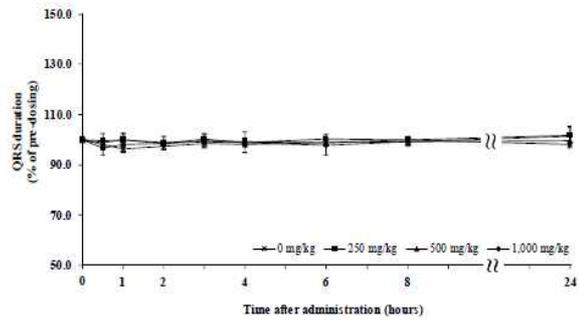
Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.
 No statistically significant differences were noted between the control values (0 mg/kg) and the test substance dose level values (250, 500 and 1,000 mg/kg).



Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.
 No statistically significant differences were noted between the control values (0 mg/kg) and the test substance dose level values (250, 500 and 1,000 mg/kg).



Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.

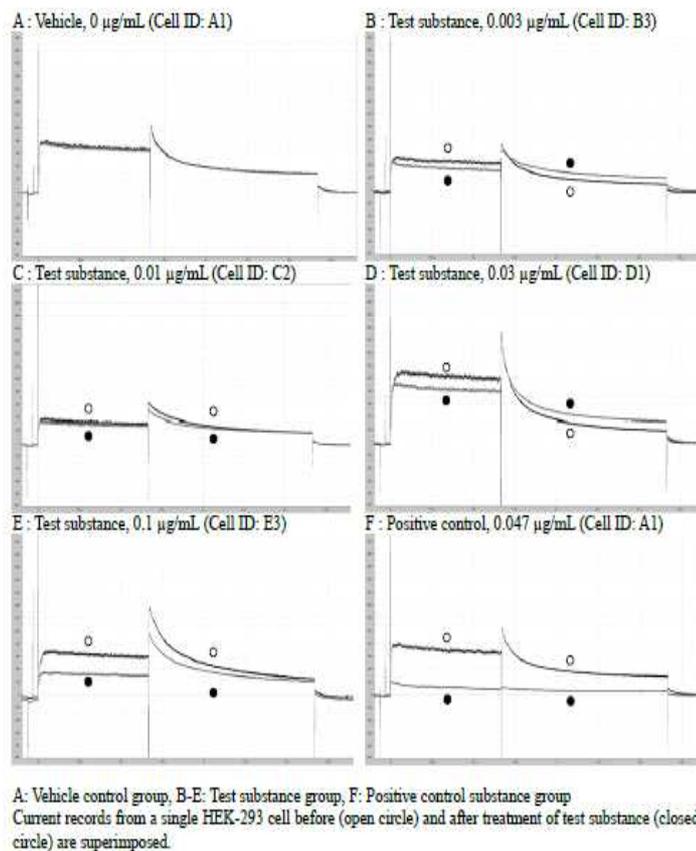


Each interval represented the mean \pm S.D. of four dogs.

[그림114] 심전도 측정

14) 안전성약리시험 - hERG assay (첨부14. 안전성약리-hERG assay 보고서)

- 시험물질군의 처리농도는 0.003, 0.01, 0.03 및 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 로 설정하였고, 부형제 대조군은 external bath solution을 처리하였으며, 각 농도 당 3 개의 세포를 적용하였음. 양성대조군은 0.047 $\mu\text{g/mL}$ (0.1 μM)의 E-4031을 처리하였고, 각 실험당일에 부형제 대조군 또는 각 농도별 시험물질군의 검사대상 물질에 대한 hERG channel currents의 기록이 종료된 임의의 1 개 세포에 적용하였음.
- 0.003, 0.01, 0.03 및 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 시험물질군의 hERG channel currents의 억제율 (Compensated suppression rate, %)은 각각 10.57 ± 4.79 , 12.35 ± 5.01 , 17.68 ± 9.03 및 $18.62 \pm 6.61\%$ (n=3)로서 0.03 및 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 시험물질군은 부형제 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 나타냄.
- 본 시험은 human Ether-à-go-go Related Gene (hERG)을 도입하여 hERG 칼륨 이온 채널을 안정하게 발현시킨 HEK-293 세포에 시험물질인 곰보배추95% 에탄올건조엑스(10→1)를 적용하여 hERG channel currents에 미치는 영향을 평가하였음.
- 이와 동일한 조건하에서 양성대조물질로 사용한 0.047 $\mu\text{g/mL}$ (0.1 μM) 농도의 E-4031 처리 시의 hERG channel currents가 대부분 억제 (Compensated suppression rate: $92.81 \pm 3.30\%$)된 점으로 볼 때, 본 시험법은 시험물질의 hERG channel currents에 미치는 영향을 평가하기 위해 적합한 것으로 판단됨.
- 이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 hERG 유전자가 도입된 HEK-293 세포를 이용한 hERG channel currents에 미치는 영향 평가에서, 시험물질인 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)는 용해도를 고려하여 적용 가능한 최고농도인 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 까지 처리한 결과 hERG channel currents의 최대 억제율은 $18.62 \pm 6.61\%$ 로써 IC_{50} 값은 산출하지 않았음.



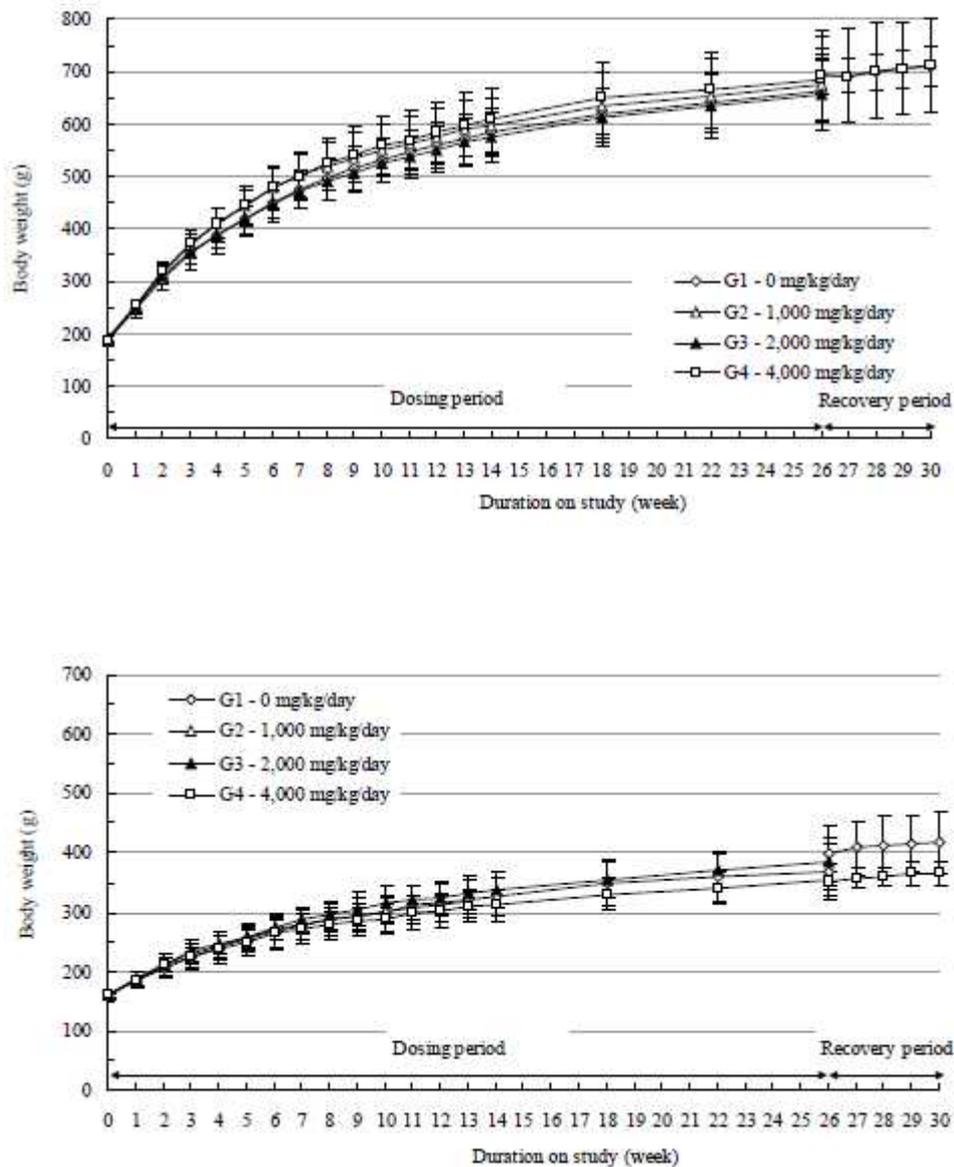
[그림 115] hERG channel current에 미치는 영향

15) 설치류(랫드) 26주 반복투여독성시험 완료 (첨부15. 설치류(랫드) 26주 반복투여독성시험 보고서)

- 본 시험은 곰보배추 95%에탄올건조엑스 (10→1)를 Sprague-Dawley 암수 랫드에 26주간 1일 1회 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하며, 독성동태시험을 통해 시험물질의 전신노출도를 평가하기 위하여 실시하였음.
- 시험물질은 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg/day의 3개 용량으로 암수 군당 각각 10, 10 및 15마리에 26주간 경구투여하였음. 또한 대조군 (0.5% Carboxymethylcellulose sodium salt 수용액)을 설정하여 암수 각 15마리에 26주간 경구투여하였음. 대조군 및 4,000 mg/kg/day 투여군에는 암수 각 5마리에 대하여 독성의 가역성을 평가하기 위해 4주간의 회복기간을 두었음.
- 관찰기간 동안 일반증상 관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였음. 독성동태시험군은 투여 1, 91일 및 182일에 각 시간대별로 채혈하여 독성동태분석을 실시하였음.
- 본 시험에서 시험물질의 투여와 관련된 사망동물은 관찰되지 않았음. 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 부검에 있어서 시험물질에 의한 독성 영향은 관찰되지 않았음.
- 2,000 mg/kg/day 투여군의 암컷 1마리 (개체번호: 2306)가 투여 144일에 사망하였는데, 주요 사망원인은 단핵세포백혈병 (랫드에서 자연발생적 또는 유발적으로 관찰됨)에 의한 것으로 시험물질의 독성학적 영향과는 무관한 우발적인 사망으로 판단됨.
- 일반증상 관찰 결과, 시험물질색변 및 유연이 암수 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg/day 투여군에서 투여기간에 용량상관성 있게 지속적 또는 간헐적으로 관찰되었는데, 시험물질색변은 과량의 시험물질의 투여에 의한 것으로, 유연은 시험물질의 물리화학적 특성에 기인한 변화로 독성학적인 의미는 없었음.
- 뇨검사 결과, 요단백 및 요빌리루빈이 주시험군 및 회복군의 수컷 4,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰되었음.
- 장기중량 측정 결과, 간의 절대 또는 상대중량의 증가가 주시험군의 수컷 2,000 및 4,000 mg/kg/day 투여군과 암컷 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg/day 투여군에서, 신장의 절대 및 상대중량의 증가가 주시험군 및 회복군의 수컷 4,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰되었음.
- 조직병리학적 검사 결과, 간에서 변성/위축성 담관상피를 동반한 담관과다형성이 암수 4,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰되어 독성학적으로 의미 있는 변화로 판단한다. 4주 휴약후에는 수컷 4,000 mg/kg/day 투여군 1례에서만 담관 과다형성이 관찰되어 회복성이 있는 것으로 판단됨. 또한, 중심소엽성 간세포비대가 암수 2,000 및 4,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰되었고, 4주 휴약후에는 완전히 회복되었는데, 이는 외인성 물질에 의한 적응성 변화로 독성학적인 의미는 없는 것으로 판단됨. 신장에서 신장피질의 호염기성세뇨관 및 수질의 유리질성 원주의 정도 및 빈도의 증가가 수컷 4,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰되었고, 회복군에서도 여전히 관찰되었는데, 이는 만성진행성신증의 초기증상으로, 실험용 랫드에서 높은 빈도로 발생된다고 알려져 있으며, 사람에게 외삽하는 관점에서 볼 때 독성학적 의미는 없는 것으로 판단됨.
- 독성동태 시험 결과, Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출 (AUClast 및 Cmax)은 투여개시 일에는 대체적으로 투여용량에 따라 증가하는 추세를 보였으나 투여 91일 및 182일에는 뚜렷한 용량상관성 있는 변화를 보이지 않았고, 반복투여에 의한 약물의 축적이나 포화는 없었음.
- 암수 간의 전신노출에 있어서, Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 AUClast가 암컷이 수컷에 비하여 각각 1.5 ~ 64.0 및 2.0 ~ 8.6배 높아 성별간에 차이가 있는 것으로 나타났음.
- 혈장 중 최고농도 도달시간 (Tmax)은 Oleanolic acid 및 Ursolic acid 모두 0.5 ~ 1.0시간으로 나

타났음.

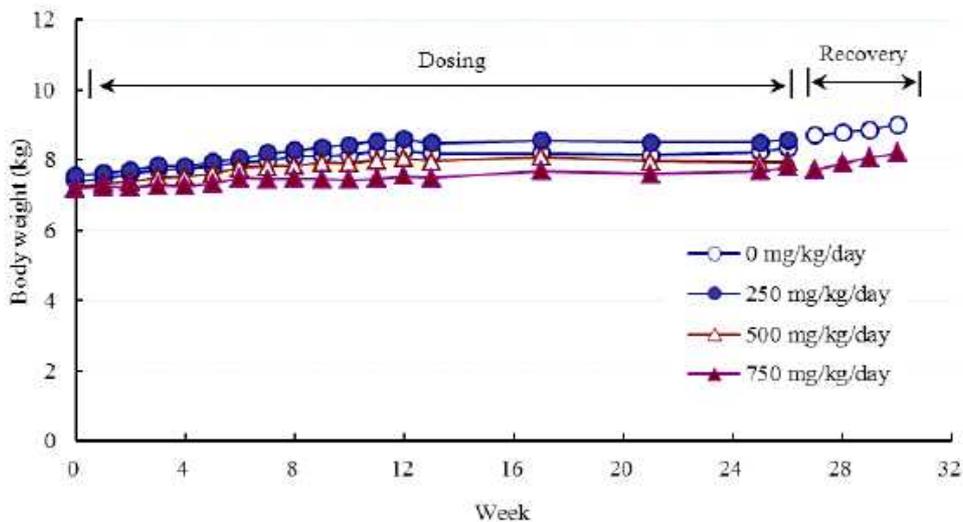
- 이상으로, 본 시험 조건 하에서의 배암차즈기95%에탄올건조엑스 (10→1)의 무독성량 (NOAEL) 은 암수 모두 2,000 mg/kg/day로 판단함.

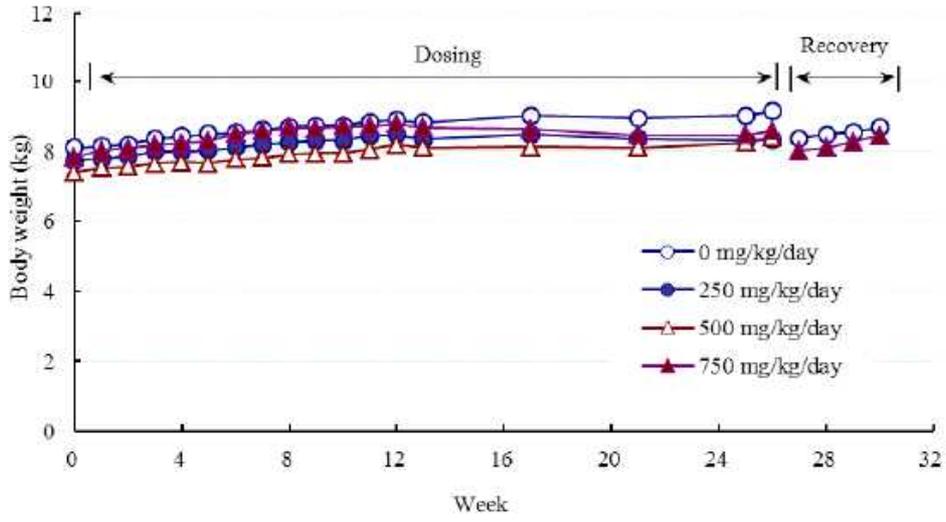


[그림 116] 설치류(랫드) 26주 반복투여독성시험 male 및 female body weights

16) 비설치류(비글) 26주 반복투여독성시험 완료 (첨부16. 비설치류(비글) 26주 반복투여독성시험 보고서)

- 본 시험은 군당 암수 각 3마리의 비글견을 이용하여 시험물질인 곰보배추 95%에탄올건조엑스 (10→1)를 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 2주간 투여하고, 4주간 휴약 후 (Phase 1), 다시 250, 500 및 750 mg/kg/day의 용량으로 26주간 반복 경구투여 (Phase 2) 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 대조군과 고용량군에 암수 각 2마리, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하며, 독성동태시험을 통해 약물의 전신노출도를 평가하기 위하여 실시하였다. 그 결과 전 실험기간 중, 암수 모든 시험군에서 사망동물은 발생하지 않았다.
- Phase 1 시험에서는 2주간의 투여기간 중, 주로 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량에서 구토, 유연, 설사 또는 연변 등 증상이 용량의존적으로 비교적 심하게 나타나고, 체중 및 사료섭취량의 감소가 관찰되었으며, Reti의 감소, APTT, ALT, AST 및 TBA의 증가가 관찰되었다.
- Phase 2 시험에서는 암수 500 및 750 mg/kg/day투여군에서 주로 연변 및 유연이 산발적으로 관찰되고, ALT 및 TBA가 일부개체에서 명확히 증가하였으며, 경미한 간 중량의 증가경향이 관찰되었다. 그 외, 체중, 사료섭취량, 안검사, 심전도 검사 및 부검에서는 시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다. 그러나, 조직병리학적 검사에서는 암수 모든 용량군에서 미미한 정도부터 중등도로 간의 담관 및 섬유소성 조직의 증식이 관찰되고, 간문맥주변의 간세포 공포변성 및 색소침착 등 병리변화가 관찰되었다. 담관 및 섬유소성 증식은 문맥주변에 존재하는 담관으로 많은 미성숙한 담관 및 호산성 섬유소성조직들이 존재하는 것이 특징적이고, 많은 수의 작은 담관들이 중간 크기 또는 큰 담관보다 영향을 더 많이 받은 것으로 나타났다. 저용량 및 중용량군의 일부개체에서는 그 변화가 간소엽의 경계판 (limiting plate) 이내로 국한되지만, 중용량군의 일부개체 및 고용량군에서는 간소엽경계판 또는 근접한 간세포 주변까지 염증성 세포들이 보였다. 또한, 고용량군에서는 담세관의 모양이 틀어져서 정상적인 담관을 찾기 어려웠으며, 회복군에서도 여전히 정상적인 작은 담관은 관찰하기 어려웠다. 그리고, 회복군에서는 담관 및 섬유소성 증식 소견 외, 쿠퍼세포의 비대 및 과다형성 소견이 관찰되었다.
- 이상의 결과에 의해, 본 시험조건 하에 암수 모든 용량군에서 간 담관 및 문맥주위의 변성과 증식 변화가 관찰되어 암수 비글견에 대한 무독성량 (NOAEL)은 구할 수 없었으며, 표적장기는 간으로 판단된다. (첨부자료 17. 비글견 26주 반복투여 독성시험 의견서)





[그림 117] 비설치류(비글) 26주 반복투여독성시험 male 및 female body weights

17) 비설치류(영장류) 독성시험 완료

- 의약품 원료로 사용되는 곰보배추 추출물 (KDC14-1)의 영장류 전임상시험을 위해 대전광역시 유성구에 위치한 전문 전임상 위탁 시험 기관 “한국화학연구원 부설 안전성평가연구소”와 용역 계약을 2016년 12월 01일 체결함.

협약서

서울시 강남구 논현로 28길 34번지 소재 고려제약주식회사(이하 “위탁자”라 한다)와 대전광역시 유성구 가경로 141 소재 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소(이하 “연구소”라 한다)는 위탁시험 용역 협약을 다음과 같이 체결한다.

□ 위탁과제명 : ‘KDC14-1’에 대한 안전성시험 중 Cynomolgus monkey 39주 반복 두어독성시험

- 1) 일반독성시험 (경구두어)
 - Monkey 4주 반복두어 DRF (non-GLP, TK 포함)
 - Monkey 39주 반복두어 (4주 회복군, TK 포함)
- 2) 조제물분석 및 TK 생체시료분석
 - 조제물분석법 feasibility test (1회, 5run/회 이내)
 - 조제물분석법 validation (1회, A, B 동시분석법)
 - 조제물분석 (4회)
 - TK 생체시료분석법 feasibility test (1회, 5run/회 이내)
 - TK 생체시료분석법 validation (1회, A, B 동시분석법)
 - TK 생체시료분석

제1조 (연구의 목적 및 범위)

본 연구의 목적은 “위탁자”의 “‘KDC14-1’에 대한 안전성시험 중 Cynomolgus monkey 39주 반복두어독성시험”(이하 “연구”라 한다)이며, 세부연구내용 및 범위는 연구계획서에 따른다.

제2조 (연구기간)

- 1) 본 연구의 기간은 2016년 12월 1일부터 2018년 8월 31일(21개월)로 하며, “위탁자”와 “연구소” 쌍방의 서면 합의에 의하여 변경할 수 있다.
- 2) 시험물질 인도 지연, 연구시작일 지연 요청 등 “위탁자”의 사유로 연구시작일의 개시가 지연이 될 경우 지연일수 만큼 연구종료일이 자동연장 된다. 단, 양 당사자의 서면합의로 연구기간을 별도 변경하는 경우에는 서면 합의에 따른다.
- 3) 제2조 1항의 연구기간 종료일 내에 양 당사자 간의 합의에 의하여 최종보고서가 확정되지 않을 경우 최종보고서 승인일을 연구종료일로 한다. 단, 최종보고서 제출의 지연사유가 “연구소”에 있는 경우는 제외한다.

제3조 (연구비)

- 1) 본 연구를 수행함에 있어서, “위탁자”는 “연구소”에게 총 시험비로 **₩** **1,000,000,000** 원

[그림 118] 전임상(영장류) 용역계약 협약서

- TK data analysis 및 TK validation 완료

- TK data analysis 및 TK 보고서 완료

독성동태 분석결과, Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast,Day1)은 두 성분 모두 암컷 750 - 1000 mg/kg 구간에서의 감소를 제외하고 투여량의 증가에 따른 증가를 나타냄. 4주간의 반복 투여에 따른 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast)은 투여 첫 날(Day 1)과 비교 시 대체적으로 비슷하거나 감소를 나타냄(Ursolic acid의 암컷 1000 mg/kg 용량군 제외). Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast)은 성별에 따른 큰 차이는 없었음(<2배). 다만, 독성동태 분석의 경우, 다소 부족한 시험군을 대상으로 통계적 유의성과는 상관없이 경향성과 분석 가능성을 나타낸 것으로 39주 반복 독성시험에서 보다 정확한 해석이 가능할 것으로 판단됨.

- 조제물분석법 validation 완료

본 시험은 HPLC를 이용하여 0.5% CMC-Na 중 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스 혼합물(1:1)의 조제물을 분석하기 위한 분석방법을 검증하기 위하여 실시함. Oleanolic acid: 10 ~ 50 µg/mL, Ursolic acid: 10 ~ 50µg/mL의 범위에서 시험물질의 직선성을 확인하였으며, 시험물질이 용리되는 구간에서 희석액, 희석된 부형제, 일점 검량선 용액 및 부형제 중 시험물질 사이에 간섭피크는 존재하지 않음. 확립된 분석방법으로 시스템 적합성, 최저정량한계, 정확성, 정밀성, 캐리오버, 균질성, 안정성, 재주입 재현성을 확인함. 확인결과 시스템 적합성, 최저정량한계, 정확성, 정밀성, 캐리오버의 결과가 판정 기준에 적합하였고, 조제시험물질은 상, 중, 하층에서 균질한 것으로 나타남. 안정성 확인 결과 조제시험물질은 실온에서 약 24시간, 냉장에서 약 7일동안, 자동주입기에서 약 39시간 동안 안정함. 표준용액과 표준원액은 실온에서 약 24시간동안 안정함. 또한 재주입 재현성 측정 결과 자동주입기에서 약 24시간동안 재현성이 있음을 확인함. 이상의 결과를 종합해 보았을 때, 이 분석방법은 0.5% CMC-Na 중 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스혼합물(1:1)의 조제물을 분석하기에 적합함.

- 영장류 4주 반복 투여 DRF 완료 (첨부자료 18. 영장류 4주 DRF 보고서)

본 시험은 시험물질, 곰보배추 95% 에탄올건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스혼합물 (1:1)을 게잡이 원숭이(Cynomolgus monkey)에 0(부형제 대조군), 750, 1000 또는 1500 mg/kg 용량으로 군당 암수 각각 2마리에 4주간 매일 반복 경구투여 후 발현되는 독성 및 독성동태를 평가하고, 39주간 반복 경구투여 독성시험의 용량설정 정보를 얻기 위하여 실시하였음. 시험기간 중 사망률, 일반증상, 체중, 사료섭취량의 변화를 관찰하였고 안과학적 검사, 혈액학적 검사, 응고계 검사, 혈액생화학적 검사, 뇨검사/노화학검사, 육안적 관찰, 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였음

(1) 시험기간 중 사망 동물은 발생하지 않았음.

(2) 일반증상 관찰 결과, 암수 시험물질 투여군에서 투여 직후 유연(salivation)이 일시적 또는 지속적으로 관찰되었음.

(3) 체중측정 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.

(4) 사료섭취량 측정 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.

(5) 안과학적 검사 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.

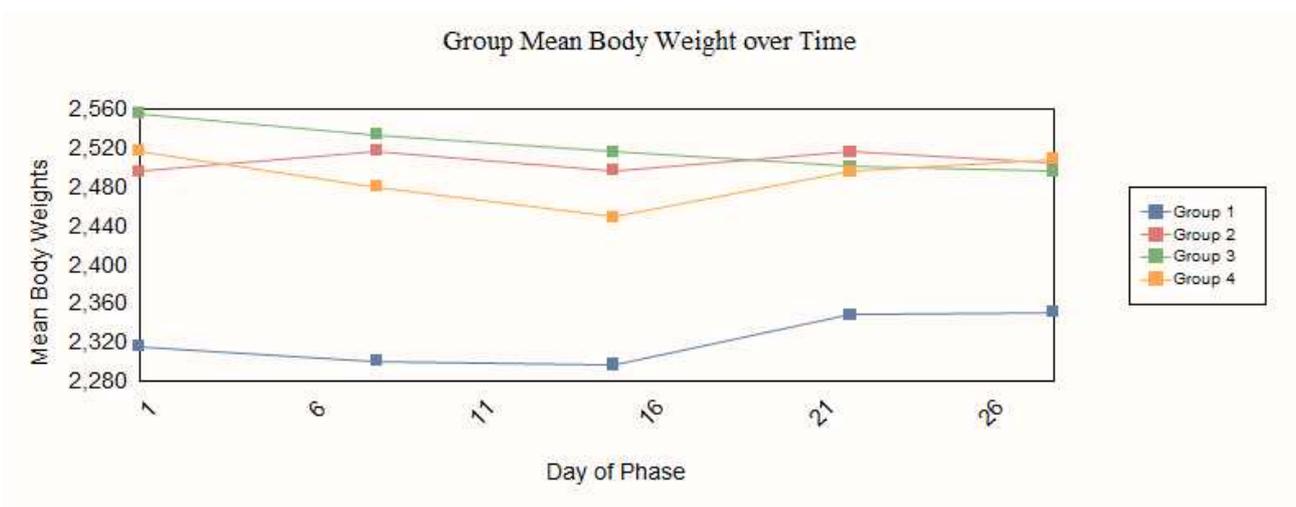
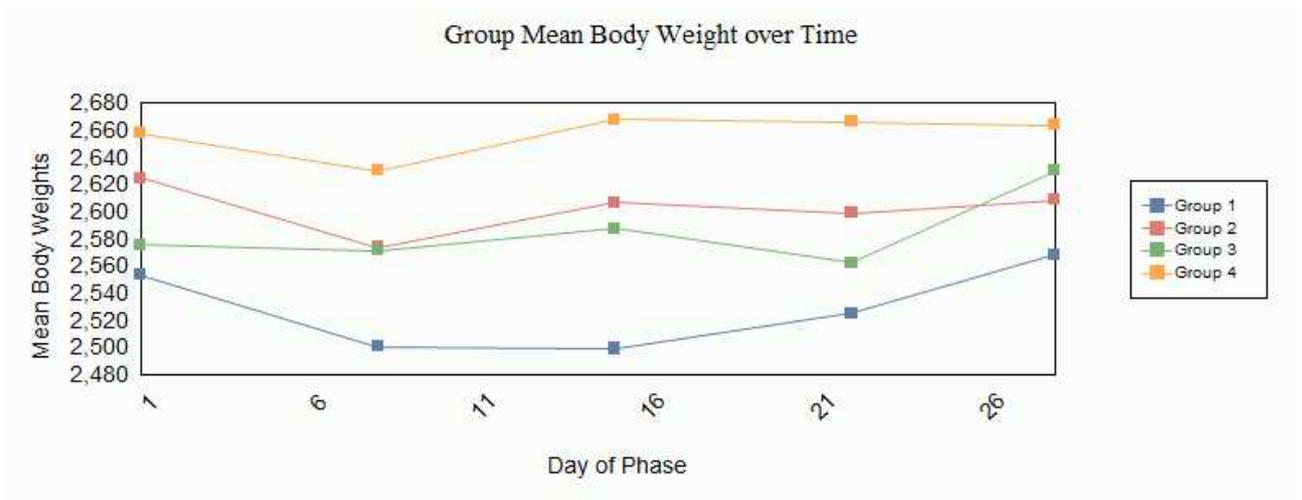
(6) 혈액학적 검사 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.

(7) 응고계 검사 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.

(8) 혈액생화학 검사결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.

- (9) 장기증량 측정 결과, 암수 1000 및 1500 mg/kg 용량군에서 간의 절대 및 상대증량 증가가 관찰되었으나, 이와 연관된 조직학적 소견은 관찰되지 않아 독성학적 의의는 적은 것으로 판단됨.
- (10) 육안적 관찰 결과, 암수 1500 mg/kg 용량군에서 간의 커짐(enlarged)이 관찰되었으나, 이와 연관된 조직학적 소견은 관찰되지 않아 독성학적 의의는 적은 것으로 판단됨.
- (11) 조직병리학적 검사 결과, 암수 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.
- (12) 독성동태 분석 결과, Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast, Day 1)은 두 성분 모두 암컷 750 - 1000 mg/kg 구간에서의 감소를 제외하고 투여량의 증가에 따른 증가를 나타냈음. 4주간의 반복투여에 따른 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast)은 투여 첫 날(Day 1)과 비교 시 대체적으로 비슷하거나 감소를 나타냈음(Ursolic acid의 암컷 1000 mg/kg 용량군 제외). Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast)은 성별에 따른 큰 차이는 없었음(<2 배).

이상의 결과, 암수 원숭이를 이용한 39주 반복 경구투여 독성시험에서는 고용량을 본 시험의 최고용량인 1500 mg/kg로 설정하는 것이 적절할 것으로 판단됨.



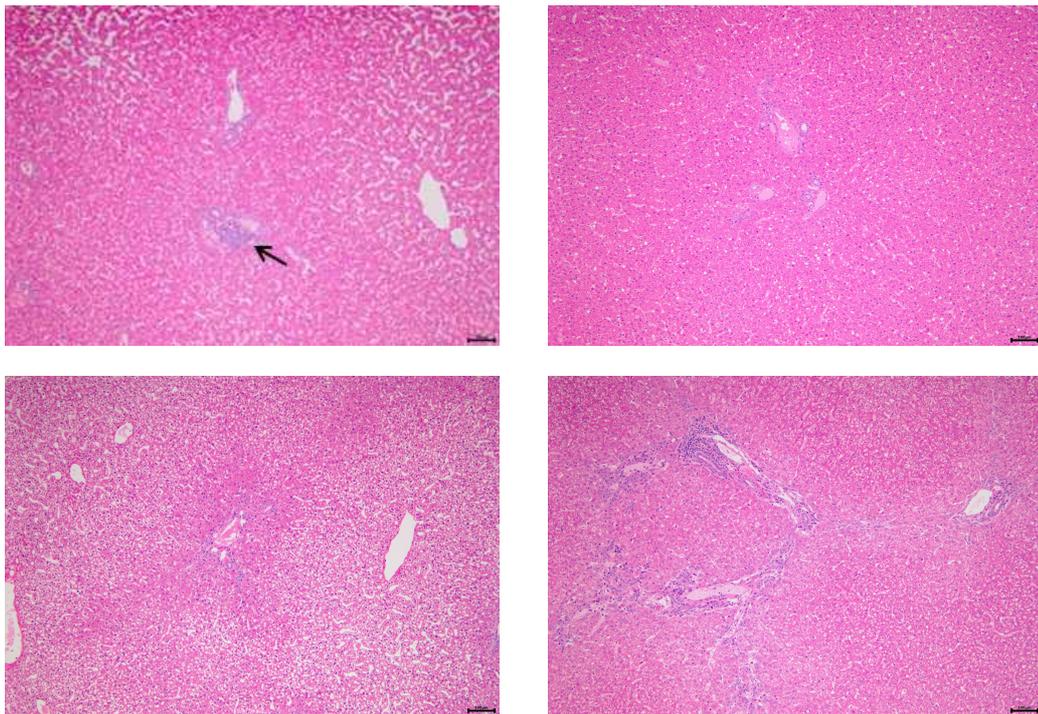
[그림 119] 비설치류(영장류) 4주 DRF시험 male 및 female body weights

• 영장류 39주 반복투여 독성시험 완료 (첨부자료 19. 유인원 39주 반복투여독성 보고서)

시험물질 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스혼합물(1:1)을 18주 고용량 중간 관찰군 암수 각각 2마리를 포함하여 군당 암수 각각 4마리의 게잡이원숭이(Cynomolgus monkey)에 0(부형제 대조군), 750, 1000, 또는 1500 mg/kg/day의 용량으로 39주간 반복 경구투여 후 발현되는 독성 및 독성동태를 평가하고, 부형제 대조군과 고용량군에 암수 각각 2마리, 4주간의 회복군을 설정하여 회복성 여부를 확인하기 위하여 실시하였음. 시험기간 중 사망률, 일반증상, 체중, 사료 섭취량의 변화를 관찰하였고 안과학적 검사, 심전도검사, 혈액학적 검사, 응고계 검사, 혈액생화학 적 검사, 뇨검사/뇨화학검사, 부검 시 육안적 관찰, 장기중량 측정, 조직병리학적 검사 및 독성동 태 분석을 실시하였음. 시험기간 중 시험물질 투여와 관련된 사망동물은 발생하지 않았고, 체중 측 정, 사료섭취량측정, 안과학적 검사, 심전도 검사, 혈액학적 검사, 응고계 검사 및 뇨검사/뇨화학검 사에서 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았음.

일반증상 관찰 결과, 암수 모든 시험물질 투여군에서 투여기간 동안 관찰된 시험물질 혼입 착색 변 및 착색뇨 증상은 과량의 시험물질 투여에 의한 약물혼입변으로서 독성학적 의의는 없는 것으 로 판단됨. 투여기간 중 암수 모든 시험물질 투여군(동물번호: 2F0001번 개체 제외)에서 간헐적 또 는 지속적으로 관찰된 유연 증상 역시 시험물질의 물리화학적 특성에 기인한 변화로 사료되며, 이 역시 독성학적 의의는 없는 것으로 판단됨. 그리고, 암수 시험물질 투여군 대략 반수 정도에서 구 토(vomiting), 설사(liquid feces) 및/또는 연변(soft feces) 증상이 산발적 또는 지속적으로 관찰되었 는데, 전반적인 발생빈도나 정도를 고려하였을 때, 용량상관성 있는 변화를 보이지 않았으므로 이 러한 증상들은 독성학적 의의는 적은 것으로 판단됨.

조직병리학적 검사에서 간의 관찰 결과, 암수 18주 중간관찰군 및 암수 750 mg/kg 이상 용량군 에서 간문맥주위 단핵세포 침윤 및 암수 1000 mg/kg 이상 용량군에서 혈관주위 단핵세포 침윤이 관찰되었고, 이는 간의 육안적 커짐 소견과 절대 및/또는 상대중량 증가와 연관이 있었음. 이러한 변화는 시험물질 투여에 의한 것으로 판단되나, 회복기간 후 회복되는 경향을 나타내었고 관련된 혈액생화학학적 변화가 관찰되지 않아 시험물질의 역작용(adverse effect)은 아닌 것으로 판단됨.



[그림 120] 영장류 간 조직 사진

수컷 18주 중간관찰군 및 암수 1000 mg/kg 이상 용량군에서 관찰된 담관 과형성 소견은 간문맥 주위에 염증세포 침윤과 함께 미성숙한 작은 담관들이 증식되어 있는 것이 특징적이 었음. 이는 혈액생화학적 검사상의 GGT 증가와 연관이 있으며, 시험물질 투여에 의한 역작용으로 판단된다. 또한, 이러한 병변 주위에 단일세포 괴사 소견이 함께 관찰되었으며, 이는 시험물질 관련 간세포 손상에 의해 발생할 수 있는 독성변화로 판단된다. 이러한 변화는 회복기간 후 회복되는 경향을 나타냄.

암컷 1500 mg/kg 용량군 1례(동물번호: 4F0003번)에서 관찰된 간문맥주위 괴사/섬유화 소견은 간 문맥 주위에 염증세포 침윤과 동반되어 간세포 일부가 괴사되고 섬유소성 조직들이 증식되어 있는 것이 특징적이였다. 이러한 변화는 간의 육안적 변색 소견과 연관이 있으 며, 이는 시험물질 투여에 의한 역작용으로 판단됨.

그 외, 혈액생화학적 검사상의 수컷 1500 mg/kg 용량군에서 관찰된 중성지방의 증가는 시험물질 관련 영향으로 보이나, 이러한 변화는 연관된 조직학적 소견이 관찰되지 않았고 회복기간 후 모두 회복되어 독성학적 의의는 적은 것으로 판단됨.

독성동태 분석결과, Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast, Day 1)은 두 성분 모두수 컷의 경우 투여량 증가에 따른 증가를 거의 보이지 않았고, 암컷의 경우 전체적으로 투여량 증가 율과 비슷한 증가율을 보였으나 750 - 1000 mg/kg 구간에서 증가를 보이지 않았음. 39주간의 반 복투여에 따른 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast)은 Day 1과 비교 시, 수컷의 경 우 Week 18 및 Week 39에 대부분의 투여군에서 감소경향을 나타냈으나 일부 투여군을 제외하고 큰 차이는 없었음. 암컷의 경우 Week 18 및 Week 39에서 투여군에 따라 증감을 보였으나 두 성 분 모두Week 39의 750 mg/kg 용량군을 제외하고 큰 차이는 없었음. Day 1의 암수동물에서 Oleanolic acid 및 Ursolic acid의 전신노출(AUClast)은 750 및 1000 mg/kg 용량군에서 암컷이 수컷 보다 적은 경향을 보였고, 1500 mg/kg 용량군 에서 암수 간 큰 차이는 없었음.

본 시험에서 시험물질 곰보배추95%에탄올건조엑스(10→1)·미결정셀룰로오스혼합물(1:1)을 암수 계잡이원숭이(Cynomolgus monkey)에 0, 750, 1000, 또는 1500 mg/kg/day의 용량으로 39주간 반복 경구투여를 실시한 결과, 시험물질 투여와 관련된 독성학적인 변화로 암수 1000 mg/kg 이상 용량 군의 간에서 담관 과형성 및 단일세포 괴사와 암컷 1500 mg/kg 용량군에서 간문맥주위 괴사/섬유 화가 관찰되었음. 이러한 변화는 시험물질의 반복투여에 의한 역작용(adverse effect)으로 판단되 므로 본 시험에서의 무해용량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)은 암수 모두 750 mg/kg/day로 판단됨.

8. 임상시험

1) 임상 CRO기관과의 계약완료

- 적응증 : 골다공증
- 의약품 : 천연물신약
- 위약 대조
- 임상시험 기관 수 : 4개 기관
- 피험자 수 : 200명

C&R
RESEARCH

업무 계약서

서울특별시 강남구 논현로 28길 34번지에 주소를 두고 있는 고려제약주식회사 (이하 "갑")은 서울특별시 강남구 역삼로 412 대치연예스빌딩에 주소를 두고 있는 ㈜씨엔알리서치(이하 "을")와 다음과 같이 "천연물신약 2상 임상시험"의 진행과 관련하여서 업무 위탁 계약(이하 "본 계약")을 체결한다.

- 다 음 -

제 1 조 (목적)

"본 계약"의 목적은 "갑"이 "을"에게 "천연물신약 2상 임상시험"의 일부 업무(이하 "업무")를 위탁하고, "을"이 "업무"를 수행함에 있어서 필요한 세부사항을 규정하는데 있다.

제 2 조 (업무의 내용)

- 2.1 "을"은 "갑"에게 본 계약의 일부로서 첨부된 [첨부2 : 고려제약 천연물신약 2상 임상시험 Quotation(이하 "견적서")]에 따라 개시 전 방문, IRB 업무, 개시모임, 모니터링, 종료방문 점검 준비 및 참여, 심사준비 및 참여에 대한 용역을 제공한다. 단, 계약기간 중에 당당사자의 별도 협의를 통해 업무 범위를 조정할 수 있다.
- 2.2 "본 계약" 기간 동안 "을"은 본 계약상의 "업무"를 "을"의 책임하에 실시한다.
- 2.3 "갑"은 "을"에게 "업무"에 필요한 기술자료 등의 제공에 적극 협력하여야 한다.

제 3 조 (비밀 보장)

- 3.1 "을"이 "업무"와 관련하여 취득한 일체의 사항("본 계약"의 내용, 임상시험의 진행 관련 제반 사항, "갑"의 기술개발 내용, "갑"의 영업비밀 등을 포함한다. 이하 "비밀정보")에 대하여, "을"은 "갑"의 사전 서면 승낙 없이는 제3자에게 이를 누설·제공할 수 없다.
- 3.2 "갑"은 "을"이 "비밀정보"를 유출함에 따라 발생한 손해에 대하여 "을"에게 손해배상을 청구할 수 있다. 단, 다음 각 호의 "비밀정보"에 대하여는 본 조항이 적용되지 않는다.

가. 공지의 사실

나. "갑"이 "을"에게 공개를 서면으로 승낙한 경우

다. "을"이 법령, 정부기관, 법원의 정당한 명령에 의하여 공개할 의무가 있는 경우. 단, 이 경우 "을"은 "비밀정보"를 공개하기 전에 "갑"에게 이를 서면으로 통지하여야 한다.

제 4 조 (계약 기간)

- 4.1 "본 계약"의 계약기간은 계약체결일로부터 "갑"이 위탁한 모든 업무가 완료될 때까지로 함을 원칙으로 하며, 업무의 일정계획은 "견적서"와 같다.
- 4.2 제 4.1 항의 "업무"의 완료와 관련하여, "을"이 "갑"에게 "견적서"에 명시된 결과물을 제공하고 제공일로부터 30일 이내에 "갑"이 서면 이의를 제기하지 아니한 경우에는 "을"이 "업무"를 완료한 것에 대해 "갑"이 동의한 것으로 간주한다.

제 5 조 (대금)

- 5.1 "업무"의 수행에 소요되는 총 용역비는 금 일십오억팔천팔백일만이천원 정(W15,888,012,000)으로 약정한다.
- 5.2 "갑"이 "을"에게 "견적서" 이외의 "업무"를 요청한 경우 또는 "견적서"에 명시한 수량이 초과하여 "업무"가 발생하는 경우 또는 "견적서"에 명시한 "업무"가 수행되지 않거나 수량이 미달된 경우, "갑"과 "을"은 별도의 서면합의에 따라 용역 비용 및 그 지급을 조정할 수 있다.(단, 용역비의 조정은 기관수, 대상자수, 연구비와 관련하여서 견적서에 명시된 연구비를 초과하는 경우,

[그림 121] 임상 CRO 기관과의 업무 계약서

Service Scope	Sponsor	CRO	
1. Study design consulting	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
2. Protocol development			
• Sample size calculation	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
• Protocol	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Korean ver.
• CRF	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Korean ver.
• ICF	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
• e-CRF	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Lead Trial system
• Randomization	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
3. Regulatory (IND)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
4. Site/Investigator Identification	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
5. Pre-study Site Visit	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
6. IRB Affairs			
• Initial submission	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	For 4 IRBs
• Interim submission	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	For 4 IRBs
• Close-out submission	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	For 4 IRBs
• Final CSR submission	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	For 4 IRBs
7. Site Contract Support			
• Budget negotiation with investigator	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
• Preparation of contract template		<input checked="" type="checkbox"/>	
• Contract with investigator	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
8. Investigator Meeting	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
9. Document (TMF, ISF, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
10. Site Initiation Visit	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1 visit per site; 4 visits total
11. Site Management	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
12. Site Monitoring Visit	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	21 visits per site;
13. Safety Management			
• Report to Sponsor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	To be performed by site
• Report to IRB	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
• Report to MFDS	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
• SUSAR/INDSR report	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
14. Query Resolution	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
15. Close-out Visit	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
16. Archiving	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
17. Audit			
• Audit by Auditor	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1 visit 2 sites; 2 visit total
• CRA attending	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1 visit 2 sites; 2 visits total
18. Data Management	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
19. Statistical Analysis	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
20. Clinical Study Report writing	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Korean ver.
21. MFDS Inspection	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
22. Regulatory (NDA)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
23. Administration & Accounting	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Investigator fee payment
24. Project Management	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Sponsor communication & CRA oversight
25. Status update	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Monthly status update report
26. Others	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

[그림 122] 임상 CRO 기관과의 업무 계약 목록

임상시험계획서

폐경 후 여성 골다공증 환자에서 KDC-14-1의 유효성 및 안전성을
평가하기 위한 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 평행군, 위약 대조,
용량탐색 제 2 상 임상시험

A Multi-center, Randomized, Double-blind, Parallel, Placebo-controlled,
Dose-finding Phase 2 Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety
of KDC-14-1 in Postmenopausal Women with Osteoporosis

임상시험계획서 번호 KDC-201

Version 0.1 (22/Jul/2016)



기밀유지: 본 임상시험계획서에 포함된 모든 정보는 임상시험책임자 및 임상시험
담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 고려제약(주)의
사전 서면 동의 없이 제 3 자에게 공개될 수 없습니다.

CONFIDENTIAL

1 / 63

[그림 123] 임상 Protocol 표지

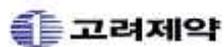
임상시험계획서

폐경 후 여성 골다공증 환자에서 KDC-14-1 의 유효성 및 안전성을
평가하기 위한 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 평행군, 위약 대조,
용량탐색 제 2 상 임상시험

A Multi-center, Randomized, Double-blind, Parallel, Placebo-controlled,
Dose-finding Phase 2 Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety
of KDC-14-1 in Postmenopausal Women with Osteoporosis

임상시험계획서 번호 KDC-201

Version 0.2 (01/Dec/2017)



기밀유지: 본 임상시험계획서에 포함된 모든 정보는 임상시험책임자 및 임상시험
담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 고려제약주의
사전 서면 동의 없이 제 3 자에게 공개될 수 없습니다.

4) 임상 1, 2상 동시진행(임상시험계획서 수정)

- 천연물 의약품 촉진법 삭제에 따른 임상1상 추가진행요구

임상시험계획서 수정 (첨부자료 22. 임상시험계획서 개정 - 1/2상 동시진행)

Protocol No. KDC-201

Version 2.0 (22Mar2019)

[표지]

임상시험계획서

KDC-14-1의 안전성/내약성 및 유효성을 평가하기 위한, 무작위배정, 이중눈가림, 평행군, 위약 대조, 단회/반복 투여, 단계적 증량, 용량탐색 제1/2상 임상시험

A Randomized, Double-blind, Parallel, Placebo-controlled,
Single/Multiple dose, Dose-Escalation, Dose-finding Phase 1/2 Clinical Trial to
Evaluate the Safety/Tolerability and Efficacy of KDC-14-1

임상시험 계획서 번호:	KDC-201
Version No. (version date):	Version 2.0 (22 Mar 2019)
임상시험용 의약품:	KDC-14-1
의뢰사:	고려제약㈜
임상시험 단계:	제 1/2상

CONFIDENTIAL

기밀유지: 본 임상시험계획서에 포함된 모든 정보는 임상시험책임자 및 임상시험 담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 고려제약㈜의 사전 서면 동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

[표 55] 임상 1/2상 동시진행 Protocol 요약

[임상시험 계획서 요약- PHASE 1]

임상시험 제목	KDC-14-1의 안전성/내약성 및 유효성을 평가하기 위한, 무작위배정, 이중눈가림, 평행군, 위약 대조, 단회/반복 투여, 단계적 증량, 용량탐색 제1/2상 임상시험 A Randomized, Double-blind, Parallel, Placebo-controlled, Single/Multiple dose, Dose-Escalation, Dose-finding Phase 1/2 Clinical Trial to Evaluate the Safety/Tolerability and Efficacy of KDC-14-1
의뢰자	고려제약㈜
시험기관 및 시험책임자	[별첨 3 참고]
임상시험 기간	식품의약품안전처 및 임상시험심사위원회 승인일로부터 약 12개월 (단, 시험대상자 등록 상황에 따라 변경 가능)
예상 대상질환	폐경 후 여성 골다공증
목적	건강한 성인을 대상으로 KDC-14-1 단회 및 반복 투여 후 안전성 및 내약성을 평가한다.
대상자 수	최대 64명 <ul style="list-style-type: none"> • Part I: 단회 투여 용량 증량(Single Ascending Dose, SAD) <ul style="list-style-type: none"> - 총 모집 대상자 수; 32 명 (4 용량군; 300 mg, 600 mg, 900 mg 및 1,200 mg) 용량군별 8 명 (시험약 6 명, 위약 대조: 2명) • Part II: 반복 투여 용량 증량(Multiple Ascending Dose, MAD) <ul style="list-style-type: none"> - 총 모집 대상자 수; 32 명 (4 용량군; 300 mg, 600 mg, 900 mg 및 1,200 mg) 용량군별 8 명 (시험약 6 명, 위약 대조: 2 명)
임상시험 디자인	단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조, 단회/반복, 단계적 증량 제 1 상 임상시험 <p><Part I: 단회 투여 용량 증량(SAD) 시험></p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ 300 mg, 600 mg, 900 mg, 1,200 mg (4 용량군)

	<p>Part I</p> <p>Screening → Randomization</p> <p>Baseline (D-1) → KDC-14-1 or Placebo (D1) → Discharge (D3) → PSV (D8(+2d))</p> <p>Safety (D-1 to D8(+2d))</p> <p><Part II: 반복 투여 용량 증량(MAD) 시험></p> <p>➢ 300 mg, 600 mg, 900 mg, 1,200 mg (4 용량군)</p> <p>Part II</p> <p>Screening → Randomization</p> <p>Baseline (D-1) → KDC-14-1 or Placebo (D1) → Discharge (D7) → PSV (D12(+2d))</p> <p>Safety (D-1 to D12(+2d))</p> <p>* 반복 투여 시험(MAD, Part II)의 경우 투여용량 및 재혈은 단회 투여 시험(SAD, Part I)의 안전성 및 내약성 결과에 따라 추후 재 설정할 수 있다.</p> <p>* Part I 및 Part II 를 포함한 제 1 상 임상시험(Phase 1)에서 안전성 및 내약성 결과에 따라서, 제 2 상 임상시험(Phase 2)의 용량군을 재 설정 할 수 있다.</p>
<p>임상시험 방법</p>	<p>본 제 1 상 임상시험은 Part I 및 Part II 로 순차적으로 수행하며, Part I에서는 단회 투여 용량 증량(SAD) 시험을, Part II 에서는 반복 투여 용량 증량(MAD) 시험을 시행한다. Part I 및 Part II 모두 공통적으로 자발적으로 서면 동의한 시험대상자에 한하여 스크리닝 검사를 통해 선정/제외기준을 확인한 후 이후 임상시험 절차를 수행한다. 선정된 시험대상자는 첫 투여 1 일 전(-1d) 입원하며, 대상자 번호(무작위배정 번호)를 배정받는다.</p> <p>단회 투여 용량 증량 시험(SAD, Part I)은 300 mg, 600 mg, 900 mg, 1,200 mg 용량군을 포함하며, 각각의 코호트에는 8명(시험약: 6 명, 위약 대조: 2 명)의 대상자가 모집 및 무작위배정 된다. SAD (Part I)에서는 임상시험용 의약품을 단회 투여 후</p>

	<p>안전성 및 내약성에 대하여 임상시험 절차에 따라 진행한다. 이후 다음 코호트로의 진행은 저용량 군에서 고용량군으로 4 용량군이 단계적으로 진행된다. 반복 투여 용량 증량 시험(MAD, Part II)은 SAD (Part I)시험 완료 후, 300 mg, 600 mg, 900 mg 및 1,200 mg 으로 8 명(시험약: 6 명, 위약 대조 2 명)의 대상자가 모집 및 무작위배정을 받고, 각 용량군의 대상자들은 총 5 일 동안 1 일 1 회 임상시험용 의약품을 투여 받는다. MAD (Part II)의 경우 투여용량 및 채혈시점은 SAD (Part I)의 안전성 및 내약성 결과를 참고하여 추후 재설정할 수 있다.</p> <p>모든 시험대상자의 안전성/내약성 평가를 위하여 이상반응, 신체검진, 활력징후, 심전도(12-lead ECG, continuous ECG monitoring), 실험실적 검사 등을 임상시험 일정표에 따라 실시한다.</p>
선정기준	<ol style="list-style-type: none"> 1) 스크리닝 검사 이전, 본 임상시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수할 것을 IRB 가 인증한 동의서에 서면 동의한 자 2) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 20 세 이상 65 세 이하의 건강한 성인 3) 체질량지수(BMI)가 18.0 이상 27.0 이하인 자 - BMI (kg/m²) = weight (kg)/[height (m)]² 4) 임상시험 계획서 상 요구되는 제한 사항 및 주의 사항에 대하여 이해하고 준수할 수 있는 자
제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 1) 약물(아스피린, 항생제 등)에 대한 과민반응 또는 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 2) 임상적으로 유의한 간, 신장, 신경계, 면역계, 호흡기계, 내분비계 등에 해당하는 질환 또는 혈액·종양 질환, 심혈관계 질환, 정신 질환(기분 장애, 강박 장애 등)이 있거나 과거력이 있는 자 3) 임상시험용 의약품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(크론병, 궤양, 급성 또는 만성 궤장염 등)이나 위장관계 수술(단, 단순 맹장 수술이나 탈장 수술은 제외)의 과거력이 있는 자 4) 스크리닝 검사에서 혈중 AST (SGOT), ALT (SGPT)가 정상 범위 상한치의 1.5 배 초과하는 자 5) 첫 투여일 전 2 주 이내에 어떠한 전문의약품이나 한약을 복용하였거나, 1 주 이내에 어떠한 일반의약품(OTC drug) 또는 비타민제제를 복용한 자 6) 첫 투여일 전 8 주 이내에 헌혈을 하였거나 400 mL 이상의 혈액 소실을 경험한 자 7) 약물 남용의 과거력이 있거나, 소변약물 스크리닝 검사에서 남용약물에 대하여 양성반응을 보인 자

	<p>8) 지속적으로 음주(21 units/week 초과, 1unit = 10g of pure alcohol)를 하거나 임상시험기간 중 금주할 수 없는 자.</p> <p>9) 흡연자단, 첫 투여일로부터 12 주 이전에 금연한 경우에는 대상자로 선정할 수 있음)</p> <p>10) 첫 투여 3 일 이내에 그레이프프루트(자몽)/카페인 함유 음식을 섭취하거나 섭취를 금할 수 없는 자.</p> <p>11) 특이한 식습관을 가졌거나 병원에서 제공하는 일반식을 먹을 수 없는 자</p> <p>12) 스크리닝 검사 시 12-lead 심전도에서 임상적으로 유의한 이상 소견을 보인 경우 (예: QTcF > 430 msec)</p> <p>13) 스크리닝 검사 시 활력징후 측정에서 혈압이 $80 \leq \text{SBP}(\text{수축기 혈압}) \leq 140 \text{ mmHg}$ 또는 $60 \leq \text{DBP}(\text{이완기 혈압}) \leq 85 \text{ mmHg}$ 의 범위를 벗어나거나, 심박동수 $50 \leq \text{PR}(\text{bpm})$ (분당 심박동수) ≤ 100 를 벗어난 여성 또는 $45 \leq \text{PR}(\text{bpm})$ (분당 심박동수) ≤ 100 를 벗어난 남성. 단, 활력징후 측정은 10 분 동안 휴식기를 가진 후 측정한다.</p> <p>14) 실험실적 검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험자가 임상시험 참여에 부적합하다고 판단한 자.</p> <p>15) 첫 투여 예정일 전 12 주 이내에 타 임상시험에 참여하여 약물을 투여 받은 자(마지막 투여일 기준)</p> <p>16) 임부, 수유부 및 임상시험 기간 동안 임신계획이 있거나 금욕 및 적절한 피임법*에 동의하지 않는 가임 여성 및 남성 *호르몬피임법(피하이식제제, 주사제, 경구 피임제 등), 자궁내장치(구리루프, 호르몬 함유 자궁내 시스템), 이중차단법(남성(콘돔)과 여성(피임용질격막, 질 스폰지 또는 경부캡)이 모두 피임기구를 사용하되, 살정자제를 함께 사용하여야 함), 불임시술(정관절제술, 난관결찰술 등)</p> <p>17) 임상시험 연구기간 동안 대상자가 다른 용량군에 중복 참여한 자 (단, 대상자가 시험약을 투여하지 않은 경우에는 참여 가능함)</p>
--	--

<p>임상시험용의약품 투여 용량 및 투여방법</p>	<p>Part I (SAD) : 무작위배정 익일, 1일 1회(단회) 투여한다.</p> <p>Part II (MAD): 무작위배정 익일부터 투여를 시작하며, 매일 아침 1일 1회, 총 5일 동안 투여한다.</p> <p>각 코호트별 용량 및 대상자 수는 다음과 같다.</p> <table border="1" data-bbox="422 533 1236 1019"> <thead> <tr> <th>Cohort</th> <th>Part</th> <th>용량군</th> <th>대상자 수 (시험약+위약 대조)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>I</td> <td>KDC-201 300 mg + Placebo</td> <td>6 명+2 명</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>I</td> <td>KDC-201 600 mg + Placebo</td> <td>6 명+2 명</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>I</td> <td>KDC-201 900 mg + Placebo</td> <td>6 명+2 명</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>I</td> <td>KDC-201 1,200 mg + Placebo</td> <td>6 명+2 명</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>II</td> <td>KDC-201 300 mg + Placebo</td> <td>6 명+2 명</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>II</td> <td>KDC-201 600 mg + Placebo</td> <td>6 명+2 명</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>II</td> <td>KDC-201 900 mg + Placebo</td> <td>6 명+2 명</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>II</td> <td>KDC-201 1,200 mg + Placebo</td> <td>6 명+2 명</td> </tr> </tbody> </table>	Cohort	Part	용량군	대상자 수 (시험약+위약 대조)	1	I	KDC-201 300 mg + Placebo	6 명+2 명	2	I	KDC-201 600 mg + Placebo	6 명+2 명	3	I	KDC-201 900 mg + Placebo	6 명+2 명	4	I	KDC-201 1,200 mg + Placebo	6 명+2 명	5	II	KDC-201 300 mg + Placebo	6 명+2 명	6	II	KDC-201 600 mg + Placebo	6 명+2 명	7	II	KDC-201 900 mg + Placebo	6 명+2 명	8	II	KDC-201 1,200 mg + Placebo	6 명+2 명
Cohort	Part	용량군	대상자 수 (시험약+위약 대조)																																		
1	I	KDC-201 300 mg + Placebo	6 명+2 명																																		
2	I	KDC-201 600 mg + Placebo	6 명+2 명																																		
3	I	KDC-201 900 mg + Placebo	6 명+2 명																																		
4	I	KDC-201 1,200 mg + Placebo	6 명+2 명																																		
5	II	KDC-201 300 mg + Placebo	6 명+2 명																																		
6	II	KDC-201 600 mg + Placebo	6 명+2 명																																		
7	II	KDC-201 900 mg + Placebo	6 명+2 명																																		
8	II	KDC-201 1,200 mg + Placebo	6 명+2 명																																		
<p>평가 변수</p>	<p>안전성 및 내약성 평가</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 이상반응 2) 신체검진, 활력징후(혈압, 맥박) 3) 심전도 4) 실험실적 검사 																																				
<p>통계 분석방법</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 이상반응 투여군별 임상시험용 의약품 투여 이후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse event, TEAE), 약물이상반응(adverse drug reaction, ADR) 및 중대한 이상반응(serious adverse event, SAE), 중대한 약물이상반응(serious ADR), 중도탈락의 원인이 된 이상반응 등의 발생 시험대상자 수, 발생률(95% 신뢰구간) 및 발생 건수를 제시한다. 																																				

	<p>이상반응, 약물이상반응, 중대한 이상반응, 중대한 약물이상반응, 중도탈락의 원인이 된 이상반응 등에 대해서 medical dictionary for regulatory activities (MedDRA)를 이용하여 system organ class (SOC)와 preferred term (PT)에 따라 코드화하고, 코드화된 이상반응의 발생 시험대상자 수, 발생률 및 발생 건수를 투여군별로 제시한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 2) 신체검진, 활력징후, 심전도, 실험실적 검사 각 시점별 변화에 대해서 투여군별 기술통계량을 제시한다.
--	---

[임상시험 계획서 요약- PHASE 2]

임상시험 제목	KDC-14-1의 안전성/내약성 및 유효성을 평가하기 위한, 무작위배정, 이중눈가림, 평행군, 위약 대조, 단회/반복 투여, 단계적 증량, 용량탐색 제1/2상 임상시험 A Randomized, Double-blind, Parallel, Placebo-controlled, Single/Multiple dose, Dose-Escalation, Dose-finding Phase 1/2 Clinical Trial to Evaluate the Safety/Tolerability and Efficacy of KDC-14-1
의뢰자	고려제약㈜
시험기관 및 시험책임자	[별첨 3 참고]
임상시험 기간	식품의약품안전처 및 임상시험심사위원회 승인일로부터 약 24개월 (단, 시험대상자 등록 상황에 따라 변경 가능)
임상시험용 의약품	<ul style="list-style-type: none"> • 시험약: KDC-14-1 300 mg 정, 고려제약㈜ • 대조약: KDC-14-1 위약, 고려제약㈜ • 참조약: 포사맥스정® 70 mg, 한국엠에스디 • 참조약 위약: 포사맥스정® 70 mg 위약, 고려제약㈜
대상질환	폐경 후 여성 골다공증
목적	<p>일차 목적 폐경 후 여성 골다공증 환자에서 KDC-14-1의 최적 용량을 결정하고, 위약군 및 참조군 대비 KDC-14-1의 유효성을 탐색적으로 비교 평가한다.</p> <p>이차 목적 폐경 후 여성 골다공증 환자에서 KDC-14-1의 안전성을 평가한다.</p>
대상자 수	군당 29명 (총 174명, 탈락률 20% 포함)
임상시험 디자인	다가관, 무작위배정, 이중눈가림, 평행군, 위약 및 참조군 대조, 단계적 증량, 용량탐색 제2상 임상시험

	<p>The diagram illustrates the study design and timeline. It starts with a 'Randomization' phase leading to six treatment groups: 시험군1 (1mg/day), 시험군2 (2mg/day), 시험군3 (3mg/day), 시험군4 (4mg/day), 대조군 (Placebo), and 참조군 (Alendronate 70 mg/week). The timeline is divided into 'Screening' (Visits 1-2), 'Treatment period' (Visits 3-9), and 'End of study' (Visit 10). Time points are marked at -2 Week, 0W, 4W ± 3d, 8W ± 7d, 16W ± 7d, 24W ± 7d, 32W ± 7d, 40W ± 7d, 48W ± 7d, and 56W ± 7d. A red box indicates 'Primary/Secondary Outcome Measurement' from Visit 3 to Visit 9, and a green box indicates 'Safety monitoring' from Visit 3 to Visit 9.</p>
<p>임상시험 방법</p>	<p>자발적인 서면 동의 후 스크리닝 검사를 통해 선정/제외 기준에 선별된 시험대상자는 시험군 1, 시험군 2, 시험군 3, 시험군 4와 대조군(placebo) 및 참조군(alendronate 70 mg/week)에 무작위배정되며, 배정된 임상시험용 의약품을 48주간 투여한다. 투여기간 동안 시험대상자는 임상시험 계획서 일정표에 따라 시험기관을 방문하여, 안전성 및 유효성 평가를 실시한다. 시험군, 대조군(placebo) 및 참조군은 이중눈가림을 수행한다. 모든 시험대상자는 임상시험용 의약품 외에 칼슘 및 비타민D가 포함된 보충제를 제공받아 1일 1회 1정을 임상시험기간 동안 투여한다.</p> <p>* Part I 및 Part II를 포함한 제1상 임상시험(Phase 1)에서 안전성 및 내약성 결과에 따라서, 제2상 임상시험(Phase 2)의 용량군을 최종적으로 재 설정하도록 한다.</p>
<p>선정기준</p>	<p>다음의 모든 조건에 적합하여야 한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 만 55-80세의 여성으로 폐경*후 2년이 경과된 자 <ul style="list-style-type: none"> ➢ *폐경은 다음 중 1개 이상 충족하는 경우로 정의한다. <ul style="list-style-type: none"> • 12개월 동안의 자연적인(spontaneous) 무월경 • 혈중 Follicle-Stimulating Hormone (FSH) 농도가 40 mIU/mL을 초과하면서 6개월 동안의 자연적인(spontaneous) 무월경 • 외과적 불임수술(양측 난소절제술, 난관결찰술 등)을 받은 경우 2) 요추(lumbar spine)의 골밀도(L1~L4의 평균 T score) \leq -2.5 Standard Deviation (SD)

	<p>3) 각 요추(lumbar spine) L1~L4, 대퇴골 경부(femoral neck), 대퇴돌기(trochanter), 대퇴골(total hip)의 골밀도(T score) ≥ -3.5 SD</p> <p>4) 이중에너지 방사선측정법(Dual energy x-ray absorptiometry, DXA) 측정에 해부학적으로 적절한 척추나 둔부 구조를 가진 환자</p> <p>5) 본 임상시험에 대해 충분한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 서면 동의한 자</p>
제외기준	<p>다음 조건 중 하나라도 해당되는 시험대상자는 본 임상시험에 참여할 수 없다.</p> <p>1) 스크리닝 시점의 다음 병력 환자</p> <ul style="list-style-type: none"> • 부갑상선 기능항진증 또는 저하증 • 갑상선 기능항진증 또는 저하증 • 제1형 당뇨병 • 쿠싱 증후군 • 류마티스성 관절염 • 생식샘기능저하증 • 골 파제트병, 골연화증 • 신성 골 이영양증 • 만성 간질환 • 약물 또는 알코올 남용 • 24주 이내의 위장관 질환의 병력(소화흡수 장애, 소화성 궤양과 같은 상부 위장관 질환 등) • 5년 이내의 악성 종양 <p>2) 스크리닝 검사 시점의 다음 동반질환자</p> <ul style="list-style-type: none"> • 골다공증성 골절 • 고칼슘혈증 또는 저칼슘혈증 • 식도배출을 지연시키는 식도 질환(예, 식도협착증 또는 무이완증) <p>3) 스크리닝 검사 시점 시 다음의 실험실적 검사 결과 수치 환자</p> <ul style="list-style-type: none"> • aspartate transaminase (AST) 또는 alanine transaminase (ALT) $> 2 \times$ upper limit of normal (ULN) • 25-hydroxy vitamin D (25-OHD) < 9 ng/mL • creatinine clearance < 35 mL/min <p>4) 스크리닝 검사 시점 골다공증 및 골밀도에 영향을 주는 약물 투여 환자</p> <ul style="list-style-type: none"> • 48주 이내의 bisphosphonate 계열: alendronate, ibandronate, risedronate • 24주 이내의 hormone therapy 계열: tibolone

	<ul style="list-style-type: none"> • 24주 이내의 parathyroid hormone 계열 또는 유도제: teriparatide • 24주 이내의 anabolic steroid 계열: testosterone • 12주 이내의 steroid hormone 계열: estrogen • 12주 이내의 selective estrogen receptor modulator (SERM): raloxifene • 12주 이내의 calcitonin 계열: elcatonin, salcatonin • 12주 이내의 전신 glucocorticoid (prednisone \geq 5 mg 등가용량을 10일 초과 투여) • 24 주 이내의 vitamin k antagonist (warfarin) 혹은 heparin (low molecular weight heparin 포함) • 12주 이내의 골의 칼슘대사에 악영향을 줄 수 있는 약물을 만성적으로 또는 계속해서 사용한 경우 (예, 전신성 스테로이드, 루프(loop) 이뇨제 등) <p>5) 적어도 30분 동안 똑바로 앉거나 서 있을 수 없는 자</p> <p>6) 임상시험용 의약품 구성성분에 대한 알레르기 또는 과민증의 기왕력이 있는 자</p> <p>7) 갈락토오스 불내성(galactose intolerance), Lapp 유당분해효소 결핍증(Lapp lactase deficiency) 또는 포도당-갈락토오스 흡수장애(glucose-galactose malabsorption) 등의 유전적인 문제가 있는 자</p> <p>8) 기타 본 임상시험 참여에 부적합하다고 시험자가 판단하는 경우</p>			
임상시험용 의약품 투여 용량 및 투여방법	<p>본 임상시험에서는 '주 1회 투여 임상시험용 의약품'과 '1일 1회 투여 임상시험용 의약품'을 하기 각각의 투여방법에 따라 투여한다.</p> <p><주 1회 투여 임상시험용 의약품> 무작위배정 익일부터 투여를 시작하며, 아침 식전에 1정을 주 1회 투여한다. 본 임상시험용 의약품은 아침에 일어나자마자 식사하기 최소 30분전에 투여하여야 하며, 약물을 위로 신속히 도달시켜 식도자극 가능성을 감소시키기 위해 충분한 양의 물(170 ~ 230 mL)과 함께 투여해야 한다. 투여 후에는 적어도 30분간 눕거나, 음식물을 섭취해서는 안된다. 그리고 최초 음식물 섭취 후까지 누워서 안 되며, 취침 전이나 기상 전, 누운 상태에서 투여해서는 안 된다. 그 이후부터 매주 같은 요일에 아침 식전 1정을 투여하고, 총 48주간 매주 투여를 지속한다.</p> <p><1일 1회 투여 임상시험용 의약품> 무작위배정 익일부터 투여를 시작하며, 매일 아침 식후 1일 1회 투여한다. 무작위배정 익일부터 총 48주간 투여를 지속한다.</p> <table border="1" data-bbox="319 1646 1276 1702"> <tr> <td data-bbox="319 1646 510 1702"></td> <td data-bbox="510 1646 893 1702">1일 투여용량(식후)</td> <td data-bbox="893 1646 1276 1702">주 1회 1정 투여용량(식전)</td> </tr> </table>		1일 투여용량(식후)	주 1회 1정 투여용량(식전)
	1일 투여용량(식후)	주 1회 1정 투여용량(식전)		

	아침	아침 식전
시험군1	●○○○	◇
시험군2	●●○○	◇
시험군3	●●●○	◇
시험군4	●●●●	◇
대조군	○○○○	◇
참조군	○○○○	◆

●: 고려제약㈜ KDC-14-1 300 mg
○: 고려제약㈜ KDC-14-1의 위약
◆: Alendronate 70 mg
◇: Alendronate의 위약

단, 모든 시험대상자는 임상시험용의약품 외에 보충제(500 mg의 칼슘 및 400 IU의 비타민D)를 제공받아 1일 1회 1정을 임상시험기간 동안 투여한다.

병용금지 약물/요법	본 임상시험 기간 동안 유효성 및 안전성에 영향을 줄 수 있는 약물은 임상시험기간 동안 금지된다.
	<ul style="list-style-type: none"> ① Bisphosphonate 계열: alendronate, ibandronate, risedronate ② Hormone therapy 계열: tibolone ③ Parathyroid hormone 계열 또는 유도제: teriparatide ④ Anabolic steroid 계열: testosterone ⑤ Steroid hormone 계열: estrogen ⑥ Selective estrogen receptor modulator (SERM): raloxifene ⑦ Calcitonin 계열: elcatonin, salcatonin ⑧ 전신 glucocorticoid (prednisone \geq 5 mg 등가용량을 10일 초과 투여) ⑨ Vitamin k antagonist (warfarin) 혹은 heparin (low molecular weight heparin 포함) ⑩ 골다공증 주사 치료제: 골흡수 억제제 및 골형성 촉진제 혹은 Prolia pfs inj(denosumab) ⑪ 골다공증 치료를 위한 침술, 물리치료 등의 시술이나 수술적 치료

유효성 평가 변수	<u>유효성 평가 변수</u> • 일차 유효성 평가변수 기저치 대비 48주 시점의 요추(lumbar spine)의 BMD 변화율
--------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> • 이차 유효성 평가변수 <ol style="list-style-type: none"> 1) 기저치 대비 24주 시점의 요추(lumbar spine)의 BMD 변화율 2) 각 방문 시점 별 새롭게 확인된 골절 발생률 3) 기저치 대비 24주 및 48주 시점의 대퇴골 경부(femoral neck)의 BMD 변화율 4) 기저치 대비 24주 및 48주 시점의 대퇴돌기(trochanter)의 BMD 변화율 5) 기저치 대비 24주 및 48주 시점의 대퇴골(total hip)의 BMD 변화율 6) 기저치 대비 16, 24주 및 48주 시점의 bone turnover markers 변화율 <ol style="list-style-type: none"> ① 골 흡수(Bone resorption) <ul style="list-style-type: none"> ✓ 혈청 C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX) ✓ 뇨 N-telopeptide of type 1 collagen (NTX) ② 골 형성(Bone formation) <ul style="list-style-type: none"> ✓ 혈청 N-terminal propeptide of type 1 procollagen (PINP) ✓ 혈청 bone-specific alkaline phosphatase (BSAP) ✓ 혈청 Osteocalcin (OC)
안전성 평가 변수	<p><u>안전성 평가 변수</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 이상반응 2) 실험실적 검사 3) 활력징후(혈압, 맥박) 4) 심전도
유효성 평가 분석방법	<ul style="list-style-type: none"> • 일차 유효성 평가변수 투여군별 기술통계량을 제시하고, 각 용량군 대비 대조(위약)군에 대해서 베이스라인 수치를 보정한 공분산분석(analysis of covariance, ANCOVA)으로 분석한다. • 이차 유효성 평가변수 각 평가변수의 투여군별 기술통계량을 제시한다. 연속형 변수는 각 용량군 대비 대조(위약)군에 대해서 베이스라인 수치를 보정한 공분산분석(analysis of covariance, ANCOVA)으로 분석하고, 범주형 변수는 Fisher's exact test로 분석한다. • 탐색적 평가 참조군과 각 용량군, 참조군과 대조(위약)군에 대해서 유효성 평가 분석을 동일하게 시행한다.
안전성 평가 분석방법	<ol style="list-style-type: none"> 1) 이상반응

	<p>투여군별 임상시험용 의약품 투여 이후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse event, TEAE), 약물이상반응(adverse drug reaction, ADR) 및 중대한 이상반응(serious adverse event, SAE), 중대한 약물이상반응(serious ADR), 중도탈락의 원인이 된 이상반응 등의 발생 시험대상자 수, 발생률(95% 신뢰구간) 및 발생 건수를 제시하고, Fisher's exact test로 분석한다.</p> <p>이상반응, 약물이상반응, 중대한 이상반응, 중대한 약물이상반응, 중도탈락의 원인이 된 이상반응 등에 대해서 medical dictionary for regulatory activities (MedDRA)를 이용하여 system organ class (SOC)와 preferred term (PT)에 따라 코드화하고, 코드화된 이상반응의 발생 시험대상자 수, 발생률 및 발생 건수를 투여군별로 제시한다.</p> <p>2) 실험실적 검사, 활력징후, 심전도</p> <p>각 시점별 변화에 대해서 투여군별 기술통계량을 제시한다.</p>
--	---

5) 임상시험 실시기관(단국대) 계약채결

- IND승인완료 시, 신속한 임상진행을 위하여 체결



단국대학교의료원

수신자 고려제약(주), 내분비대사내과 유원상 교수
(경유)

제목 임상시험 계약서(2019-01-007)

1. 귀 사의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 관련근거 : 고려제약(주) "임상시험 계약서"
3. 위 근거에 의하여 다음과 같은 내용으로 계약을 체결합니다.
 - 가. 연구과제명 : KDC-14-1의 안전성/내약성 유효성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 평행군, 위약대조, 단회/반복 투여, 단계적 증량, 용량탐색 제1상 임상시험
 - 나. 연구책임자 : 내분비대사내과 유원상 교수
 - 다. 지원기관 : 고려제약(주)
 - 라. 연구기간 : 계약일 ~ 12개월
 - 마. 연구비 : 297,000,000원(부가세 별도)

붙임 임상시험 계약서 1부. 끝.

단국대학교의과대학부속병원장



담당 이 성

연구소장 정필상

병원장 조종태

협조자

시행 임상의학연구소- 149호 (2019.01.17) 접수

- ()

(우)31116 (주소)충남 천안시 동남구 망향로 201 / <http://www.dkuh.co.kr>

전화 (041)550-7491/전송 (041) 550-7647/e-mail : seonglee@empas.com / 공개..

[그림 126] 임상 1상 실시기관(단국대) 계약서

6) 임상 IND 신청준비 및 신청

■ 신청서류 준비완료

(1) 개발계획

(2) 임상시험자 자료집 (Investigator Brucher) (첨부자료 23. IB자료)

(3) 의약품 제조 및 품질관리기준 및 임상시험용의약품 제조 및 품질 관리기준에 맞게 제조되었음을 증명하는 서류 또는 자료완료

- 품질(보증)부서책임자 또는 그 동급이상의 책임자가 서명한 제조원이 GMP 적합하게 제조 사실을 증명하는 문서
- EU의 Qualified Person이 제품의 제조가 Good Manufacturing Practice를 준수한다는 확인서 및 Qualified Person 자격을 확인할 수 있는 서류

(4) 임상시험용 의약품 관련 제조 및 품질에 관한 자료완료(첨부자료 24. CTD자료)

- 원료의약품

- 품질평가자료: CTD 3.2.S
- Stability: 장기보존, 가속, 가혹
- 제조지시기록서
- CoA

- 완제의약품

- 품질평가자료: CTD 3.2.P
- Stability: 장기보존, 가속, 가혹
- 제조지시기록서
- 기준 및 시험방법
- 제조방법
- CoA

(5) 비임상시험성적에 관한 자료

- 약리작용에 관한자료

- 효력시험, 일반약리
- 흡수, 분포, 대사 및 배설 (생약의 경우 해당되지 않음)

- 독성에 관한 자료

- 단회독성, 반복독성
- 유전독성
- 생식발생독성
- 발암(의약품의 특성에 따라 제출여부 판단)
- 기타독성 (의약품의 특성에 따라 제출여부 판단)

(6) 시험약의 과거 임상적 사용경험에 관한 자료

(7) 임상시험 실시기관, 시험 자, 수탁기관 등에 관한 자료

(8) 임상시험 피해자 보상에 관한 규약

(9) 시험대상자 동의서 서식

■ IND신청(2018년 07월)

7) 임상시험 IND보완 및 반려

(1) IND 1차보완 내용요약

- 임상 1, 2상 동시진행(임상시험계획서 수정)
: 천연물 의약품 촉진법 삭제에 따른 임상1상 추가진행요구
- 유인원 독성자료 제출
: 유인원독성자료로 비글견자료가 대체 가능하다고 판단되나, 외부자문을 통하여 가능여부 판단

(2) IND 2차보완 내용요약

- 유인원 독성자료 관련 보완
: 750mg/kg군에서 나타난 증상(혈액학적 검사결과, 조직병리학적 검사결과, 장기(고환)중량 변화)들을 독성으로 판단하지 않는 근거 (GLP인증기관 실험담당자가 미팅을 통하여 직접 설명하여 식약처주무관 이해시킴)

(3) IND 반려(2019년 05월) (첨부자료 25. 식약처 IND반려공문)

- 전임상 비설치류(비글) 반복투여독성시험에서 최대무독성용량(NOAEL)이 설정되지 않았음
- 비글견의 종민감성으로 판단하고 전임상 영장류 반복투여독성시험을 진행함.
- 식약처에서 여러 전문가들(병원, 대학, 국외 독성전문가 등)에게 받은 자문의견으로는 비글견 종민감성에 관한 명확한 근거자료가 필요하다는 견해였다고 함.
- 비글견 종민감성에 관한 명확한 근거자료(대사체연구에 관한 객관적 실험자료)을 제출하던지, 곰보배추에 가장 민감하게 반응한 비글견에서 최대무독성용량(NOAEL)을 설정하는 39주 반복투여독성시험을 재진행 해야 IND승인이 가능하다고 함.
- 대사체연구 및 추가적인 비임상시험을 본 과제외 연구기간 내에 진행 할 수 없기 때문에 임상연구를 수행하지 못하고 과제를 종료함.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

(1) 최종목표

본 연구의 목표는 국내 농산물 자원 유래 기능성 성분(추출물 또는 분획물)을 활용하여 골다공증 질환 치료용 식·의약 소재를 개발하고 산업화하는 것으로, 전임상 및 임상시험을 통하여 성공적인 천연물 유래 신약을 개발하고 새로운 시장창출의 성공모델을 제시하고자 함.

(2) 세부목표

<제1세부 한국생명공학연구원>

- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 대량화 및 표준화 연구
- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 지속적인 원료 공급 및 QC/QA
- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 작용기작 구명 연구
- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 *in vivo* 작용기작 구명 연구
- 국내 농산물 자원 유래 기능성 성분의 작용기작 구명 심화 연구

<제1협동 고려제약주식회사>

- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 제제 안정성 및 제형 연구
- 국내 농산물 소재 유래 기능성 성분의 전임상 시험 완료
- 임상 2상 완료 및 임상 3상 IND 신청

3-2. 목표 달성여부

구분	연구개발의 목표	달성내용	관련페이지	달성도(%)
1차년도	<주관: 한국생명공학연구원 지역 농가와와의 계약 재배	<ul style="list-style-type: none"> • 정읍시, 고창군 농업기술센터와 협력하여 전라도 내 지역 농가 (고창군의 질마재 농장, 장흥군의 매화 농장)과의 계약 재배로 3배지 분량의 임상 시험용 원료 수급 완료 	<ul style="list-style-type: none"> • p 46 	100
	<주관> 임상시험을 위한 후보 농산물소재 추출물의 대량생산 공정개발	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 조건의 실험을 통해 곱보배추의 연조 엑스 제조를 위한 최적 추출 조건 확립 (추출 온도, 건조 대비 용매의 양, 추출 시간 등) • 생리활성 화합물 분리정제 • 효능검증 	<ul style="list-style-type: none"> • p 44 • p 12-20 • p 21-33 	100
	<주관> 후보 농산물 소재 추출물의 QC/QA를 위한 표준분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 식약처 가이드라인에 적합한 HPLC-DAD, TLC를 활용한 기준시험법을 개발 완료 	<ul style="list-style-type: none"> • p 47-50 	100
	<1협동: 고려제약주식회사> 간이효력 재검증 시험	<ul style="list-style-type: none"> • 국내 산지별 곱보배추 농장 3곳의 IL-6/STAT3, 파골세포 분화 억제 효과 재검증 	<ul style="list-style-type: none"> • p 79 	100
	<1협동> 원료의 안정성 시험	<ul style="list-style-type: none"> • 가속시험, 장기보전시험, 가혹시험 개시 (원료) 	<ul style="list-style-type: none"> • p 98-105 	100

	<1협동> 전임상 시험	<ul style="list-style-type: none"> GLP기관과 계약 후 전임상 시험 개시 	<ul style="list-style-type: none"> p106-138 	100
2차년도	<주관> 후보 농산물 소재 원료의 지속적인 QC/QA	<ul style="list-style-type: none"> 전임상 시료의 IL-6/STAT3, 파골세포 분화 억제 등의 활성 재검증과 지표성분 함량 평가 재배지 농산물 자원 품질검사 	<ul style="list-style-type: none"> p 60-61 p 61-62 	100
	<주관> 후보 농산물의 공급을 위한 농가와의 계약재배	<ul style="list-style-type: none"> 곰보배추 농장과의 계약재배를 농가 소득 발생과 의약품 원료의 안정적 공급 실현 	<ul style="list-style-type: none"> p 46 	100
	<주관> 후보 농산물 소재 유래 기능성 성분의 생리활성 연구	<ul style="list-style-type: none"> 후보 농산물 소재 유래 기능성 성분의 생리활성 연구, 생리활성 화합물의 면역세포 활성화 및 인테그린 발현에 미치는 영향 연구 생리활성 화합물 분리정제 	<ul style="list-style-type: none"> p 23-34 p 12-20 	100
	<1협동> 효력시험	<ul style="list-style-type: none"> 난소적출 마우스 모델 및 파골세포를 이용한 골다공증 효력검증 	<ul style="list-style-type: none"> p 80 	100
	<1협동> 기준 및 시험법 설정	<ul style="list-style-type: none"> 원료 기준 및 시험법 설정 완료 완제 기준 및 시험법 설정 완료 	<ul style="list-style-type: none"> p 81-87 	100
	<1협동> 대량생산 공정법 확립	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산 공정법 확립 완료 	<ul style="list-style-type: none"> p 88-90 	100
	<1협동> CMC 제제 및 제형연구	<ul style="list-style-type: none"> 제형별 연구: 연질캡슐, 경질캡슐, 타블렛 제형별 성장, 경도, 용출, 붕해 등에 관한 연구 	<ul style="list-style-type: none"> p 91-93 	100
	<1협동> 포장 적합성시험	<ul style="list-style-type: none"> 포장 적합성시험 완료 	<ul style="list-style-type: none"> p 94-95 	100
	<1협동> 안정성 시험	<ul style="list-style-type: none"> 가속, 가속시험 완료 장기시험 개시(완제) 	<ul style="list-style-type: none"> p 98-105 	100
	<1협동> 전임상 시험	<ul style="list-style-type: none"> 레드 전임상시험 가. 단회투여독성시험 완료 나. 4주 반복 용량결정(DRF)시험 완료 다. TK Validation 완료 라. 유전독성시험 완료 마. 안전성약리시험 완료 바. 26주 반복투여 독성시험 완료 비글견 전임상시험 가. TK Validation 완료 나. 4주 반복 용량결정(DRF)시험 완료 	<ul style="list-style-type: none"> p106-138 	100
	<1협동> 임상시험	<ul style="list-style-type: none"> 임상 CRO기관 계약완료 	<ul style="list-style-type: none"> p139-158 	100
	3차년도	<주관> 지속적인 임상시험용 원료 및 원물에 대한 활성 검증 및 지표성분 함량에 대한	<ul style="list-style-type: none"> 후보 농산물 소재 원료의 지속적인 QC/QA를 위하여 파골세포 분화 억제 활성 및 확립된 분석법을 이용한 함량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> p 63-64

	정량 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 마우스를 이용한 천연물 소재 원료의 용법설정 및 효력검증 연구 - QD(Once a day), BID(Twice a day), TID(Three times a day) 중 용법설정 • 곰보배추 성분프로파일링 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • p 64-67 • p 52-58 	
	<p><주관> 후보 농산물 유래 기능성 성분(추출물, 분획물, 또는 활성성분)의 골다공증 치료효능에 대한 작용기작 구명 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 신규 화합물 도출 및 활성 검증 • 곰보배추 활성분획물에 대한 파골세포 분화활성 검증 • 조골세포에 미치는 작용 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • p 12-33 • p 74-76 • p 33 	100
	<p><주관> 전남 장흥 군 매화농장을 통한 후보 농산물의 지속적인 계약재배 실시</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 형태/해부학적 분석자료, 분자계통학적 분석자료, DNA 분석자료 등을 이용한 원료 기원 조사 • 도내 곰보배추 농장과의 계약재배를 농가 소득 발생과 의약품 원료의 안정적 공급 실현 	<ul style="list-style-type: none"> • p 58-59 • p 46 	100
	<p><1협동> 제제개선연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 제제 개선연구 완료 	<ul style="list-style-type: none"> • p 96-97 	100
	<p><1협동> 안정성 시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 장기보존시험 12개월 완료(원료, 완제) 	<ul style="list-style-type: none"> • p 98-105 	100
	<p><1협동> GLP기관을 통한 전임상시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 비글 26주 독성시험 완료 • 원숭이 39주 독성시험 개시 	<ul style="list-style-type: none"> • p106-138 	100
	<p><1협동> CRO기관을 통한 임상 2상 시험 준비</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 임상 2상 프로토콜 완료 • IND filing 완료 (비설치류 만성 독성 제외) 	<ul style="list-style-type: none"> • p139-158 	100
4차년도	<p><주관> 지속적인 임상시험 원료의 활성 검증 및 지표성분 함량에 대한 정량 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 전임상 및 임상시험 성분프로파일링 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • p 70-73 	100
	<p><주관> 지속적인 후보 농산물 유래 기능성 성분의 작용 기작 구명 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 곰보배추로부터 분리된 유효화합물에 대한 효능 및 작용기전 연구 • LPS-유도 염증성 골다공증 동물모델에서 <i>in vivo</i> 효능검증 • 난소 적출 골다공증 동물모델에서 <i>in</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • p 22-28, p 39-40 • p64-65 • p 63-64 	100

		vivo 효능 검증		
	<1협동> 안정성 시험	<ul style="list-style-type: none"> 장기보존시험 24개월 완료 (원료, 완제) 	<ul style="list-style-type: none"> p 98-105 	100
	<1협동> GLP기관을 통한 전임상시험	<ul style="list-style-type: none"> 영장류 만성 39주 반복투여독성 중간결과 보고서 완료 	<ul style="list-style-type: none"> p106-138 	100
	<1협동> CRO기관을 통한 임상 2상 시험 준비	<ul style="list-style-type: none"> 임상 2상 프로토콜 개정 CTD 작성완료 	<ul style="list-style-type: none"> p139-158 	100
5차년도	<주관> 지속적인 임상시험 원료의 활성 검증 및 지표성분 함량에 대한 정량 분석	<ul style="list-style-type: none"> 곰보배추 분획물의 세포독성 및 활성 검증 - 적응증 확대연구 	<ul style="list-style-type: none"> p 77-78 	100
	<주관> 지속적인 후보 농산물 유래 기능성 성분의 작용 기작 구명 심화 연구	<ul style="list-style-type: none"> 곰보배추로부터 분리된 유효화합물에 대한 효능 및 작용기전 연구 	<ul style="list-style-type: none"> p 22-28, p 39-40 	100
	<1협동> 안정성시험	<ul style="list-style-type: none"> 안정성시험(가속, 가속, 장기) 완료 (원료, 완제) 	<ul style="list-style-type: none"> p 98-105 	100
	<1협동> GLP기관을 통한 전임상시험	<ul style="list-style-type: none"> 영장류 만성 39주 반복투여독성 시험완료 	<ul style="list-style-type: none"> p106-138 	100
	<1협동> CRO기관을 통한 임상 2상 시험 준비	<ul style="list-style-type: none"> 임상 1,2상 동시진행 프로토콜 개정 임상 1상 실시기관 계약완료 임상 1,2상 동시진행 IND 신청 및 반려 	<ul style="list-style-type: none"> p139-158 	70

3-3. 관련분야 기여도

- 골다공증 치료제 개발에 필요한 효능평가기술, 독성평가기술 등의 기반 기술 및 노하우를 확보함으로써 향후 다양한 천연물 의약품 개발을 위한 기반 기술 확립에 기여
- 국내 농산물 자원의 신소재화
 - 국내 농산물자원인 곰보배추(곰보배추)를 이용하여 골다공증 치료제 개발에 적용 가능한 고부가가치 신소재로 개발
 - 향후 농산물 신소재를 이용한 천연물 기능성소재 개발 분야에 원천기술 확보를 위한 적절한 모델을 제시하였다고 판단됨
- 원료 표준화 공정 및 안정성
 - 원료 품질 확인을 위한 일원화된 COA (Certificate Of Analysis) 확립 : 건조감량, 성분, 중금속, 잔류농약 분석, 미생물 한도시험, 비중 등의 지표 항목 설정 및 신규 기시험 확립

- 기속, 가혹, 장기보존 연구 결과 확보를 통한 신소재에 대한 안정성 시험 기술 확립
- 향 후 농산물 신소재 개발을 위한 표준화 원천기술에 적용 가능할 것으로 기대됨
- 제조 공정 확립 및 공정화
 - 원료가 적용된 시작품의 기능성 극대화를 위한 제품 공정 확립함
 - 지표성분 연구를 통한 기준 및 시험방법을 확립하고 그 시험법을 바탕으로 대량추출 원료 생산 제조공정 및 표준화 완료함
- 제품 안정성 확립 및 분석법 연구
 - 시제품에 대한 온도 변화에 따른 변화 측정 시험 통하여 완제 안정성 시험 확립함
 - 첨가된 원료에 따른 제품에서의 함량분석 방법을 확립함
 - 확립된 제품의 공정 및 함량 분석방법을 이용하여 제품에 대한 기준 및 시험방법을 확립함
 - 시제품에 대한 안정성 확립 및 분석법 연구를 확립함으로써 제품의 안정성, 분석법 적용 가능할 것으로 기대됨

3-4. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

3-4-1. 목표 미달성 원인(사유) - IND반려

- 전임상 비설치류(비글) 반복투여독성시험에서 최대무독성용량(NOAEL)이 설정되지 않았음(가장 저용량인 250mg/kg 투여군에서도 간독성이 나타났음)
- 비글견의 중민감성으로 판단하고 전 임상 영장류 반복투여독성시험을 진행함.
- 식약처에서 여러 전문가들(병원, 대학, 국외 독성전문가 등)에게 받은 자문의견으로는 비글견 중민감성에 관한 명확한 근거자료가 필요하다는 견해였다고 함.
- 비글견 중민감성에 관한 명확한 근거자료(대사체연구에 관한 객관적 실험자료)을 제출하던지, 곰보배추에 가장 민감하게 반응한 비글견에게 250mg/kg이하로 투여하여 최대무독성용량(NOAEL)을 설정하는 39주 반복투여독성시험을 재진행 해야 IND승인이 가능하다고 함.
- 국책과제 시간상으로 해당 대사체연구 및 비임상시험을 진행 할 수 없을뿐더러, 250mg/kg이하로 최대무독성용량(NOAEL)을 설정할 경우 약효과를 기대하기 어려움.
- IND 반려(2019.05)

3-4-2. 차후대책

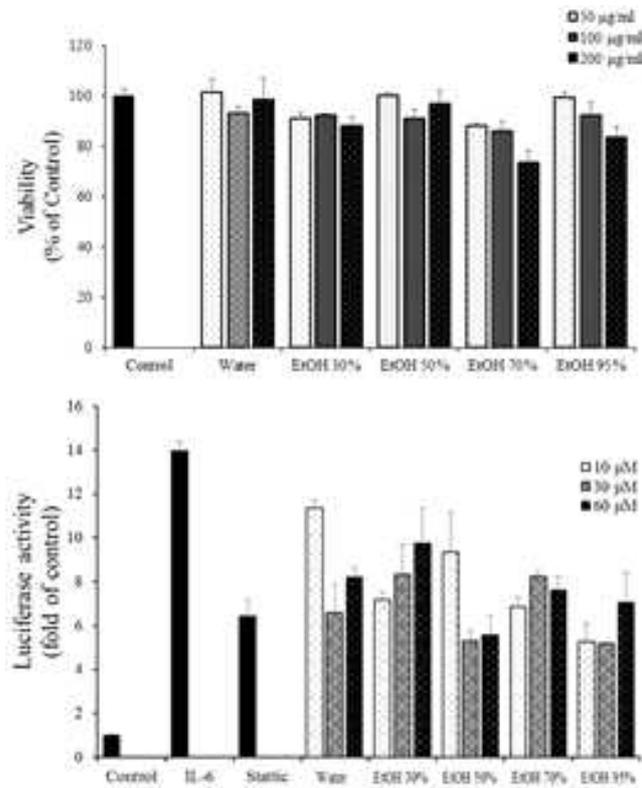
- 원료개량을 통하여 지속적으로 신약개발 진행

1) 원료개량(완료)

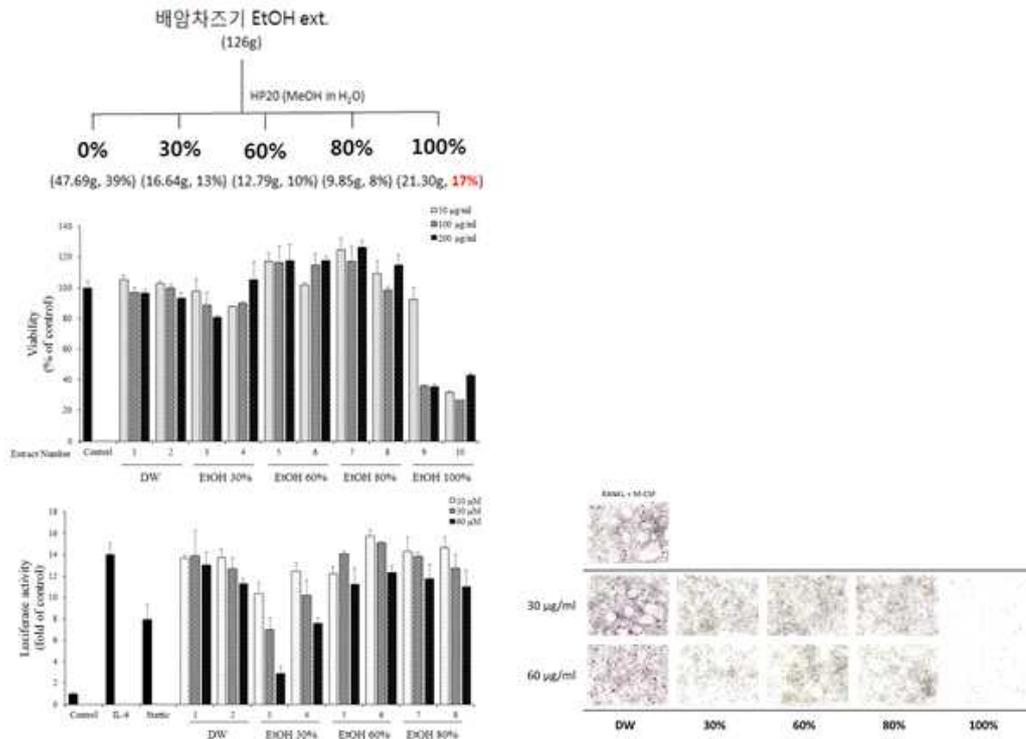
- (1) 추출용매 변경(30, 50, 70% EtOH)
- (2) HP20 칼럼크로마토그래피법 활용

2) in vitro 독성 및 활성시험(완료)

- (1) EtOH농도별 추출물 in vitro 활성 및 독성 확인



(2) HP20 컬럼크로마토그래피법 이용한 활성분획물별 in vitro 활성 및 독성 확인



간세포(Hep3B)를 이용한 독성실험결과, HP-20 컬럼크로마토그래 100% 분획물에서 독성이 관찰됨. 이를 통해 HP-20을 활용한 공정상 독성물질이 제거 될 수 있음을 확인하였음.

3) in vivo(non-GLP) 독성 및 활성시험

- (1) 곰보배추 소재의 EtOH농도별 추출물 및 HP20 컬럼크로마토그래피법 이용한 활성분획물별 in vivo 활성(적응증탐색) 및 독성평가 예정(2020년)
 - 독성제거 추출물 선정 및 적응증 선정

4) 작용기전 연구

- (1) 선정된 적응증에 관한 작용기전 연구

5) 표준화 및 규격화 연구

- (1) 지표물질 및 생리활성 물질의 분리/정제, 구조 동정
- (2) 원료의 지표물질 3종 이상 선정
- (3) 원료의 표준화를 위해 지표성분의 분석법 개발
- (4) 도출된 소재의 생물전환에 의한 활성증진 연구
- (5) 최적 배합비 연구 및 표준화

6) 실험실 및 대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립

- (1) 추출물 제조공정의 개발 및 최적화
- (2) 대량생산 공정 기술 개발
- (3) 대량생산된 원료의 QC/QA 분석법 확립
- (4) MV(method validation) 확립

7) 제형 개발

- (1) 제형의 물성 평가 및 제제연구
- (2) 제조공정 확립 및 표준화

8) 제품 안정성 확립 및 분석법 연구

- (1) 제제 가속/가혹 안정성시험
- (2) 장기 안정성 시험 및 분석(성상, 함량 등)
- (3) 기준 및 시험방법 확립

9) 전임상(GLP) 시험 (* 선정된 적용중에 따라 전임상항목 변동 있을 수 있음.)

- (1) 선정된 개량원료의 전임상시험 진행
 - 일반 독성시험 : 단회투여독성(설치류, 비설치류), 반복투여독성(설치류, 비 설치류),
 - 안전성 약리시험 : 중추신경계, 호흡기계, 심혈관계, hERG assay
 - 유전독성시험 : 복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험

10) 임상 시험

- 추적평가기간(과제종료 후 3년) 이후 임상 IND승인, 임상 1/2진행예정

• 향후계획 Real Time Schedule(RTS)

연도	2019년	2020년	2021 -2024년		2025년 이후
수행항목					
원료개량	추출용매 변경 및 HP20겔럼 이용				
In vitro	독성 및 활성 시험				
In vivo (non-GLP)		적응증 탐색 및 독성평가 (개량원료 선정)			
기전연구		선정된 적응증에 대한 기전연구			
표준화		원료의 표준화 및 규격화 연구			
대량생산		대량생산공정 확립			
제제연구		제형연구 및 제조공정 확립			
안정성			제품 안정성 확립		
전임상시 험			선정된 개량원료의 전임상시험		
임상시험					임상IND승인 및 임상1/2상 진행

추적평가 기간 (과제종료 후 5년)

4. 연구결과의 활용 계획 등

▶ 활용방안

- 골다공증 치료제 중 국내 80% 정도의 시장을 차지하고 있는 bisphosphonate 계열 제품은 장기 복용 시 턱 괴사 및 치조골에 문제가 생기는 등 부작용이 빈번하게 보고되고 있음. 따라서 골다공증 치료제의 안전성이 대두되고 있으며, 많은 제약회사들이 효력은 같으나 부작용이 적은 치료제 개발에 주력하고 있음. 본 과제를 통하여 농산물로부터 골다공증 치료 효능이 우수한 천연물 신약을 개발한다면 독성이나 부작용 걱정 없이 안전하게 복용할 수 있는 새로운 골다공증 치료제가 나올 것으로 기대함.
- 또한 본 연구팀의 선행연구 결과, 하나의 농산물 소재가 골다공증 치료 효능 외에 타 질환에도 뚜렷한 유의적 치료효과가 나오므로 하나의 원료로 여러 적응증에 들어가는 천연물 신약이 될 가능성이 높음.

▶ 기대성과

1. 경제·산업적 측면

- 골다공증 치료제의 경우 대다수의 매출이 종합병원에서 일어나며 이를 바탕으로 의원으로 확대되는 시장구조로 되어있음. 본 과제의 협동과제 기업인 고려제약은 총매출액의 35% 이상이 종합병원 매출이며 해외수출 파이프라인(동남아 7개국+에콰도르 등 중남미 수출)도 가지고 있어서 빠른 시간 안에 국내·외 골다공증 치료제 시장의 점유 및 매출신장을 가져올 수 있을 것으로 기대함.
- 기존의 천연물 의약품 원료의 대다수가 중국산 제품으로 지금까지 천연물 의약품 개발과 국내 농가소득은 직접적인 관련이 없었음. 하지만 본 과제를 성공적으로 수행한다면 계약재배를 통한 국내산 농산물을 천연물 의약품의 원료로 기업에 지속적으로 공급할 수 있는 새로운 루트를 열게 됨.
- 국내 농가와 기업 간의 계약재배로 인한 농가의 일자리 창출 및 지역기업의 생산직, 영업직 등의 일자리 증가, 고부가가치 농산물의 생산 및 증가로 인한 농가소득의 증대 등을 가져올 수 있음.
- 기존 골다공증 치료제 및 원료의 수입을 잠식하여 국내 외화의 유출을 막고 국내제품의 수출을 통한 외화 획득을 가져올 수 있음.

2. 과학 기술적 측면

- 농산물 신소재를 골다공증 치료제 개발에 적용함으로써 기초 원천기반기술의 개발을 가져올 수 있음.
- 향 후 농산물 신소재를 이용한 천연물 치료제 개발 사업에 원천기반기술뿐만 아니라 전임상/임상시험의 적절한 모델로 이용될 수 있음.
- 유효 생리활성 신소재의 발굴은 국가 5대 중점연구 분야와 연계성 연구가 가능함으로써 시너지 효과를 창출할 수 있음.

붙임. 참고문헌

- Kim JY, Oh HM, Kwak SC, Cheon YH, Lee MS, Rho MC, et al. Purslane suppresses osteoclast differentiation and bone resorbing activity via inhibition of Akt/GSK3 β -c-Fos-NFATc1 signaling in vitro and prevents lipopolysaccharide-induced bone loss in vivo, *Biol Pharm Bull.* (2015) 38, 66-74.
- Kim JY, Cheon YH, Oh HM, Rho MC, Erkhembaatar M, Kim MS, et al. Oleanolic acid acetate inhibits osteoclast differentiation by downregulating PLC γ 2-Ca(2+)-NFATc1 signaling, and suppresses bone loss in mice, *Bone* (2014) 60, 104-111.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342.
- Kim SD, Kim HN, Lee JH, Jin WJ, Hwang SJ, Kim HH, Ha H, Lee ZH (2013) Trepidil, a platelet-derived growth factor antagonist, inhibits osteoclastogenesis by down-regulating NFATc1 and suppresses bone loss in mice. *Biochem Pharmacol.* 86:782-790.
- Heino TJ, Hentunen TA (2008) Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells, *Curr Stem Cell Res Ther* 3:131-145.
- Léotoing LI, Wauquier F, Guicheux J, Miot-Noirault E, Wittrant Y, Coxam V (2013) The polyphenol fisetin protects bone by repressing NF- κ B and MKP-1-dependent signaling pathways in osteoclast. *PLoS One* 8:e68388.
- Li CH, Zhao JX, Sun L, Yao ZQ, Deng XL, Liu R, Liu XY (2013) AG490 inhibits NFATc1 expression and STAT3 activation during RANKL induced osteoclastogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 435:533-539.
- O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC (1999) STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem* 274:19301-19308.
- Le Goff B, Blanchard F, Berthelot JM, Heymann D, Maugars Y (2010) Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 77:201-205.
- Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3:889-901.
- Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM (2006) RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12:17-25.
- Leibbrandt A, Penninger JM (2008) RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 1143:123-150.
- Shinohara M, Chang BY, Buggy JJ, Nagai Y, Kodama T, Asahara H, Takayanagi H (2014) The orally available Btk inhibitor ibrutinib (PCI-32765) protects against osteoclast-mediated bone loss. *Bone* 60:8-15.

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.