11-15
43000
-0018
88-01

골형성 촉진작용을 갖는 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재 개발 최종보고서 2017 농림축산식품부

고부가가치식품개발사업 R&D Report

발 간 등 록 번 호
11-1543000-001888-01

골형성 촉진작용을 갖는 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재 개발

최종보고서

2017. 9. 15.

주관연구기관 / ㈜내츄럴엔도텍
협동연구기관 / 국민대학교

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "골형성 촉진작용을 갖는 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재 개발"(개발기간 : 2014. 8. 1 ~ 2014. 7. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 9. 15.

주관연구기관명 : ㈜내츄럴엔도텍 (대표자) 장현우 (인)
협동연구기관명 : 국민대학교 산학협력단 (대표자) 임홍재 (인)

주관연구책임자 : 이용욱
협동연구책임자 : 오상택

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>114030-3</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2014. 8. 01~
2017. 7. 31</td><td>단 계 구 분</td><td>1 / 1</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>세부 사업명</td><td colspan="4">고부가가치식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">골형성 촉진작용을 갖는 골 건강(골다공증) 개선
기능성 식품 소재 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">이용욱</td><td>해당단계
참 여
연구원 수</td><td>총: 28명
내부: 28명
외부: 명</td><td>해당단계
연 구 개 발 비</td><td>정부: 200,000천원
민간: 67,000천원
계: 267,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참 여
연구원 수</td><td>총: 28명
내부: 28명
외부: 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 600,000천원
민간: 201,000천원
계: 801,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="2">㈜내츄럴엔도텍 생약호르몬연구소</td><td colspan="2">참여기업명: ㈜내츄럴엔도텍</td><td></td></tr>
<tr><td>협 동 연 구</td><td colspan="2">연구기관명: 국민대학교</td><td colspan="2">연구책임자: 오상택</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4"><u>요약</u>

본 과제에서는 현재 사용 중인 치료제의 여러 단점들을 극복하기 위하여, 골형성 촉진작용과 골소실 억제 기능성이 뛰어나며 안전성이 확보되어 부작용이 최소화된 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재를 개발하는 것을 목표로 연구를 진행하였다.
동물 모델을 이용한 비임상 효력시험을 통해 최종 후보물질의 효능을 확인하였으며, 후보소재의 안전성을 평가하기 위한 단회투여 독성외 6종의 독성시험에서 안전성을 확보하였다.

또한 개발 소재의 표준화 및 품질관리 기준을 설정하였으며 시제품의 제형을 결정하고 개발제품에 대한 안정성 시험을 진행하였다.

개발소재의 용도 특허출원/등록 등 및 학술지 투고를 통하여 과학적 근거자료를 마련하였다.</td><td colspan="2">보고서 면수: 70</td></tr>
</table>

국문 요약문

코드번호	D-01

연구의 목적 및 내용	골다공증은 대사성 골 질환 중 가장 흔한 질병으로 가벼운 충격에도 골절이 일어나서 보행기능을 상실하게 함으로써 삶의 질을 현저히 저하시키며, 더구나 급속한 노령화가 진행되는 현대사회에 골건강을 유지하기 위한 노력이 계속적으로 이루어질 수밖에 없는 실정이다. 현재까지 이루어진 골다공증 치료제의 대부분은 골분해(흡수) 억제제로서 주로 골다공증의 진행을 예방하는데 치우치고 있으며, 골형성 촉진 기능을 갖는 파라티로이드호르몬(PTH) 제제의 경우는 호르몬이라는 한계가 있다. 이러한 이유로 본 과제에서는 현재 사용 중인 치료제의 여러 단점들을 극복하기 위하여, 골형성 촉진작용과 골소실 억제 기능성이 뛰어나며 안전성이 확보되어 부작용이 최소화된 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재를 개발하는 것을 목표로 다음과 같은 연구를 진행하였다. □ 골형성 촉진 활성 및 골흡수 억제 활성을 갖는 신규 생약 소재 탐색 연구 □ 신규소재 추출물을 이용한 골 건강 및 골다공증 개선용 기능성 식품소재 개발 □ 개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표(과학적 근거자료 마련) □ 개발소재의 품질관리설정 및 표준화(물질특성연구 등) □ 효력평가, 제형결정 및 개발제품의 안정성시험결과 확보(허가제출자료) □ 비임상 효력시험 및 독성시험 완료 (후속 개발을 통해 인체효력시험 진행이 가능한 수준의 개발자료 확보) □ 인체 효력 시험 진행 - 개별인정 가이드라인 (IRB 심의 완료)
연구개발성과	염증성 사이토카인은 골의 흡수를 강하게 자극할뿐만 아니라, 골세포의 분화를 방해한다고 알려져 있다. 식품 및 생약 소재 220 종 (관련 분획 총 1,000 종) 중 항염 활성을 갖는 소재 24종을 1차 선별하였고, 조골세포 분화 촉진 활성 (ALP, alkaline phosphatase) 시험을 통해 스크리닝을 진행하였으며, 추가적으로 파골세포 억제시험법을 구축하여 두 in vitro 평가에서 우수한 활성을 보이는 생약을 선별 후, 오랫동안 식용으로 사용하여 왔으며 식품으로 사용 가능한 원료(식약처 관련 자료 및 식품공전)로 안전성에 문제가 없는 소재를 중심으로 최종 1종의 골 건강 기능성 후보 생약소재 (용안육)을 선정하였다. **1. 개발 소재의 선정 및 효능연구** **(1) 생약원료 선정구매/ 시료제조 및 in vitro 효능평가** - 항염활성을 갖는 식품 및 생약소재를 참조하여 식품으로 사용 가능한 소재를 탐색하여 후보 생약소재 원료 선정. - ALP 조골세포 분화 촉진 활성 평가 시스템 구축 및 활성 평가. - TRAP 파골세포 분화 억제 활성평가 시스템 구축 및 활성 평가. - 개발 가능성이 높은 생약소재 3종 (용안육, 상지, 양강) 선정. - 최종 3종에 대한 추출물 및 각 분획물의 in vitro 활성평가와 동물시험 결과 시제품 생산 후보 생약을 용안육으로 최종 선정.

연구개발성과	**(2) 조골세포분화 유도 작용기전 연구** - 조골세포 분화 표지 유전자 발현 조절 관찰(ALP, Rnux2, Osteocalcin) - Wnt/b-catenin 신호전달체계 영향 관찰 - Erk1/2 신호전달체계 영향 관찰. - p38, JNK 신호전달체계 영향 관찰 **(3) 파골세포분화 억제 작용기전 연구** - NF-kB 신호전달체계의 영향 관찰(IkB-a) - 파골세포 분화 특이적 유전자 발현 조절 관찰(Trap) - 파골세포 분화 표지 단백질 발현 조절 관찰(NFATc1,NF-kB) **2. 원재료 제조 및 기준 · 규격 설정** **(1) 최적 추출공정 확립** - 추출 용매, 추출 시간, 추출 온도 선정 - 추출물 제조공정 변수에 따른 ALP 활성평가 및 유전자 발현 확인 - 추출 용매량, 추출 회수 선정 **(2) 원료 기준 및 규격 확립** - 지표성분 설정 및 분석법 개발 - 분석법 검증(특이성, 직선성, 정확성, 정밀성) - 원료 파일럿 생산 **(3) 완제 제조 및 기준 · 규격 설정** - 원료의 흡습성 및 용해도 평가 - 처방연구 - 완제의 기준 규격 확립 - 분석법 검증(특이성, 직선성, 정확성, 정밀성) **3. 비임상 효력시험 완료** **(1) 난소절제 랫드모델을 이용한 골다공증 치료 효력시험** - 선별된 용안육, 상지, 양강 3종에 단일추출물을 대상으로 설치류 난소절제 동물을 이용해 골다공증 치료 동물효력 평가. - 설치류 난소절제 동물모델 효력평가 시험을 통하여 BMD 및 CTx 수치에 유의성을 보인 용안육, 상지 추출물 원료 선정. **(2) 난소절제 랫드모델을 이용한 골다공증 예방 효력시험** - 선별된 용안육, 용안육·상지 복합추출물을 대상으로 난소절제 유발 이전부터 선투여를 진행하여 골다공증 예방 동물효력 평가. - 설치류 난소절제 동물모델 효력평가 시험을 통하여 골밀도 개선이 유의적으로 높았던 용안육 열수 추출물 최종 원료 선정.

연구개발성과	**(3) 제브라피쉬 모델을 이용한 골형성 효력시험** - 최종 선별된 용안육 열수추출물을 대상으로 제브라피쉬 모델을 이용한 골형성 촉진 영향 평가. - 비설치류 제브라피쉬 모델 효력평가 시험을 통하여 뼈 형성 및 체절의 형성이 증가되어 골 형성이 촉진되는 것을 확인함. **4. 허가자료 준비** **(1) IRB 신청자료 구비** - '의약외품 품목허가·신고·심사·규정'에 따라 안전성·유효성 심사 자료 준비. - 원료 및 완제의 물리·화학적 (Chemistry) 자료, 제조공정 (Manufacturing)에 관한 자료, 기준 및 규격설정과 안정성 (Controls)에 관한 자료 준비. **(2) CMC(Chemistry, Manufacturing and Controls) 패키지 구축** - 원료와 완제의 품질관리 기준 및 안정성 확보. - 원료 및 완제의 제조공정, 지표성분 선정, 분석법 검증, 기준 및 규격 설정, 안정성 평가 진행. **(3) 안정성 평가** - 장기보존조건 (25±5℃, 60±5% RH)과 가속조건 (40±5℃, 75±5% RH)에서 안정성 시험 진행. - 원료(최대 15개월), 시작품(최대 2개월)의 지표성분 유의적 함량변화 없음. **(4) 비임상 독성시험 안전성 평가** - SD-Rat를 이용한 단회 투여 독성시험 완료. - 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험 완료. - 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 완료. - 제브라피쉬 모델을 이용한 발생독성, 심장독성, 간독성, 신경독성 시험 완료. **(5) 임상시험 IRB 심사 접수** - 고려대학교 구로병원 IRB 심의 완료 **5. 개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표** - 특허 : 2건 출원, 1건 등록 - 논문발표 : 3건 게재 완료 - 학술발표 : 7건 실시 완료 - 홍보: 관련 전시 2건 완료
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	**[활용계획]** - 천연 생약 원료를 이용한 기능성 소재 추출물의 탐색과 제조 노하우 및 대량 제조 공정 확보로 신제품 개발, 양산화 및 약효, 독성 데이터 확보 - 골 건강(골다공증) 개선 제품의 국내 및 해외 사업화 - 기능성 핵심소재 및 완제품의 국내외 매출 창출.

<table>
<tr><td>연구개발성과의
활용계획
(기대효과)</td><td colspan="5">- 신규 기능성 소재의 식약처 개별인정 획득.
- 천연 소재 유래의 세포 분화 촉진 연구를 통해 골다공증 치료제 뿐 아니라 다양한 대사성 질환의 치료제 개발을 위한 라이브러리 구축 가능.
- 건강기능식품 제품 외 해외 nutraceuticals 제품 및 향후 골다공증 개선 천연물 의약품 시장으로 확장 가능
- 천연물 유래 기능성 소재와 마이크로칼슘 및 비타민 D 복합 제제로 기능성 시너지 극대화
- 골형성 촉진 및 골흡수 억제의 이중 작용기전을 갖는 신개념 골다공증 개선제로 활용 가능.

[기대 효과]
1. 기술적 측면
- 조골세포 분화 촉진 및 파골세포 저해활성을 갖는 천연 생약 추출 분획 탐색 기술 확보
- 신규 기능성 소재의 추출 공정 및 표준화 기술 확립
- 기존 치료제의 문제점을 해결한 안전한 기능성 골 건강(골다공증) 소재 개발
- 신규 작용기전의 골 건강 소재 개발로 골다공증과 노화로 인한 대사성 질환의 새로운 치료 요법의 가능성 확인
- 의약품 등 타 산업분야로 응용 가능

2. 경제적 · 산업적 측면
- 기능성 식품 산업을 기반으로 nutraceuticals 및 의약 기술을 접목시킨 융합 기술 확립
- 경쟁력 있는 고부가가치의 생약 소재의 사업화 및 재배권장 자원의 실용화 사업으로 국내 농가 소득 증대 기여
- 미국 시장 진출을 통한 수입 대체 효과 및 외화 수입 증대 효과
- 골다공증 환자로 인한 사회적 비용을 줄임으로써 산업 발전의 기여가 가능</td></tr>
<tr><td>중심어
(5개 이내)</td><td>뼈 건강</td><td>골다공증</td><td>조골세포
분화촉진</td><td>파골세포
분화억제</td><td>기능성 식품</td></tr>
</table>

영문 요약문

〈 SUMMARY 〉

코드번호	D-02

Purpose& Contents	Osteoporosis is one of the most frequently occurring bone diseases with increased risk of fracture leading to gait dysfunction and low quality of life. Also, constant effort on bone health maintenance is critical as it becomes more common with age, and the average age of the population is growing older. Most of the osteoporosis treatments currently available are only capable of preventing the progression of osteoporosis with the inhibition of resorption, and parathyroid hormone treatment with bone formation stimulating effect provides limited use due to its hormonal properties. Therefore, the purpose of this study is to select candidate ingredients and develop safe health functional food for bone health products with bone formation activation and bone resorption inhibition with minimum side effects, and also overcoming the current disadvantages of current treatments. ☐ Study on new herbal medicine ingredient of bone formation induction activity and bone resorption inhibition activity ☐ Development of new functional food materials extract on bone health and osteoporosis improvement ☐ Utility patent and journal publication (for scientific evidence) of the developed product ☐ Establishment of quality control standards and standardization (research on material property) of the developed product ☐ Efficacy evaluation, formulation selection, and stability data (for regulatory documents) of sample product ☐ Non-clinical efficacy and toxicity studies (sufficient preliminary data for future clinical efficacy studies) ☐ Clinical efficacy studies - Guidelines for the individual recognition (IRB approved)
Results	**1. Establishment of quality control standards and standardization** **(1) Selection of herbal medicine ingredient / sample preparation for in vitro efficacy evaluation** - Screening and selection of herbal medicine ingredients based on the ingredients allowed to be used as food and other quasi-drugs for anti-inflammation. - Establishment and evaluation of ALP stimulation activity of osteoblast differentiation - Establishment and evaluation of TRAP inhibition activity of osteoclast differentiation

Results	- Selection of 3 herbal medicine ingredients with high potential for development (Dimocarpus longan, Mori Ramulus and Alpinia officinarum) - Final selection of Dimocarpus longan for production of sample products after evaluating the extracts and fractions of 3 herbal medicine ingredients by in vitro and in vivo studies **(2) Study of mode of action (MoA) of osteoblast differentiation activation** - Evaluation of Osteoblast maker gene expression (ALP, Runx2, OCN) - Evaluation of Wnt/b-catenin signaling activity stimulation - Evaluation of Erk1/2 signaling activity stimulation - Evaluation of p38, JNK signaling activity stimulation **(3) Study of mode of action (MoA) of osteoclast differentiation inhibition** - Evaluation of NF-kB signaling activity inhibition (IkB-a) - Evaluation of Osteoclast maker gene expression (Trap) - Evaluation of Osteoclast maker protein expression (NFATc1, NF-kB) **2. Production of raw material and establishment of standards and specifications** **(1) Optimization of extraction condition** - Selection of extraction solvent, time and temperature condition - Evaluation of ALP activity and gene expression for condition - Selection of extraction volume and frequency **(2) Establishment of standards and specifications for materials** - Selection of quality control standards and development of method of analysis - Verification of method of analysis (specificity, linearity, accuracy, precision) - Production of pilot scale **(3) Establishment of standards and specifications for products** - Evaluation of hygroscopic property and solubility - Study on the prescription / formulation - Establishment of standards and specifications - Verification of method of analysis (specificity, linearity, accuracy, precision) **3. Completion of non-clinical efficacy studies** **(1) Efficacy study for osteoporosis on ovariectomized rat model** - Evaluation of efficacy test on animals (rodents OVX rat) with individual extracts of Dimocarpus longan, Mori Ramulus and Alpinia officinarum - Selection of final ingredients of Dimocarpus longan and Mori Ramulus with highest efficacy on BMD and CTx efficacy testing

(2) Efficacy study for osteoporosis on pretreat-ovariectomized rat model

- Evaluation of efficacy test on animals (rodents OVX rat) with individual or mixed extracts of Dimocarpus longan and Mori Ramulus before ovariectomy.
- Selection of final ingredients of Dimocarpus longan with highest efficacy on bone formation (BMD) from rodent OVX rat model

(3) Efficacy study for bone formation on zebrafish model

- Evaluation of bone formation efficacy test on animals (zebrafish embryo) with final ingredients of Dimocarpus longan extracts
- Selection of final ingredients of Dimocarpus longan with highest efficacy on bone formation and segmentation from non-rodent zebra fish model
- Verification of bone formation increase on bone growth and somite efficacy testing in no rodents zebrafish models

4. Regulatory documents

(1) Preparation of IRB documents

- Preparation of documents for safety and efficacy evaluation based on 'Regulation on registration, evaluation, and approval of quasi-drug product'
- Preparation of documents for ingredient and finished product about physicochemistry, manufacturing documents, establishment of specifications and safety control

(2) Preparation of CMC documents for product development

- Establishment of quality control standards and safety of the ingredient and finished product
- Establishment of manufacturing process, selection of marker compounds, verification of method of analysis, standards and specifications, and stability evaluation of the ingredient and finished product

(3) Stability study of ingredient and finished product

- Stability test of real-time condition (25±5℃, 60±5% RH) and accelerated condition (40±5℃, 75±5% RH)
- No significant change in marker compounds in the ingredient (up to 15 months) and the finished product (up to 2 months)

(4) Non-clinical toxicity study

- Completion of single-dose toxicity study with oral administration on SD-Rat
- Completion of bacterial reverse mutation test
- Completion of chromosomal aberration test on mammalian cultured cells
- Completion of teratotoxicity, cardiotoxicity, hepatotoxicity, and neurotoxicity in zebrafish models

Results	**5. Utility patent application and journal publication of developed material** - Patent: 2 applications, 1 registration - Publication: 3 publications completed - Academic conference: 7 presentations at conferences - Advertisement: 2 presentations at conferences
Expected Contribution	**[Application plan]** - Manufacture and efficacy study of non-toxic (low toxic) functional herbal medicine extract for new product development, mass production, and efficacy and toxicity data - Commercialization of functional ingredient for improvement of bone health (osteoporosis) - Increased sales from high added value functional ingredient and its finished product - Acquisition of new health functional food ingredient from MFDS - Establishment of library of new treatment for the age-related metabolic disease through development of natural herbal extract based on the osteoblast differentiation induction mechanism - Expanded usage in global nutraceuticals products and natural pharmaceutical industry - Synergy effect of natural functional ingredient, micro-calcium and vitamin D complex herbal medication - Improvement of osteoporosis drugs based on the dual mechanism of bone formation induction and bone resorption inhibition activity **[Expected outcome]** **1. Technological outcome** - Core technological development based on natural herbal extract through osteoblast differentiation induction and osteoclast differentiation inhibition activity - Establishment of extraction process and standardized technology on new functional herbal extract - Development of safe functional materials for improvement of bone health (osteoporosis) solving the problem of existing treatments. - Increased possibility of new treatment for the age-related metabolic diseases through development of natural herbal extract based on the dual mechanism of bone health - Expanded usage in pharmaceutical industry **2. Economic and Industrial outcome** - Establishment of converging technology of nutraceuticals and drugs based on the functional food industry

Expected Contribution	- Increased agricultural income for high quality herbal medicine supply and cultivation - High value added product and foreign currency profit model through USA market - Reducing social costs that may occur from osteoporosis.				
Key words	Bone Health	Osteoporosis	Bone Anabolic	Anti-Resorptive	Functional Food

〈 Contents 〉

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03

1-1. 연구개발 목적

□ 골형성 촉진 활성 및 골흡수 억제 활성을 갖는 신규 생약 소재 탐색 연구
□ 신규소재 추출물을 이용한 골 건강 및 골다공증 개선용 기능성 식품소재 개발
□ 개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표(과학적 근거자료 마련)
□ 개발소재의 품질관리설정 및 표준화(물질특성연구 등)
□ 효력평가, 제형결정 및 개발제품의 안정성시험결과 확보(허가제출자료)
□ 비임상 효력시험 및 독성시험 완료
(후속 개발을 통해 인체효력시험 진행이 가능한 수준의 개발자료 확보)
□ 인체 효력 시험 진행 - 개별인정 가이드라인

1-2. 연구개발의 필요성

□ 기술 개발의 배경

본 과제는 **조골세포 분화 촉진 활성을 갖는 것으로 선행연구 결과 확인된 신규 생약추출물을 이용하여 안전성이 보장된 골생성 촉진 작용기전을 갖는 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재를 개발하는 것**을 목표로 함.

동시에 과제수행을 통해 골형성 촉진 효과와 골흡수 억제 효과를 갖는 신규 소재의 스크리닝 과정을 진행함으로써 궁극적으로는 **골형성 촉진 및 골흡수 억제의 이중 작용기전을 갖는 신규 복합 추출물을 개발**하는 것을 목표로 하고 있음.

천연 생약소재로부터 다양한 생리적 활성을 탐색하고 이를 제품화로 연계시키까지 꾸준한 연구개발이 진행되었고, 국내 식약처 및 미국 FDA NDI 허가를 받은 당사는 백수오 속단 당귀 외 몇 가지 생약소재가 조골세포(Osteoblast Cell Line) 배양시험을 통해 알카라인 포스포테이즈(alkaline phosphatase, ALP) 발현을 촉진한다는 사실을 확인한 바 있음(Lab. Anim. Res 2008: 24(2), 167-172)으며 해외 인허가 및 국내외 회사와의 공급 및 계약을 맺어 수출을 진행한 경험을 바탕으로 개발성공 시 빠른 시간 내 시장 진출 및 매출 달성이 가능할 것으로 판단됨.

□ 사회적 필요성

골다공증은 대사성 골 질환 중 가장 흔한 질병으로 폐경과 같은 호르몬의 변화, 스테로이드계통의 약물복용, 유전적 요인, 영양섭취, 생활습관 등의 이유로 뼈의 분해와 생성 조화

가 깨어지면서 뼈 분해량이 생성량을 초과하여 발생하게 됨. 골다공증은 가벼운 충격에도 골절이 일어나서 보행기능을 상실하게 함으로써 삶의 질을 현저히 저하하며 궁극적으로 사망에 이르게 하는 전형적인 인간 수명제한 질병 중의 하나라고 할 수 있음.

폐경기 이후 미국 여성의 약 30%는 골다공증에 걸려있으며, 약 50%가 골감소증의 현상을 보이고 있고, 약 2,600만 명이 골다공증에 의한 골절 위험성을 내재하고 있는 것으로 세계보건기구 (WHO)가 보고하고 있음. 또한, 미국에서 이들 골다공증 환자는 매년 약 2%씩 증가할 것으로 예상되고 급속한 노령화가 진행되는 국내에서도 골다공증 환자가 급증하고 있는 상황임. 그리고 지속적인 의학발달로 인해 60세 이상의 노령인구가 전체인구의 약 25% 정도를 차지할 것이 예상되므로 새로운 골다공증 및 골건강 개선 소재의 개발이 절실히 요구된다고 할 수 있음.

국내 통계청에서 발표한 2010년 연령대비 인구수 변화 예측에 따르면 2030~2035년을 기점으로 국내 총인구수는 하향 감소추세를 보여주고 있으며, 2012년 현재 총 인구 성비는 100.3으로 남초현상을 보이고 있으나, 출생성비 안정, 고령화의 진전 등으로 2015년부터는 성비가 99.95로 여자가 남자보다 많아질 전망임. 또한, 유소년 인구(0~14세)의 감소세와 노령인구(65세이상)의 증가추세에 따라 생산가능인구(15~64세)는 2016년을 정점으로 감소할 전망이며, 최근 우리나라의 경우 저 출산과 평균수명 연장으로 고령사회의 진입속도가 빠르게 진행되고 있음. 그러므로, 노령인구의 증가에 따라 나이가 들어가며 발생하는 노화에 따른 골밀도의 감소 및 폐경기 후 여성에게서 많이 나타나는 폐경후 골다공증의 발생이 앞으로 큰 문제가 될 것이라 예상되며, 골건강을 유지하기 위한 노력이 계속적으로 이루어질 것임.

건강보험심사평가원이 2007년부터 2011년까지 5년간 자료를 이용하여 분석한 결과, 골다공증 진료인원은 약 44.3% 증가하였고, 연평균 증가율이 9.7%로 나타났으며, 진료비는 약 187억원(35%) 증가하였음. 또한, 2008-2009년 국민건강 영양조사에 따르면 50세 이상 성인의 골다공증 유병률은 여성에서 35.5% 남성에서 7.5%로 여성이 남성에 비해 4배 이상 높았으며, 진단율과 치료율은 각각 26.2%, 12.8% 으로 추정됨.

국내 안성 지역 코호트 연구 결과에서는 50세 이상 성인의 요추 골다공증 유병률은 여성 24%, 남성 12.9%였으며 척추 골절의 50세 이상 성인의 유병률은 여성 16.5%, 남성 12.1%로 나타났음. 특히, 사망률이 높은 대퇴골 골절의 전 생애 위험도는 50세 여성 12.3%, 남성 5.2%였으며 대퇴골 골절 발생 후 1년 이내 사망률은 여성 17.3%, 남성 22.6%로 나타났는데, 이러한 결과로 미루어 골다공증은 중년의 건강을 위협하는 흔한 질환일 뿐 아니라 노년의 삶의 질과 수명까지 결정할 수 있는 심각한 질환으로 인식되어짐.

한편, 1990년대 중반부터 시작하여 최근까지 골다공증 관련 논문발표가 빠르게 증가하는 추세이며(2010년 한해 71편의 논문이 발표됨), 국내 논문발표 분야별 순위는 골다공증 질환>골다공증 제어>골다공증 기전 순임. 최근 20년간 총 3011건의 골다공증 관련특허가 출

원, 등록되었으며, 국내 연구동향은 골다공증 질환>기전>제어 순으로 기술연구가 활발하게 진행되고 있음.

□ 경제적・산업적 필요성

최근 **골다공증 치료제는 골흡수 저해제 (bone catabolic drug)와 골형성 촉진제로 분류됨**. 골 흡수 저해제는 파골세포의 형성과 활성을 조절하는 치료제로서 비스포스포네이트, 선택적 에스트로겐 수용체 조절자 (SERMs), 칼시토닌 등이 있으며, 골 형성 촉진제로서는 부갑상선 호르몬제 (PTH), 불소제 등이 있음.

골다공증 치료제 시장에서 가장 큰 시장을 차지하고 있는 비스포스포네이트 치료제는 식전 공복에 복용해야 하고 복용 시 식도염, 식도 천공 등의 부작용이 발생하며 체내 흡수율(경구투여 흡수율, 1~3%)이 낮다는 단점이 있음. 선택적 에스트로겐 수용체 조절자로는 라록시펜, 드롤록시펜, 라소폭시펜 등이 있으나, 이들 치료제는 유방암 및 자궁암 유발 위험성을 증가시키는 부작용이 있음. 또한, 칼시토닌 치료제는 고가이며 투여방법이 어렵고 칼슘 제제는 부작용은 적지만 골다공증 치료보다는 예방에 국한된다는 단점이 있음(표).

표. 현재 사용되는 골다공증 치료제의 문제점

분 류	장 점	단 점
호르몬대체제	뼈소실억제 효과 좋음	장기간 투여 시 유방암 위험도 증가. 주요 선진국에서 골다공증치료제로 사용되지 않음.
칼슘 제제	부작용 적음	치료보다 예방 효과에 국한됨.
칼시토닌 제제	-	고가이며 투여방법이 어려움, 효과가 명확하지 않음.
Vitamin D 제제	-	고가이며 효과가 명확하지 않고, 신기능 장애와 신결석 등의 부작용.
비스포스포네이트 제제	뼈소실억제 효과 좋음	흡수율이 떨어지며 복용이 까다로움, 소화기계 부작용(복용 중단의 약 70%가 부작용 경험 때문).
SERM 계*	-	뼈소실 억제 효과가 약함.
부갑상선 호르몬제제 (PTH)	뼈를 형성시키는 효능 뛰어남	매일 주사해야 하며 매우 고가여서 일반적인 적용이 어려움 2년 이내 투여로 제한/Osteosarcoma block box warning

* SERM(Selective estrogen receptor modulator: 선택적 에스트로젠 수용체 조절제)

이러한 약물의 특징은 파라티로이드호르몬(PTH) 제제를 제외하고는 모두 파골세포 억제를 통한 골분해(흡수) 억제제로서 주로 골다공증의 진행을 저해하여 급속한 골다공증의 진행을 예방하는데 치우치고 있는 실정임. 유일한 골형성 촉진 기능을 갖는 파라티로이드호르몬(PTH) 제제의 경우는 호르몬이라는 한계 때문에 주사투여의 불편함과 함께 장기적인 안

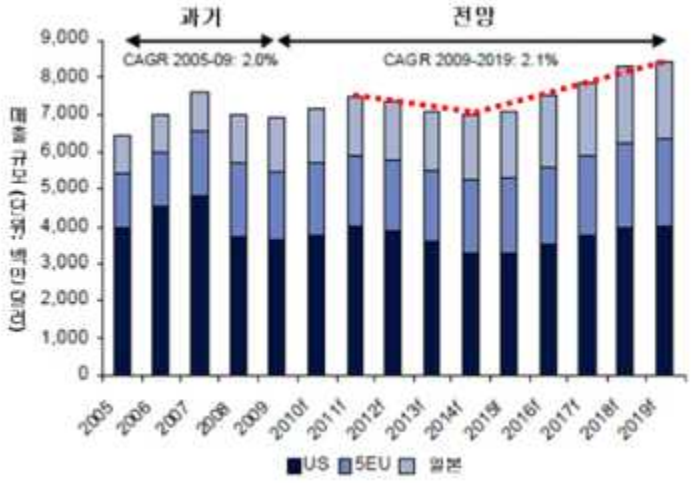
정성의 미비로 인해 2년 투여 후 중단 등 그 시장의 한계를 드러내고 있는 실정임.

이러한 이유로 **현재 사용 중인 치료제의 여러 단점들을 극복하기 위하여, 골형성 촉진작용과 골소실 억제 기능성이 뛰어나며 안전성이 확보되어 부작용이 최소화된 소재의 개발이 필요한 시점임**.

골다공증 시장의 큰 비중을 차지하는 주요 국가인 미국, 5개 유럽국가(프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인, 영국), 일본의 골다공증 보유 인구는 약 1.6억명(여성 1.17억명, 남성 4,500만명)으로 추정되며, 향후 2020년 골다공증 여성 인구는 지금보다 1,700만명 증가하여 1.34억명(16% 증가)이 될 것으로 예상됨(그림, Datamonitor 2010).

골다공증 시장의 규모는 주요 국가(미국, 5EU, 일본)에서 2005~2009년 동안 연평균 성장률 2%로 성장하여, 2009년에는 약 70억 달러를 달성하였으며, 향후에도 점진적으로 성장할 전망임(2009~2019 CAGR 2.1%).

2010~2011년 유망 골다공증 의약품인 단일클론항체 Prolia(denosumab, Amgen/GlaxoSmithKline)의 출시 등의 요인으로 향후 골다공증 시장은 고령인구의 구매력 파워가 있는 미국과 유럽에서 계속 성장할 것으로 예상됨. 2012~2014년 제네릭의 출시로 Bonviva 등 주요 제품의 특허가 만료될 예정이므로 골다공증 시장은 일시적으로 골다공증분야 브랜드 의약품의 규모에서 다소 감소할 것으로 예상됨.



[그림]. 주요 선진국가에서의 골다공증 매출 규모 및 전망

표. 골다공증 치료제 세계 시장 규모

연 도	2008년	2010년	2012년	2014년	2016년	CAGR
골다공증 치료제 세계 시장 규모 (US M$)	7,906	9,294	10,557	10,730	11,081	4.4%

(출처 : Datamonitor, Pipeline Insight: Osteoporosis)

2013년 Transparancy Market Research(http://www.transparencymarketresearch.com) 자료에 의하면 세계 골다공증 의약품 시장은 2010년 73억달러에서 CAGR(연평균 증가율) 9.2%로 2015년에는 114억불에 이를 것이라 추정하였으며, 특히 중국 골다공증 시장은 2015년 25억불의 가치가 있을 것이라고 예측하였음.

또한, 전 세계 골다공증 시장에서 가장 중요한 부분을 차지하고 있는 비스포스포네이트 계열 치료제인 악토넬(Actonel)과 본비바(Bonviva)는 2014년, SERMs 계열의 에비스타(Evista)는 2014~2015년 사이, 그리고 PTH 계열인 포르티오(Forteo)의 경우 2018년에 특허 만료가 예정되어 있어 각 계열의 제너릭 제품 개발 이외에 새로운 소재의 개발에 대한 시장의 요구가 매우 커지고 있는 상황임(표).

표. 주요 골다공증 치료제의 세계 시장 규모 및 예상 특허 만료

Class	Brand	Company	Molecule	2009 Sales ($ 백만)	2019 Sales ($ 백만)	특허 만료		
						미국	일본	유럽
Bisphosphonates	Fosamax	Merck	Alendronate	857	430			
	Actonel	Warner Chilcott /Sanofi-Aventis	Risedronate	1,518	316	2014	2010	2010
	Bonviva	Roche/GSK	Ibandronate	943	282	2014	n/a	2013
	Aclasta	Novartis	Zoledronic acid	564	85	2013	n/a	2012
	Bonoteo	Astellas/Ono pharm	Minodronic acid	13	284			
SERMs	Evista	Eli Lilly	Raloxifene	808	150	2014	2015	2015
	Fablyn	Pfizer	Lasofoxifene	0	31			
	Conbriza	Pfizer	Bazedoxifene	0	304			
PTHs	Forteo	Eli Lilly	Teriparatide	640	416	2018	n/a	2018
	Preotact	Nycomed	1-84 parathyroid hormones	49	32			
Calcitonins	Miacalcin	Novartis	Salmon calcitonin	26	6			
	Fortical	Unigene	Salmon calcitonin	47	3			
Dual acting bone agents	Protelos	Servier	Strontium renalate	159	59	n/a	n/a	2015
Antibody	Prolia	Amgen/GSK	Denosumab					
Vitamin D derivative	Edirol	Chugai/Taisho	Eldecalcitol					

국내의 경우 2012년 약 1,600억원의 시장을 형성하고 있는 것으로 추정되며 이 가운데 포사맥스(MSD)와 본비바(로슈) 외에 악토넬(사노피아벤티스)을 포함한 3개 제품 매출이 830억원으로 전체 시장의 50% 가량을 차지하고 있음. 2012년 국내 골다공증치료제 시장에서 쌍벽을 이루고 있는 포사맥스(MSD)와 본비바(로슈)가 특허만료됨에 따라 국내에서 복제약

의 경쟁이 매우 치열한 상황임.

이와 더불어 한림제약이 최근 출시한 골다공증 치료제 '리세넥스엠정'과 한미약품의 월 1회복용하는 비타민D 함유 골다공증 치료제 '리도넬디정' 등의 개량신약이 출시되었음(표).

또한, 2010 US-FDA 승인을 받은 Amgen의 항체제품인 Prolia(Denosumab)내 출시되었음. Denosumab은 조골세포 표면에 발현된 RANKL에 결합하여 파골세포의 분화를 조절하는 조골세포 유래의 OPG (osteoprotegerin) 단백질과 유사한 역할을 하는 항체의약품임.

표. 2012년 국내 주요 골다공증치료제 매출현황(IMS, 백만원)

제약사	제품명	2012	2011	증감율	비고
로슈	본비바	32,133	28,578	12.4%	월1회 복용
MSD	포사맥스플러스디	22,104	23,957	-7.7%	비타민D 강화
사노피	악토넬	12,816	21,038	-39.1%	오리지널
다케다	에비스타	10,231	6,979	46.6%	오리지널
한림제약	레세넥스플러스	6,116	3,661	67.0%	복합 개량신약
MSD	포사맥스플러스	5,643	7,956	-29.1%	복합제
유유제약	맥스마빌	5,127	4,419	16.0%	활성 비타민D
종근당	포사퀸	2,710	3,108	-12.8%	포사맥스 제네릭
MSD	포사맥스	2,501	3,920	-36.2%	오리지널
동아제약	오스트론	2,015	3,058	-34.1%	악토넬 제네릭
노바티스	아클라스타	1,891	1,558	21.4%	오리지널
제일약품	악토제닉	1,693	2,680	-36.8%	악토넬 제네릭
한인제약	드로넬	1,349	1,707	-21.0%	악토넬 제네릭
태평양제약	리드론플러스	1,133	855	32.6%	복합 개량신약
한미약품	리도넬	729	676	7.8%	악토넬 제네릭
종근당	라록시퀸	694	518	33.9%	에비스타 제네릭
사노피	악토넬EC	670	0		식사후 복용가능
유한양행	알렌맥스	360	336	6.9%	포사맥스 제네릭
한림제약	리세넥스엠	244	0		월1회 복용 개량신약

□ 기술 및 산업 동향

현재까지 개발된 골다공증 치료제들은 부갑상선 호르몬제를 제외하고는 골 형성 작용이 미미하여 치료효과보다는 증상의 진행을 예방하는 효과에 그치고 있음. 부갑상선 호르몬제의 경우는 골 형성을 촉진하여 치료효과를 얻을 수 있지만 장기 사용에 대한 안전성이 확립되지 않아 그 사용이 제한되고 있음. 따라서 골다공증을 근본적으로 치료하기 위해서는 소실된 골량을 회복시키는 것이 반드시 필요하다고 할 수 있음.

골다공증 관련 특허는 90년대부터 꾸준히 양적으로 증가하는 추세인데, 골다공증 기전분야에서는 파골세포 및 조골세포 분화와 활성도에 관여하는 유전자 관련 특허개발이 활발

하게 진행 중이며, 줄기세포를 이용하여 골재생유도 및 나노입자를 이용한 골다공증 약물 최적화에 대한 연구가 진행됨.

골다공증 제어분야는 골대사 관여 호르몬, 사이토카인, 항체, DDS 및 골재생 세포에 의한 파골세포 억제와 조골세포 촉진을 통한 골밀도 증가 기술 개발이 활발하게 진행 중임.

파골세포의 분화 및 배양방법과 관련된 기술은 현재 많은 연구그룹에서 수행되고 확립되어져 있으며, 파골세포의 분화와 관련하여 자세한 신호전달 메카니즘이 확립되어 있음. 특히 TNF receptor family의 일종인 RANK (Receptor-Activator of Nuclear factor Kappa B)가 파골세포 분화 및 활성에 결정적인 역할을 하는 것이 밝혀짐.

RANKL (RANK ligand)은 조혈모세포에서 성숙한 파골세포로의 분화를 유도하며, 성숙한 파골세포의 생존기간을 증가시킴. RANKL 신호전달 경로는 크게 TRAFs (TNF receptor-associated factor protein)의 recruitment, transcription factor의 활성화 (NF-kB, AP-1, NFATc1), MAPK pathway의 활성화 (ERK, JNK, p38), 그리고 Src 및 Akt의 활성화임. 이러한 파골세포에 대한 많은 정보는 파골세포 억제제 개발에 중요한 단서가 되고 있으며 많은 제약회사에서 이들을 이용하여 신약을 개발하고 있음.

골 형성 촉진 작용이 우수한 BMP2 단백질의 신호전달 과정에서 중요한 역할을 하는 Runx2 유전자에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, Runx2는 골 형성 관련 유전자들, 예를 들어 조골세포의 분화 초기의 표현형질인 알칼라인포스파테이즈 (ALP), 분화 후기 표현형질인 오스테오칼신 (osteocalcin)을 비롯한 오스테오폰틴, 타입 1 콜라겐 및 본 사이알로프로테인 (bone sialoprotein)의 발현을 유도하는 전사인자로서 골 형성에 필수 인자임이 밝혀졌음 (Ducy, P. et al., Cell 89:747-754, 1997; Mundlos, S. et al., Cell 89:773-779, 1997; Otto, F. et al., Cell 89:765-771, 1997). 골 형성단백질 (BMP2)에 의한 Runx2의 활성화 신호전달은 MAPK 신호전달 과정과 Smad 신호전달 과정을 거쳐 조절되는 것으로 보고되었음 (Avantaggiati, M.L. et al., Cell, 89: 1175-1184, 1997; Hanai, J. et al., JBC. 274: 31577-31582, 1999; Jin, Y.H. et al., JBC. 279: 29409-29417, 2004).

또한, 골형성 관련 Wnt-β-catenin pathway(LRP-5)를 통해 Runx2, Ror-2/Osterix/NFAT 등의 조골세포 분화 관련 유전자의 발현을 조절함으로써 골다공증을 근본적으로 개선하려는 연구가 진행 중에 있음(Bennett CN et al., Pnas 102: 3324-3329). 골형성 관련 Wnt-β-catenin pathway(LRP-5)에 대한 작용물질(agonist)에 관한 연구가 진행되고 있으나 아직 학문적인 수준으로 저분자 화합물은 보고된 바가 거의 없으며, Wnt신호를 억제하는 GSK-3β의 활성을 저해하는 LiCl나 저분자 화합물인 Chir99021 혹은 LY603281-31-8은 조골세포 분화를 촉진한다고 보고되고 있으나 아직 학문적인 수준이므로, 골밀도 신호전달을 기초로 하여 조골세포 분화를 촉진할 수 있는 건강기능성소재의 개발이 요구됨.

1-3. 연구개발 범위

연차	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	• 조골세포 분화 촉진 소재의 용매별 추출물 활성 측정	• 은시호, 용안육 용매별 추출 분획의 조골세포 분화 촉진 활성 검증
	• 조골세포 분화 촉진 추출물 발굴 및 검증	• 신규소재 라이브러리 구축 및 스크리닝 • 조골세포 분화 촉진 검증(ALP, 유전자 발현, 칼슘 축적 효과 확인)
	• 파골세포 분화 억제 물질 발굴을 위한 세포 기반 스크리닝 시스템 구축	• 세포기반 파골세포 분화 억제 스크리닝 시스템 구축(RANKL-induced NF-κB 신호전달억제)
	• 골형성 촉진 기능을 갖는 최적 신규 소재 (복합)추출물 선정 (우선순위 선정/시너지 확인)	• 신규 골다공증 개선 소재 선정 • 활성, 시너지 및 안전성 면에서 우수한 골형성 촉진 기능성 소재 우선 순위 선정
	• 활성 생약소재의 원료 표준화연구	• 선정된 활성 생약 소재의 표준화 연구 • 선정 생약원료 표준추출액 및 분획물제조 • 선정 생약소재의 원료성분 규격설정
	• 활성 생약 소재의 기능성분/지표성분 탐색	• 문헌 조사를 통한 원료 특이적 성분 조사 • 지표성분 시험 분석법 및 수급 방안 연구 • 선정 생약소재의 지표(기능)성분 활성평가 • 복합 생약 소재의 최적 추출 조건 확립
	• 예비 동물효력시험용 복합생약 원료 제조 및 제형 연구	• 동물 시험용 복합추출물 분말 원료 제조 • 시험 원료 투여 용량 및 용매 조성 결정
	• 골다공증 개선 예비 동물시험 개시	• 난소절제 랫드 모델을 이용한 골다공증 예방 및 개선효과 비교・평가
2차 년도	• 조골세포 분화 촉진 추출물 기전 연구	• 발굴된 추출물에 의한 Wnt/β-catenin 신호전달 체계 활성화
	• 파골세포 분화 억제 추출물 발굴 및 검증	• 신규 소재 추출물 라이브러리 스크리닝 • 발굴된 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 검증(TRAP, Bone resorption, 유전자발현)
	• 시험 원료의 표준화 및 추출 공정 최적화 연구	• 지표(기능)성분 선정 • 추출 제조 공정 표준화 및 대량생산 공정 연구(물리적, 화학적 조건 변화에 따른 수율 평가, 제조 공정 최적화 연구)
	• 골대사 조절 기능을 갖는 최적 신규 소재 (복합)추출물 선정	• 신규 골다공증 개선 복합 생약 소재 선정 • 골대사 조절 기능을 갖는 복합 생약 소재의 최적 배합 비 설정(Synergy effect)
	• 골다공증 개선 예비 동물시험완료	• (예비)동물 시험 결과 보고서
	• 골다공증 개선 동물시험	• 난소절제 랫드 모델을 이용한 골다공증 효력시험(골밀도, 혈중 칼슘농도 및 염증관

		련 바이오마커 측정 등)
3차 년도	• 파골세포 분화 억제 추출물 용매별 분획 활성 측정 및 검증	• 신규 소재 추출물 용매분획별 활성 평가
	• 파골세포 분화 억제 추출물 기전 연구	• 발굴된 추출물에 의한 Wnt5a 신호전달 조절 측정 • 발굴된 추출물에 의한 파골세포 분화 관련 신호전달 체계 (NF-κB, Src/PI-3K, MAPK 등) 분석
	• 시험 원료의 추출 공정 scale-up 연구	• 활성분획의 제조표준화연구(기준설정/규격화) • 제조공정 scale-up 조건 확립 • 천연 생약 소재의 원재료 수급 방안 확립
	• 지표성분의 시험분석법 밸리데이션	• 특이성/정확성/직선성/정밀성 데이터 확보 • 범위 설정 : 정밀성, 정확성 및 직선성을 포함할 수 있는 범위(상한, 하한값)로 설정 • 시험분석법 밸리데이션 보고서 작성
	• 제형 연구 및 임상시제품 제작	• 첨가제/부형제 선정 • 경구투여용 캡슐 또는 정제(태블렛) 제조 • 임상 시제품의 지표(기능)성분 분석 시험 • 기능성 원료의 안정성 시험
	• 골 건강 개선 인체 효력 평가개시	• 개별인정 가이드라인에 의거한 인체 효력시험 프로토콜 작성 • 혈중 골대사 관련 바이오마커 설정 • 시험물질의 안전성 평가 • 시험기관 IRB 승인 신청 • 피험자 모집 및 임상시험 개시
	• 식약처 개별인정 신청 서류 준비	• 관련 문헌 및 자료 조사 • 식약처 모둠토의 • 공인기관 시험성적서 확보 • 개별인정 신청서류 작성
	• 기능성 원료 및 제품의 마케팅 전략 수립	• 목표 제품의 시장성 평가 • 기능성 원료의 수급 방안 수립 • 기능성 원료 및 제품의 경제성 분석 • 기존제품과의 차별화 및 마케팅 전략수립 • 제품 판로 확보 계획

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04

2-1. 국내 제품생산 및 시장현황

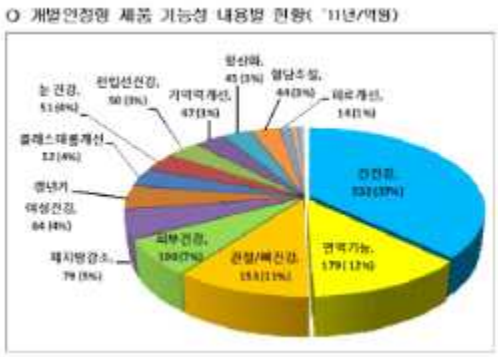
□ 국내 골다공증 시장의 경우 2012년 약 1,600억원의 시장을 형성하고 있는 것으로 추정되며 이 가운데 포사맥스(MSD)와 본비바(로슈) 외에 악토넬(사노피아벤티스)을 포함한 3개 제품 매출이 830억원으로 전체 시장의 50% 가량을 차지하고 있음. 2012년 국내 골다공증치료제 시장에서 쌍벽을 이루고 있는 포사맥스(MSD)와 본비바(로슈)가 특허만료됨에 따라 국내에서 복제약의 경쟁이 매우 치열한 상황임.

□ 한림제약이 최근 출시한 골다공증 치료제 '리세넥스엠정'과 한미약품의 월 1회복용하는 비타민D 함유 골다공증 치료제 '리도넬디정' 등의 개량신약이 출시되었음 (표).

표. 2012년 국내 주요 골다공증치료제 매출현황(IMS, 백만원)

제약사	제품명	2012	2011	증감율	비고
로슈	본비바	32,133	28,578	12.4%	월1회 복용
MSD	포사맥스플러스디	22,104	23,957	-7.7%	비타민D 강화
사노피	악토넬	12,816	21,038	-39.1%	오리지널
다케다	에비스타	10,231	6,979	46.6%	오리지널
한림제약	레세넥스플러스	6,116	3,661	67.0%	복합 개량신약
MSD	포사맥스플러스	5,643	7,956	-29.1%	복합제
유유제약	맥스마빌	5,127	4,419	16.0%	활성 비타민D
종근당	포사퀸	2,710	3,108	-12.8%	포사맥스 제네릭
MSD	포사맥스	2,501	3,920	-36.2%	오리지널
동아제약	오스트론	2,015	3,058	-34.1%	악토넬 제네릭
노바티스	아클라스타	1,891	1,558	21.4%	오리지널
제일약품	악토제닉	1,693	2,680	-36.8%	악토넬 제네릭
한인제약	드로넬	1,349	1,707	-21.0%	악토넬 제네릭
태평양제약	리드론플러스	1,133	855	32.6%	복합 개량신약
한미약품	리도넬	729	676	7.8%	악토넬 제네릭
종근당	라록시퀸	694	518	33.9%	에비스타 제네릭
사노피	악토넬EC	670	0		식사후 복용가능
유한양행	알렌맥스	360	336	6.9%	포사맥스 제네릭
한림제약	리세넥스엠	244	0		월1회 복용 개량신약

□ 국내 건강기능식품 품목별 생산실적 분석 결과 새로운 기능성 원료를 사용한 ‘개별인정형’ 건강기능식품도 꾸준한 성장세를 나타내고 있으며, 그 중 관절·뼈건강 제품은 약 153억원(2011년) 정도의 시장을 유지하고 있음.



□ 대웅제약은 소나무에서 추출한 천연성분 MSM(Methyl Sulfonyl Methane; 식이유황)에 칼슘과 비타민D를 주원료로 함유한 ‘무브’를 판매 중이며, 오스코텍에서는 전칠삼, 숙지황 및 가시오가피 추출물이 함유된 ‘관절 건강 337’을, ㈜씨스팜에서는 초록잎홍합추출오일을 주성분으로 함유한 ‘관절팔팔’ 제품을 판매 중임.

□ 건강보험심사평가원이 2007년부터 2011년까지 5년간 자료를 이용하여 분석한 결과, 골다공증 진료인원은 약 44.3% 증가하였고, 연평균 증가율이 9.7%로 나타났으며, 진료비는 약 187억원(35%) 증가하였음.

□ 국내 통계청에서 발표한 2010년 연령대비 인구수 변화 예측에 따르면 2030~2035년을 기점으로 국내 총인구수는 하향 감소추세를 보여주고 있으며, 유소년 인구(0~14세)의 감소세와 노령인구(65세이상)의 증가추세에 따라 저출산과 평균수명 연장으로 고령사회의 진입속도가 빠르게 진행되고 있음.

□ 노령인구의 증가에 따라 나이가 들어가며 발생하는 노화에 따른 골밀도의 감소 및 폐경기 후 여성에게서 많이 나타나는 폐경후 골다공증의 발생이 앞으로 큰 문제가 될 것이라 예상되며, 골건강을 유지하기 위한 노력이 계속적으로 이루어질 것임.

2-2. 국외 제품생산 및 시장현황

□ 골다공증 치료제는 골흡수 저해제 (bone catabolic drug)와 골형성 촉진제로 분류됨. 골 흡수 저해제는 파골세포의 형성과 활성을 조절하는 치료제로서 비스포스포네이트, 선택적 에스트로겐 수용체 조절자(SERMs), 칼시토닌 등이 있으며, 골 형성 촉진제로서는 부갑상선 호르몬제 (PTH), 불소제 등이 있음.

□ 골다공증 치료제 시장에서 가장 큰 시장을 차지하고 있는 비스포스포네이트 치료제는 식전 공복에 복용해야 하고 복용 시 식도염, 식도 천공 등의 부작용이 발생하며 체내 흡수율이 낮다는 단점이 있음.

□ 선택적 에스트로겐 수용체 조절자로는 라록시펜, 드롤록시펜, 라소폭시펜 등이 있으나, 이들 치료제는 유방암 및 자궁암 유발 위험성을 증가시키는 부작용이 있음.

□ 칼시토닌 치료제는 고가이며 투여방법이 어렵고 칼슘 제제는 부작용은 적지만 골다공증 치료보다는 예방에 국한된다는 단점이 있음(표).

□ 파라티로이드호르몬(PTH) 제제를 제외하고는 모두 파골세포 억제를 통한 골분해(흡수) 억제제로서 주로 골다공증의 진행을 저해하여 급속한 골다공증의 진행을 예방하는데 치우치고 있는 실정임.

□ 유일한 골형성 촉진 기능을 갖는 파라티로이드호르몬(PTH) 제제의 경우는 호르몬이라는 한계 때문에 주사투여의 불편함과 함께 장기적인 안정성의 미비로 인해 2년 투여 후 중단 등 그 시장의 한계를 드러내고 있는 실정임.

표. 현재 사용되는 골다공증 치료제의 문제점

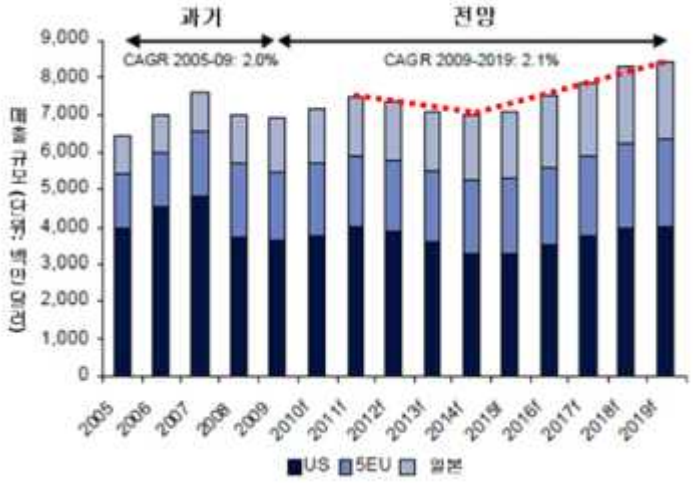
분 류	장 점	단 점
호르몬대체제	뼈소실억제 효과 좋음	장기간 투여 시 유방암 위험도 증가. 주요 선진국에서 골다공증치료제로 사용되지 않음.
칼슘 제제	부작용 적음	치료보다 예방 효과에 국한됨.
칼시토닌 제제	-	고가이며 투여방법이 어려움, 효과가 명확하지 않음.
Vitamin D 제제	-	고가이며 효과가 명확하지 않고, 신기능 장애와 신결석 등의 부작용.
비스포스포네이트 제제	뼈소실억제 효과 좋음	흡수율이 떨어지며 복용이 까다로움, 소화기계 부작용(복용 중단의 약 70%가 부작용 경험 때문).
SERM 계*	-	뼈소실 억제 효과가 약함.

부갑상선 호르몬 제제 (PTH)	뼈를 형성시키는 효능 뛰어남	매일 주사해야 하며 매우 고가여서 일반적인 적용이 어려움. 2년 이내 투여로 제한 /Osteosarcoma block box warning

* SERM(Selective estrogen receptor modulator: 선택적 에스트로젠 수용체 조절제)

□ 골다공증 시장의 큰 비중을 차지하는 주요 국가인 미국, 5개 유럽국가(프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인, 영국), 일본의 골다공증 보유 인구는 약 1.6억명(여성 1.17억명, 남성 4,500만명)으로 추정되며, 향후 2020년 골다공증 여성 인구는 지금보다 1,700만명 증가하여 1.34억명(16% 증가)이 될 것으로 예상됨(그림, Datamonitor 2010).

□ 골다공증 시장의 규모는 주요 국가(미국, 5EU, 일본)에서 2005~2009년 동안 연평균 성장률 2%로 성장하여, 2009년에는 약 70억 달러를 달성하였으며, 향후에도 점진적으로 성장할 전망임(2009~2019 CAGR 2.1%).



[그림]. 주요 선진국가에서의 골다공증 매출 규모 및 전망

표. 골다공증 치료제 세계 시장 규모

연 도	2008년	2010년	2012년	2014년	2016년	CAGR
골다공증 치료제 세계 시장 규모 (US M$)	7,906	9,294	10,557	10,730	11,081	4.4%

(출처 : Datamonitor, Pipeline Insight: Osteoporosis)

□ 2010~2011년 유망 골다공증 의약품인 단일클론항체 Prolia(denosumab, Amgen/ GlaxoSmithKline)의 출시 등의 요인으로 향후 골다공증 시장은 고령인구의 구매력 파워가 있는 미국과 유럽에서 계속 성장할 것으로 예상됨. 2012~2014년 제네릭의 출시로 Bonviva 등 주요 제품의 특허가 만료될 예정이므로 골다공증 시장은 일시적으로 골다공증분야 브랜드 의약품의 규모에서 다소 감소할 것으로 예상됨.

□ 2013년 Transparancy Market Research(http://www.transparencymarketresearch.com) 자료에 의하면 세계 골다공증 의약품 시장은 2010년 73억달러에서 CAGR(연평균 증가율) 9.2%로 2015년에는 114억불에 이를 것이라 예측하였으며, 특히 중국 골다공증 시장은 2015년 25억불의 가치가 있을 것이라고 판단하였음.

□ 전 세계 골다공증 시장에서 가장 중요한 부분을 차지하고 있는 비스포스포네이트 계열 치료제인 악토넬(Actonel)과 본비바(Bonviva)는 2014년, SERMs 계열의 에비스타(Evista)는 2014~2015년 사이, 그리고 PTH 계열인 포르티오(Forteo)의 경우 2018년에 특허 만료가 예정되어 있어 각 계열의 제너릭 제품 개발 이외에 새로운 소재의 개발에 대한 시장의 요구가 매우 커지고 있는 상황임.

3. 연구수행 내용 및 결과

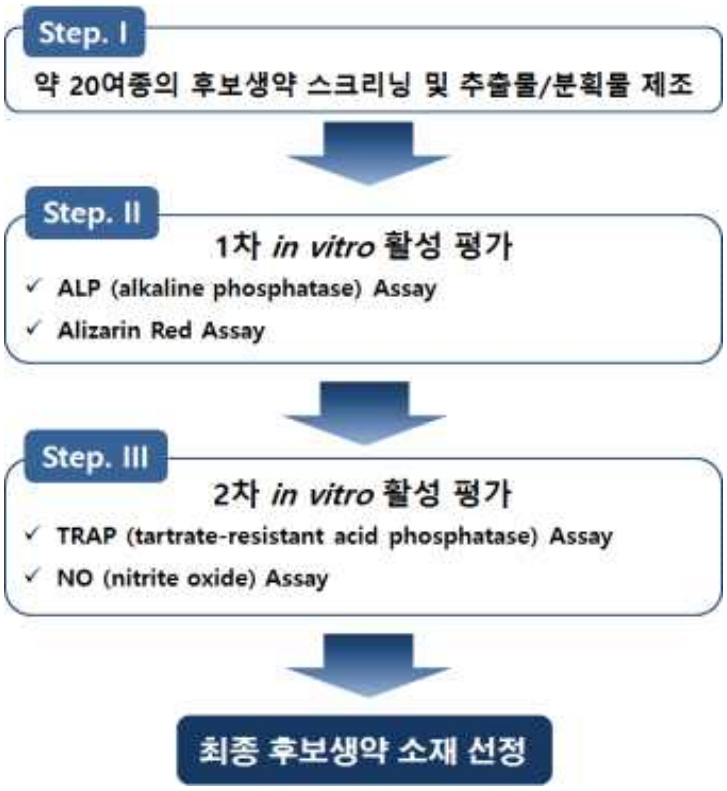
코드번호	D-05

3.1. 후보 소재 선정 및 최종 후보군(원료 및 완제) 도출

가. 후보생약 선정

골건강에 관한 선행연구를 통해 기능성소재 후보로 용안육 및 은시호를 확보하였으며, 상업적인 구입과 식품으로 사용이 가능한 27가지에 후보생약을 선정하여 MC3T3-E1 세포주를 이용한 조골세포 분화능(alkaline phosphatase, ALP) 평가와 칼슘 침착도 평가(Alizarin Red Assay)를 1차 in vitro 활성평가로 하여 **용안육, 상지, 양강 3종의 후보 생약을 도출하였음**

3종의 후보생약을 대상으로 2차 in vitro 활성평가인 TRAP(tartrate-resistant acid phosphate)를 이용한 파골세포분화 억제능 및 항염증 활성평가를 통해 **최종 후보 생약으로 용안육과 상지를 선정하였음**



[그림] 후보생약 소재 선정

No.	생약명	기능성 소재 범위
1	동아(동과자)	항염 소재
2	민들레	
3	백리향	
4	별꽃	
5	삽주	
6	쇠비름	
7	왕누름나무	
8	천문동	
9	하고초	
10	비파엽	
11	은시호	
12	상백피	식품 생약 소재
13	꾸지뽕	
14	구기자	
15	오약	
16	더덕(양유근)	
17	상지	
18	모근	
19	양강	
20	잔대	
21	육두구	
22	길경	
23	용안육	
24	대황(종대황)	Wnt-signaling activator
25	감송향	
26	곽향	
27	두충	

[표] 후보생약 소재

(1) 1차 in vitro 활성 평가

(가) 활성평가 샘플 제조

후보생약 27종에 대하여 기본적으로 물을 이용해 추출하였고, 더덕, 상지, 모근, 양강은 메탄올을 이용해 추출하여 ALP(alkaline phosphatase) 활성 평가에 사용하였음

각 추출물은 생약 중량 대비 10배수에 추출용매(물 또는 메탄올)를 넣고 물일 때, 100℃에서 6시간, 메탄올일 때, 65℃에서 4시간 동안 1회 환류 추출하였음. 추출 후 상온에서 방냉 한

뒤 여과하여 여액을 감압농축 및 건조하였음. 각 추출물 분말은 50% DMSO(열수 추출물) 또는 100% DMSO(메탄올 추출물)에 녹여 실험에 사용하였음

(나) ALP(alkaline phosphatase) assay

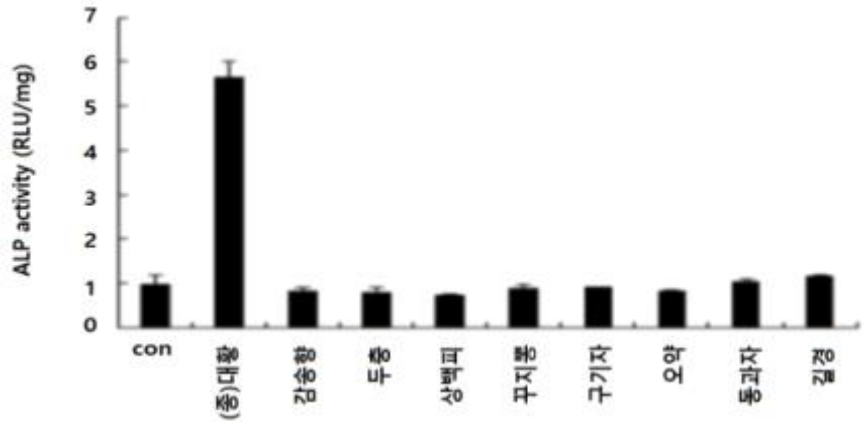
마우스 두개골(calvaria)로부터 유래한 osteoblast precursor cell인 MC3T3-E1 세포를 각각 96well plate에 2 × 10^4cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음, 샘플을 처리하고 다시 72시간 동안 배양한 뒤 배지를 제거하여 PBS로 한 번 씻어준 후, 패시브 라이시스 버퍼(Passive lysis buffer, Promega)로 30분간 세포를 용해시켰음. 상층액의 ALP 활성을 Phospha-Light™ SEAP Reporter Gene Assay System(Applied Biosystem)을 사용하여 분석하고 발광을 VICTOR™X3(PerkinElmer)로 측정하였음. 이때 세포 수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 남은 상층액으로 단백질 정량을 실시하였고, 단백질 농도로 보정함으로써 ALP 활성도를 계산하였음

○ 민들레, 백리향, 별꽃, 삽주, 쇠비름, 왕누릅나무, 천문동, 비파엽, 육두구, 잔대에 ALP assay

각 추출물에 최종 농도를 100 ㎍/㎖로 하여 MC3T3-E1 세포에 6일간 처리한 후 ALP 활성을 측정한 결과 **모든 샘플에서 ALP 활성은 관찰되지 않았음**

○ 대황(종대황), 감송향, 두충, 상백피, 꾸지뽕, 구기자, 오약, 동아(동과자), 길경에 ALP assay

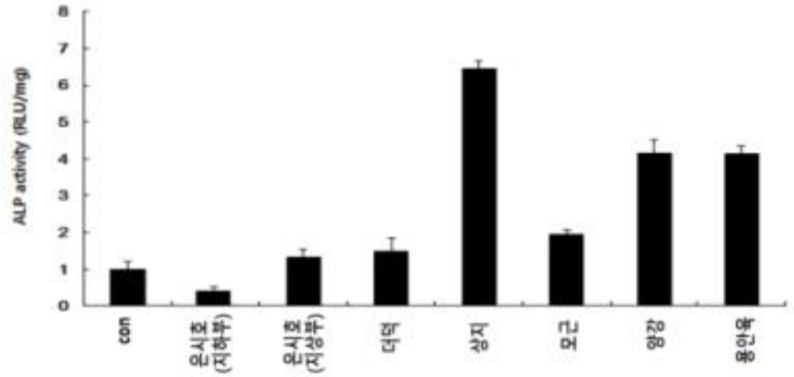
각 추출물에 최종 농도를 100 ㎍/㎖로 하여 MC-3T3-E1 세포에 6일간 처리한 후 ALP 활성을 측정한 결과 **대황(종대황) 추출물에서 5.5배 이상의 매우 높은 ALP 활성이 관찰되었음.** 대황(종대황)은 식품소재로 사용할 수 없기에, 골다공증 개선용 의약품 개발 후보생약으로 높은 가능성을 확인하였음



[그림] 대황(종대황) 외 8종 후보 소재 ALP 활성 평가

○ 은시호(지하부), 은시호(지상부), 더덕, 상지, 모근, 양강에 ALP assay

각 추출물에 최종 농도를 100 ㎍/㎖(상지 50 ㎍/㎖, 양강 25 ㎍/㎖)로 하여 MC-3T3-E1 세포에 6일간 처리한 후 ALP 활성을 측정한 결과 **상지, 양강, 용안육에서 4~6배 이상 높은 ALP 활성이 관찰되었음**



[그림] 은시호(지하부) 외 5종 후보 소재 ALP 활성 평가

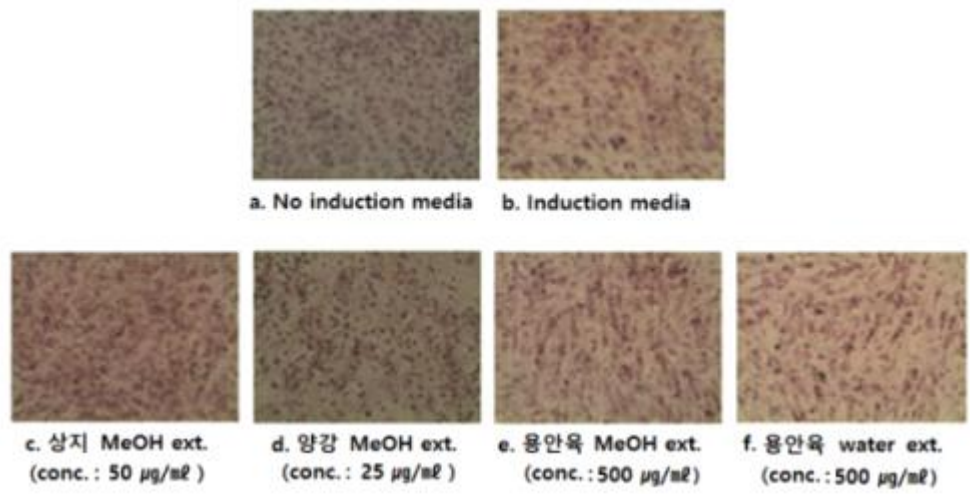
총 27종에 대한 1차 in vitro 스크리닝(ALP assay) 평가결과 상지, 양강, 용안육을 후보 생약소재로 선정하였음

(다) Alizarin Red assay

조골세포에서의 칼슘 무기물 침착을 분석하기 위해, Alizarin Red S assay를 수행하였음. MC3T3-E1 세포에 각 추출물을 처리한 다음, 세포를 20일간 배양한 후 위상차 현미경으로 석회화 결절의 형성을 관찰하고, 세포를 3.7 % 포름알데히드 용액으로 고정한 다음, 고정된 세포를 2 % Alizarin Red S 용액(10 % ammonium hydroxide로 pH 4.2)으로 20분간 염색하고 3차 증류수로 세척한 후, 육안으로 붉은 색의 석회화 결절 형성여부를 대조군과 비교하여 관찰하였음

○ 상지, 양강, 용안육에 Alizarin Red assay

ALP assay 활성평가를 통해 높은 조골세포 활성을 보이는 3종에 후보생약에 대하여 조골세포에 칼슘 무기물 침착(석회화 결절)을 분석한 결과 음성대조군(a)에서는 석회화 결절을 거의 관찰 할 수 없었으며, 각 추출물에 독성이 나타나지 않는 농도로 처리하였을 때, 상지(c), 용안육(e, f)에서 대조군(a)에 비해 결절화 정도가 크게 증가를 확인함



[그림] 상지 외 2종 후보 소재 칼슘 무기물 침착 평가

조골세포에서 칼슘 무기물 침착을 증가시켜 골분화를 증가시키는 후보 생약로써 용안육과 상지를 높이 평가하였음

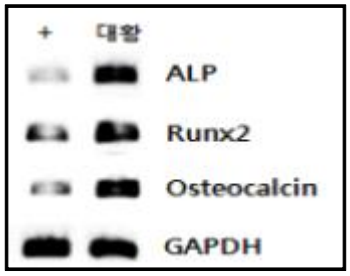
(라) 조골세포 분화 작용기전 연구

□ 1차년도 연구: 천연소재 추출물이 조골세포 분화 표지 유전자의 발현에 미치는 영향 관찰

○ 조골 세포 분화는 여러 조절 유전자의 발현에 의해 조절됨. ALP 활성이 증가되는 것으로 확인된 기능성 소재인 대황(종대황), 용안육, 상지, 양강 추출물을 MC3T3-E1 세포주에 6일간 처리한 다음 alkalin phosphtase (ALP), Runt-related transcription factor2 (Runx2), Osteocalcin 발현양의 변화를 RT-PCR을 통해 확인함

① 종대황의 조골세포 분화 표지 유전자 발현 조절 관찰

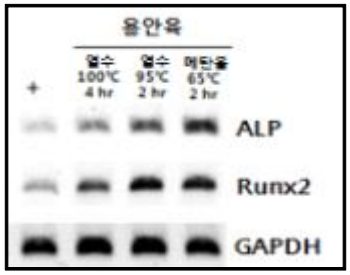
○ ALP 활성을 보인 대황(종대황)이 조골세포 분화 표지 유전자의 발현에도 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 통해 mRNA의 수준을 관찰함. [그림]에서 보이는 바와 같이 분화 유도 물질만 처리한 것(+)에 비하여 대황(종대황)을 50 ㎍/㎖ 농도로 처리하였을 경우 ALP, Runx2, Osteocalcin의 발현이 증가하는 것을 확인함. 반면 internal control로 사용한 GAPDH는 변화가 없었음



[그림] MC3T3-E1 세포주에서 대황(종대황) 추출물에 의한 조골세포 분화 표지 유전자 발현 조절(RT-PCR)

② 용안육 열수, 메탄올 추출물의 조골세포 분화 표지 유전자 발현 조절 관찰

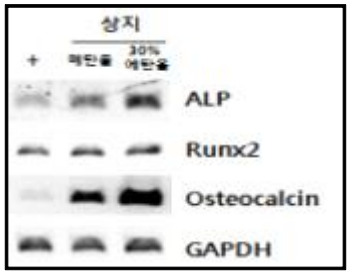
○ 용안육의 각 조건에서의 열수, 메탄올 추출물을 500 ㎍/㎖ 농도로 처리함. 용안육 추출물의 경우 ALP와 Runx2의 발현을 증가시키는 것을 확인하였음



[그림] MC3T3-E1 세포주에서 용안육 열수/메탄올 추출물에 의한 조골세포 분화 표지 유전자 발현 조절(RT-PCR)

③ 상지 메탄올, 30 % 에탄올 추출물의 조골세포 분화 표지 유전자 발현 조절 관찰

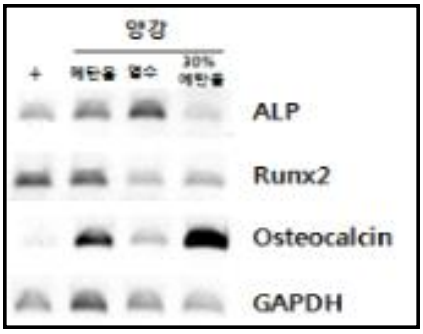
○ 상지 메탄올, 30 % 에탄올 추출물이 조골세포 분화 표지 유전자 발현에 미치는 영향은 다음 그림에서 확인할 수 있음. 분화 유도 물질만 처리한 것(+)에 비하여 상지 메탄올 추출물을 50 ug/ml 농도로, 30 % 에탄올 추출물을 200 ug/ml 농도로 처리하였을 경우 ALP, Runx2, Osteocalcin의 발현이 증가하는 것을 확인하였음



[그림] MC3T3-E1 세포주에서 상지 30 % 에탄올/메탄올 추출물에 의한 조골세포 분화 표지 유전자 발현 조절(RT-PCR)

④ 양강 메탄올, 열수, 30 % 에탄올 추출물의 조골세포 분화 표지유전자 발현조절 관찰

○ 양강의 메탄올, 열수, 30 % 에탄올 추출물을 각각 처리한 후 조골세포 분화 표지 유전자 발현의 변화를 관찰하였음. 양강 메탄올 추출물을 25 ㎍/㎖ 농도로, 열수 추출물과 30 % 에탄올 추출물을 각각 50 ㎍/㎖ 농도로 처리하였을 경우 ALP, Osteocalcin의 발현이 증가하는 것을 확인하였음



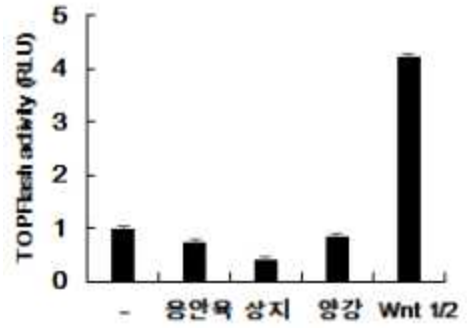
[그림] MC3T3-E1 세포주에서 양강 열수/30 % 에탄올/메탄올 추출물에 의한 조골세포 분화 표지 유전자 발현 조절(RT-PCR)

□ 2차년도 연구: 조골세포 분화 유도 기전 확인

○ 1차년도 연구를 통하여 용안육 열수추출물, 상지, 양강의 30% 에탄올 추출물 각각 500 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 농도에서 조골세포 분화 활성을 가지는 것을 ALP 활성 및 조골세포 분화 관련 유전자 발현을 통해 확인하였음. 2차년도 연구에서는 발굴될 소재들이 어떠한 기전을 통해 조골세포 분화를 유도하는지 확인하기 위하여 다음의 실험을 수행하였음

① 용안육, 상지, 양강 추출물이 Wnt/β-catenin 신호전달체계에 미치는 영향 관찰

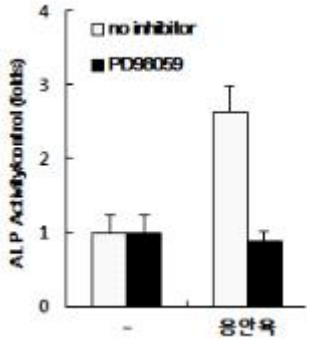
○ Wnt/β-catenin 신호 전달 체계가 활성화되면 조골 세포 분화가 촉진된다는 보고를 바탕으로 선정된 추출물이 Wnt/β-catenin 신호 전달 체계를 활성화 시키는지 확인하기 위하여 세포 기반 스크리닝 시스템을 이용하여 확인하였음. Wnt/β-catenin 신호 전달 체계를 활성화되면 luciferase 발현이 증가하는 HEK293-reporter 세포에 용안육 열수추출물 (500 ㎍/㎖), 상지 30% 에탄올 추출물 (200 ㎍/㎖), 양강 30% 에탄올 추출물 (50 ㎍/㎖)을 처리하고 15 시간 후에 luciferase 활성을 측정하였음. [그림]에서 보는 바와 같이 positive control인 Wnt3a 단백질이 포함된 Wnt3a-CM을 처리하였을 때 luciferase 활성이 증가하는 것을 통해 시스템이 제대로 작동하는 것을 확인하였고, 추출물에 의해 luciferase 활성이 증가하지 않는 것으로 보아 추출물은 Wnt/β-catenin 신호전달체계를 활성화 시키지 않는 것을 확인하였음



[그림] 추출물에 의한 Wnt/β-catenin 신호전달체계를 활성화 효과

② 용안육 추출물이 Erk1/2 신호전달체계에 미치는 영향 관찰

○ Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)가 조골 세포 분화에 관여한다는 것이 보고됨. MAPK에는 Erk1/2, p38, JNK 등이 포함되어지는데 특히 Erk1/2를 활성화하여 조골 세포 분화를 촉진한다는 보고를 바탕으로 추출물들에 Erk1/2 의존 여부를 확인하였음. Erk1/2 신호전달체계를 통하여 조골세포 분화를 유도하는지 확인하기 위하여 MC3T3-E1 세포주를 12 well plate에 배양 후 용안육 열수추출물 500 μg/mL을 Erk1/2 inhibitor인 PD98059 (50 μM) 없이 또는 함께 처리 하고 6일 동안 배양 후 ALP 활성을 측정하였음. [그림]에서 보는 바와 같이 용안육 열수추출물만 처리할 경우 염기성 인산 분해 효소(ALP) 활성이 증가하지만 PD98059를 처리하면 용안육 추출물에 의한 ALP 활성 증가가 억제됨을 확인하였음

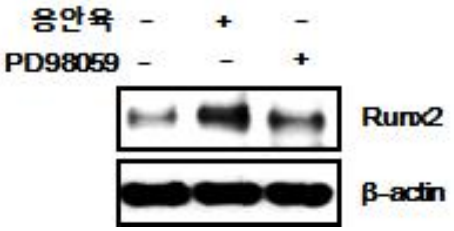


[그림] 용안육 열수추출물에 의한 Erk1/2 신호전달 체계를 통한 ALP 활성 조절

Erk1/2의 저해제인 PD98059 (50 μM) 처리하고, 30분 후에 용안육 열수추출물 500 μg/ml 은 2시간 동안 처리해 아래 [그림]에 표기된 항체를 이용한 단백질의 발현을 측정하였음. Erk1/2의 단백질의 양 변화 없이 용안육 열수추출물에 의해 Erk1/2가 인산화 되었으나 PD98059 처리 시 Erk1/2의 인산화가 저해됨을 확인하였음. 마찬가지로 Smad1/5/9의 인산화도 용안육 열수추출물에 의해 증가하나 Erk1/2를 저해하면 인산화가 일어나지 않는 것을 확인하였음. 이를 통해 용안육 추출물이 Erk1/2를 통해 조절하는 것을 확인하였음

[그림] 용안육 열수추출물에 의한 Erk1/2 및 Smad 1/5/9 인산화 효과

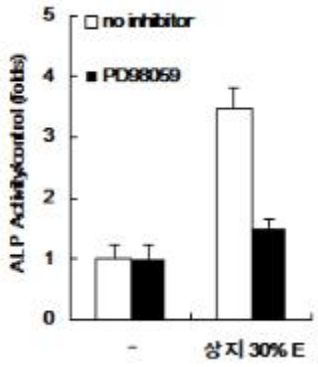
Runt-related transcription factor2 (Runx2)의 발현 변화를 관찰하기 위하여 용안육 열수추출물과 PD98059를 6일간 처리 후 웨스턴 블랏팅을 수행하였음. [그림]에서 보는 것과 같이 용안육 추출물을 처리하면 Runx2의 발현이 증가하나 PD98059 처리 시 Runx2의 발현이 줄어드는 것을 확인함.



[그림] Erk1/2 신호전달 체계를 통한 용안육 추출물의 Runx2 단백질 발현 조절

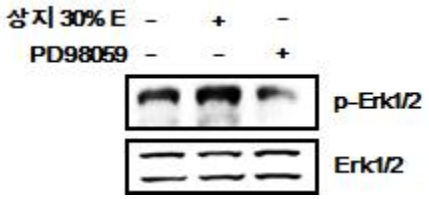
③ 상지 추출물이 Erk1/2 신호전달체계에 미치는 영향 관찰

○ 상지 30% 에탄올 추출물이 Erk1/2 신호전달체계에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 상지 30% 에탄올 추출물 (200 μg/㎖)과 PD38059 (50 μM)을 처리한 후 ALP 활성을 측정하였음. [그림]에서 보는 바와 같이 상지 30% 에탄올 추출물만 처리할 경우 염기성 인산 분해 효소(ALP) 활성이 증가하지만 PD98059를 처리하면 상지 30% 에탄올 추출물에 의한 ALP 활성 증가가 억제됨을 확인하였음



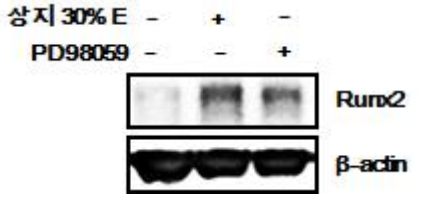
[그림] 상지 30% 에탄올 추출물에 의한 Erk1/2 신호전달 체계를 통한 ALP 활성 조절

상지 30% 에탄올 추출물에 의한 Erk1/2의 인산화 여부를 확인하기 위하여 웨스턴 블라팅을 수행한 결과 아래 [그림]에서 보는 바와 같이 Erk1/2의 단백질의 양 변화 없이 상지 30% 에탄올 추출물에 의해 Erk1/2가 인산화 되었으나 PD98059 처리 시 Erk1/2의 인산화가 저해됨을 확인하였음



[그림] 상지 30% 에탄올 추출물에 의한 Erk1/2 및 Smad 1/5/9 인산화 효과

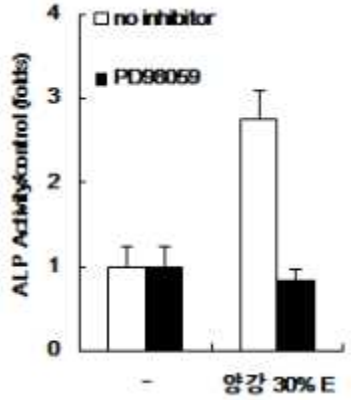
또한, 아래 [그림]에서 보는 것과 같이 상지 30% 에탄올 추출물을 처리하면 Runx2의 발현이 증가하나 PD98059 처리 시 Runx2의 발현이 줄어드는 것을 확인하였음



[그림] Erk1/2 신호전달 체계를 통한 상지 30% 에탄올 추출물의 Runx2 단백질 발현 조절

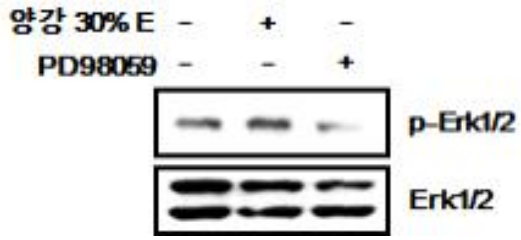
④ 양강 추출물이 Erk1/2 신호전달체계에 미치는 영향 관찰

○ 양강 30% 에탄올 추출물이 Erk1/2 신호전달체계에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 양강 30% 에탄올 추출물 (200 μg/mL)과 PD38059 (50 μM)을 처리한 후 ALP 활성을 측정하였음. [그림]에서 보는 바와 같이 양강 30% 에탄올 추출물만 처리할 경우 염기성 인산 분해 효소(ALP) 활성이 증가하지만 PD98059를 처리하면 상지 30% 에탄올 추출물에 의한 ALP 활성 증가가 억제됨을 확인하였음



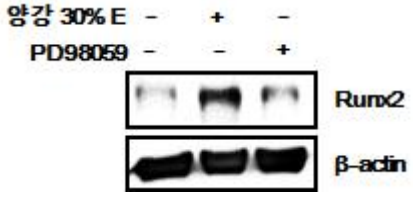
[그림] 양강 30% 에탄올 추출물에 의한 Erk1/2 신호전달 체계를 통한 ALP 활성 조절

아래 [그림]에서 양강 30% 에탄올 추출물에 의한 Erk1/2가 인산화 정도를 관찰하였음



[그림] 양강 30% 에탄올에 의한 Erk1/2 및 Smad 1/5/9 인산화 효과

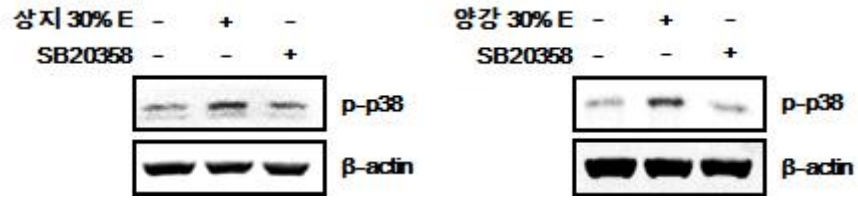
또한, 아래 [그림]에서 양강 30% 에탄올 추출물을 처리하면 Runx2의 발현이 증가하나 PD98059 처리 시 Runx2의 발현이 줄어드는 것을 확인하였음. 이를 통해 양강 30% 에탄올 추출물도 Erk1/2의 인산화를 통한 신호전달체계의 활성화로 조골 세포 분화를 유도함을 확인하였음



[그림] Erk1/2 신호전달 체계를 통한 양강 30% 에탄올 추출물의 Runx2 단백질 발현 조절

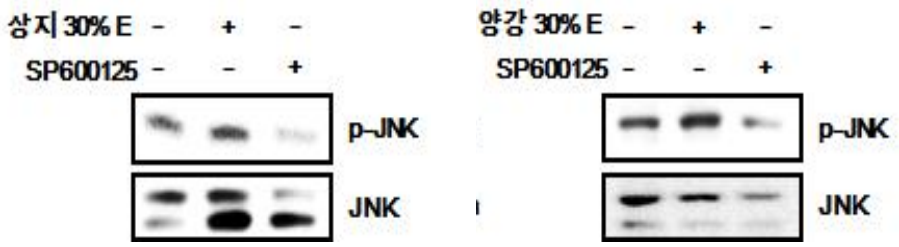
⑤ 상지, 양강 추출물이 p38, JNK 신호전달체계에 미치는 영향 관찰

○ 조골 세포 분화에는 MAPK 중 Erk1/2에 의해서만이 아니라 p38 및 JNK 신호전달체계도 관여함이 보고됨. 상지, 양강 30% 에탄올 추출물이 이러한 신호 전달 체계에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 상지, 양강 에탄올 추출물과 p38 신호전달체계 저해제 (SB20358, 25㎛M), JNK 신호전달체계 저해제 (SP600125, 25㎛M)를 처리 후 각각에 대한 특이적 항체를 사용하여 인산화 여부를 확인하였음. [그림]에서 보는 바와 같이 상지, 양강 에탄올 추출물을 처리하면 p38의 인산화가 증가하였고, 이러한 효과는 p38 저해제인 SB20358에 의해 억제되었음



[그림] SB20358 (p38 inhibitor)의 상지, 양강 에탄올 추출물에 의한 p38 인산화 효과 관찰

JNK 인산화를 측정하는 항체를 사용한 결과 상지, 양강 추출물에 의하여 JNK의 인산화 역시 증가하는 것을 확인하였음



[그림] SP600125 (JNK inhibitor)의 상지, 양강 에탄올 추출물에 의한 JNK 인산화 효과 관찰

(2) 2차 in vitro 활성 평가

1차 in vitro 활성평가를 통해 선정된 후보소재 용안육, 상지, 양강을 대상으로 복합물을 제조하였을 때 나타나는 시너지 효과를 평가하고, 갈근, 국화, 건강, 건율, 구절초 생약소재를 추가하여 2차 in vitro 활성을 평가하였음

(가) 활성평가 샘플 제조

복합물 제조 시 생약 중량대비 10배에 해당하는 물 또는 30% 주정에탄올을 첨가해 4시간 환류 추출하고 감압여과 한 뒤 잔사에 동량에 추출용매를 투입하여 동일한 방법으로 추출하였음. 여액을 모아 감압농축 및 동결건조로 건조분말을 제조하였고, 단일 추출물은 1차 in vitro 활성평가 샘플과 동일한 방법으로 제조하였음

No.	구성생약/ 배합 비	구분
1	용안육 : 양강 (2:1, w/w)	복합 추출물
2	용안육 : 상지 (1:1, w/w)	
3	상지 : 양강 (1:1, w/w)	
4	용안육 : 상지 : 양강 (2:1:1, w/w/w)	
5	상지 열수 추출물	단일 추출물
6	양강 열수 추출물	
7	용안육 열수추출물	
8	갈근 열수 추출물	
9	국화 열수 추출물	
10	건강 열수 추출물	
11	건율 열수 추출물	
12	구절초 열수 추출물	

[표] 샘플 제조 표

(나) TRAP(tartrate-resistant acid phosphate) assay

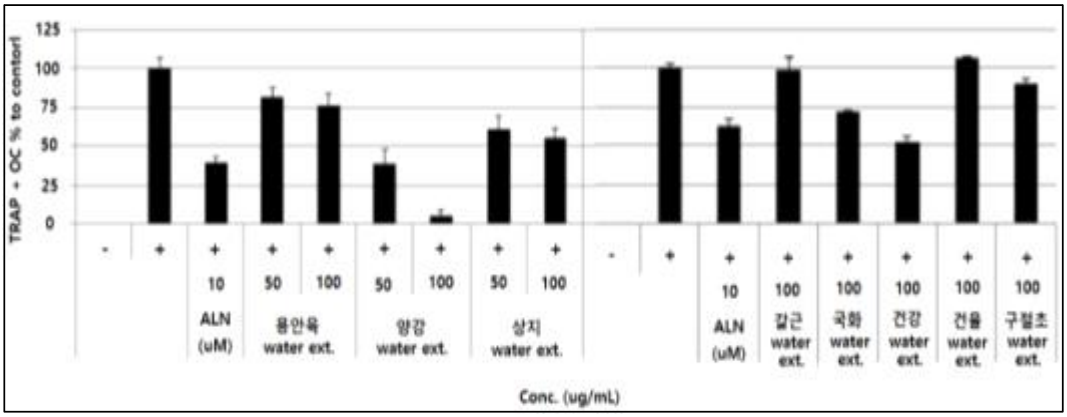
○ 세포 내 TRAP 활성을 이용한 파골세포 분화 스크리닝 시스템 구축

대식 전구세포가 파골세포로 분화될 때, 전구세포에 receptor activator of nuclear factor κB (RANK)가 유도되고, receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL)가 결합되는 RANK-RANKL 상호작용이 필수적임. 이와 더불어 macrophage colony stimulating factor (M-CSF)도 파골세포가 성숙하고 분화하는데 중요한 역할을 담당하며, 이와 같은 세포 특성을 이용해 대식 전구세포로부터 RANKL과 M-CSF를 이용한 시험관 내 파골세포 분화가 가능함. 파골세포로 분화가 진행되면 단핵의 전구세포가 융합되면서 다핵의 성숙한 파골세포를 형성하게 되고 이는 골 표면에서 골을 흡수하는 작용을 가짐. 또한 파골세포는 산생성이 활발한 특징이 있데 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 양성 세포로 분화됨. 따라서 TRAP positive multi nuclear Osteoclast는 분화 표지인자로써 파골세포 분화활성을 측정할 수 있는 마커임

Mouse macrophage cell line RAW264.7을 파골전구 세포로 하여 10% FBS와 1% penicillin- streptomycin이 첨가된 DMEM을 배양액으로 5% CO_2 incubator를 이용하여 37° C에서 계대 배양하며 실험에 사용하고, RAW264.7 세포를 96 well plate에 5 X 10^3 cells/well을 분주한 후 24시간 배양하여 세포가 well에 부착되면 배지를 제거하고 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 분화인자인 RANKL 50 ng/mL과 M-CSF 20 ng/mL를 첨가한 배지에 특정농도에 시료를 혼합한 배양액을 분주하여 3일에 한 번씩 배지를 교환하면서 5일간 배양하였음. 5일 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후 acid phosphate leukocyte kit (Sigma)를 이용하여 염색 시행해 RAW264.7 세포에서 TRAP assay 조건하에서 세포독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 이용하여 cell viability를 함께 평가하였음

○ 상지, 양강, 용안육, 갈근, 국화, 건강, 건율, 구절초에 TRAP assay

상지, 양강, 용안육, 갈근, 국화, 건강, 건율, 구절초 추출물에 최종 분석농도를 100 ㎍/㎖로 하여 TRAP assay를 진행한 결과 양성대조군 Alendronate(ALN) 10 μM과 비교하여 용안육, 양강, 상지 추출물 모두 농도 의존적으로 TRAP 양성세포 분화를 억제하였으며, **양강에 경우 양성대조군 보다 높은 TRAP 양성세포 분화 억제를 보였음. 반면 갈근, 국화, 건강, 건율, 구절초의 경우 양성대조군 대비 흡사하거나 낮은 TRAP 양성세포 분화 억제 나타내었음**



[그림] 용안육 외 7종 후보 생약에 TRAP 활성평가

파골세포의 분화를 억제시켜 골 손실을 예방하는 후보 생약으로 상지, 양강, 용안육을 높이 평가하였음

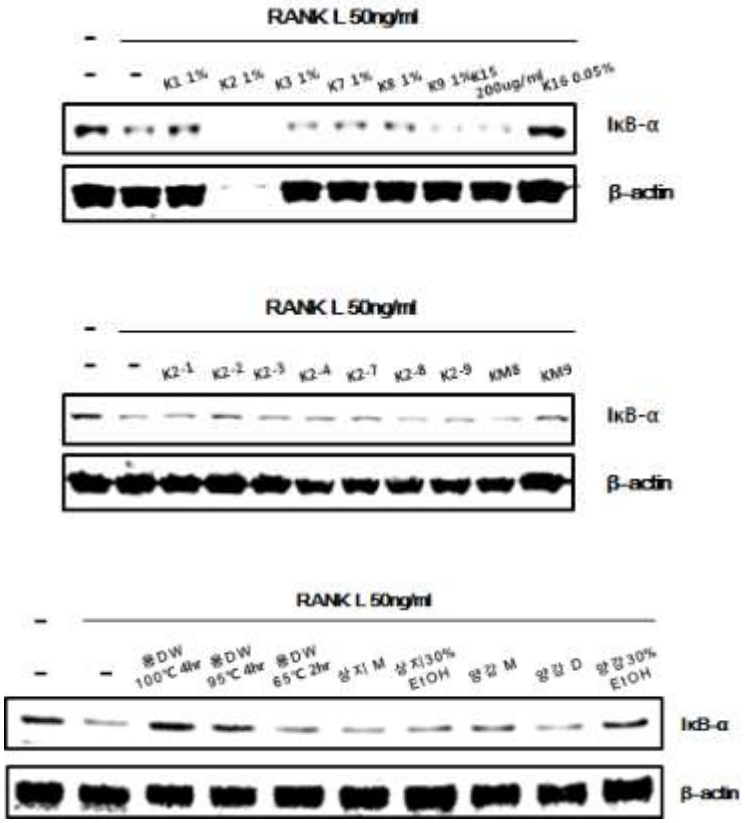
(다) 파골세포 분화억제 작용기전 연구

□ 2차년도 연구

파골세포 분화의 가장 중심이 되는 신호전달 경로는 RANKL과 전구세포의 RANK 간의 상호결합에 의하여 유도됨. 파골세포 분화가 유도되면 칼슘신호전달을 매개로 하는 세포 내 신호전달 물질을 통해 파골세포 형성에 필요한 유전자의 전사가 증가되며, 특히 RANK는 파골세포 분화 초반기에 중요한 전사인자 c-Fos의 유도를 통하여 파골세포 분화의 결정적인 조절인자인 NFATc1 (nuclear factor of activated T cell, cytoplasmic 1)의 초기발현을 조절함. RANKL에 의해 활성화된 NF-κB는 NFATc1의 초기발현을 주도하며, 이후 NFATc1은 다른 전사인자와 함께 TRAP 등 파골세포 특이적인 유전자의 발현을 조절함

① 파골세포 분화 억제 추출물 스크리닝

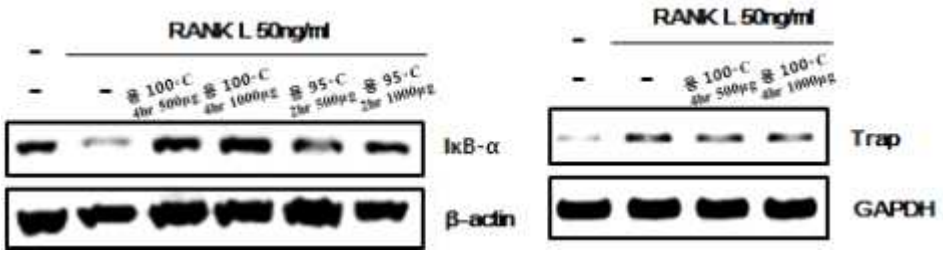
○ RANKL은 NF-κB를 억제하는 IκB의 분해를 IKK에 의한 인산화를 통해 유도함으로써 NF-κB 신호전달체계를 활성화하여 파골 세포로의 분화가 되어 진다고 보고됨. 따라서 IκB의 단백질 수준이 NF-κB의 신호 전달체계를 활성을 측정할 수 있는 마커임. Raw264.7 세포주에 RANKL과 추출물을 처리하고 웨스턴 블랏을 이용하여 IkB의 단백질양을 확인한 결과 RANKL에 의해 감소된 IkB의 수준을 증가시키는 추출물을 발굴하였음



[그림] 세포기반 파골세포 분화 억제 추출물 스크리닝

② 파골세포 분화 억제 추출물 검증

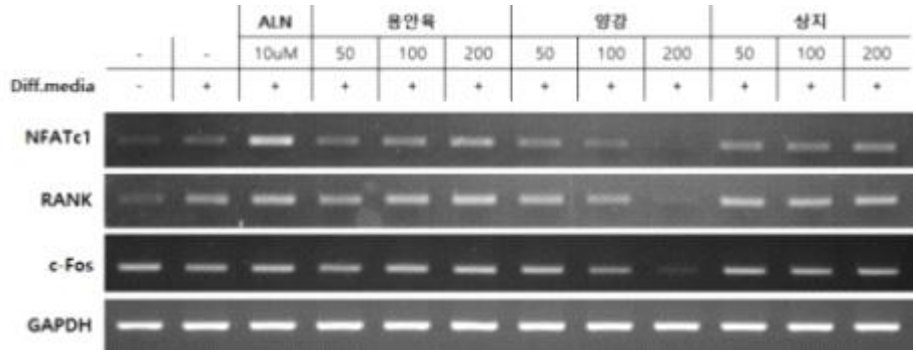
○ 스크리닝을 통하여 발굴된 용안육 추출물이 RANKL에 의해 감소된 IkB의 수준을 증가시키고, 발현이 증가된 TARP유전자의 발현을 감소시키는 것을 확인하였음



[그림] 파골세포 분화 억제 추출물 검증

○ 상지, 양강, 용안육 추출물이 TRAP assay에서 높은 파골세포 분화 억제활성을 나타냄에 파골세포 분화 인자 RNA 발현에 어떠한 직접적 영향을 미치는지 확인하였음. 초기분화단계인 1차 분화 유도 3일 후에는 mono-nucleated macrophage 전구세포가 large multi-nucleated osteoclast로 충분히 분화가 되기 이전 단계로 TRAP의 발현이 유도되지 않으며, cell morphology 또한 아직 mono nuclear

macrophage를 유지하고 있는 상태임. 양강의 경우 초기 분화 단계부터 농도 의존적으로 NFATc1, RANK, c-Fos의 발현을 억제하는 것을 확인하였음



[그림] 상지, 양강, 용안육 추출물의 RNA 발현 억제 활성평가

양강이 TRAP assay에서 뛰어난 파골세포 분화 억제능을 보이는 결과가 파골세포 분화 단계에 관여하는 전사인자의 초기단계에서부터 억제하는데 기인하는 것으로 판단하였음

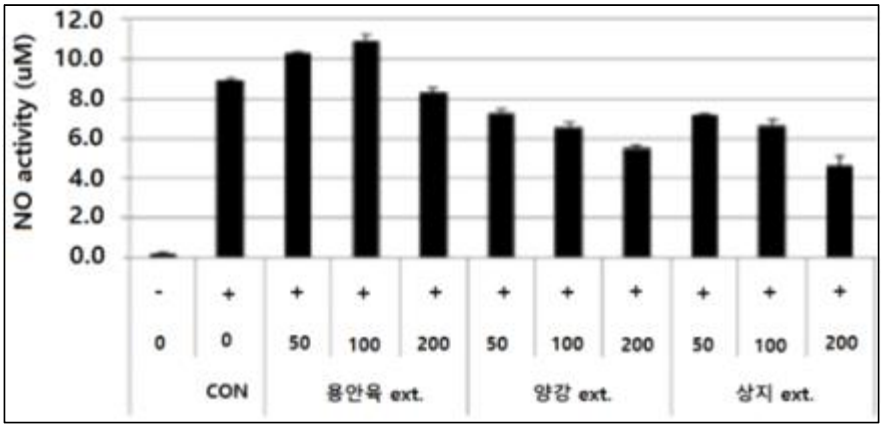
(라) NO(Nitrite Oxide) assay

Nitric Oxide (NO)는 항염증성과 염증성의 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으며, 생체 내 과도한 분비는 오히려 세포독성을 통해 세포를 파괴하고 염증반응을 가속화하여 조직손상을 유발하게 됨. 따라서 염증반응이 진행되는 동안 유의적으로 증가하는 NO를 효과적으로 억제하는 것은 염증질환 치료에서 유용한 방법으로 여겨지고 있음. 항염증 물질을 탐색하기 위하여 단핵식세포 모델을 이용하고자 Mouse macrophage cell line RAW264.7을 이용하여 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM을 배양액으로 5% CO_2 incubator를 이용하여 37° C에서 계대 배양하며 실험에 사용하였고, 생성되는 NO의 양을 세포배양액 중 존재하는 NO_2^-의 형태로 Griess reagent 반응법을 이용해 측정하였음

RAW264.7 세포를 96 well plate에 5 X 10^4 cells/well을 분주한 후 24시간 배양하여 세포가 well에 부착되면 배지를 제거하고 10% FBS가 첨가된 phenol free-DMEM 배지에 특정농도에 시료로 3시간 동안 처리한 뒤 염증성 자극인자인 LPS 500 ng/mL을 처리하여 24시간 배양하고, 세포 배양액을 수거하여 배양액과 동일한 양의 Griess solution을 넣어주고 10분간 빛을 차단하여 반응시킨 후 발색정도를 microplate reader에서 540 nm 흡광도를 측정하였음. 세포배양액 내 NO의 농도(μM)는 $NaNO_2$ 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였으며, RAW264.7 세포의 NO assay 조건하에서 시료에 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 통해 cell viability를 함께 평가하였음

○ 상지, 양강, 용안육 추출물의 NO assay

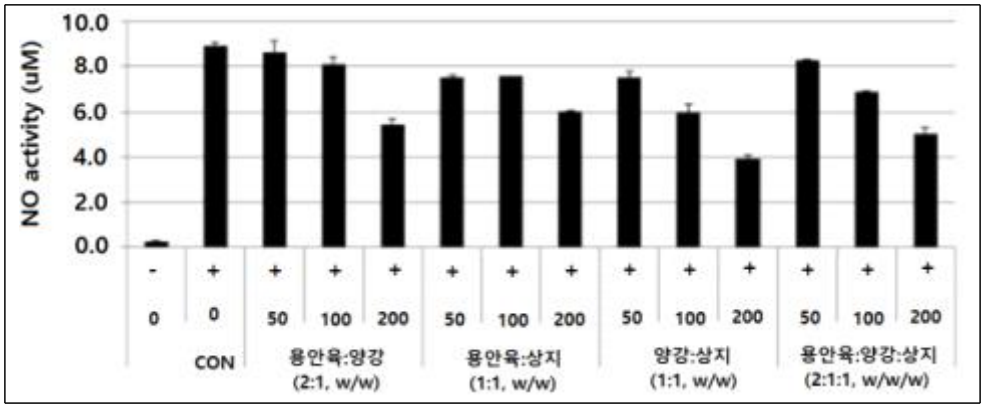
상지, 양강, 용안육 추출물에 최종 분석농도를 200 ㎍/㎖로 하여 NO assay를 진행한 결과 **상지와 양강에 의한 농도 의존적인 NO 생성 억제를 보였음**



[그림] 상지, 양강, 용안육에 NO 생성 활성평가

○ 상지, 양강, 용안육 혼합 추출물의 배합비에 따른 NO assay

상지, 양강, 용안육 혼합 추출물에 분석 최종 농도를 200 ㎍/㎖로 하여 NO assay를 진행한 결과 **4가지 혼합물 모두에서 농도의존적인 NO 생성 억제를 관찰하였음**



[그림] 상지, 양강, 용안육 추출 복합물에 NO 생성 활성평가

○ 후보생약 소재 선정 결과

상지와 용안육은 조골세포 분화를 유의적으로 활성화 시키고 양강은 파골세포 분화를 유의적으로 억제시키는 것을 1차 및 2차 in vitro 활성평가를 통하여 확인하였음. 골건강 개선 기능성 후보 소재는 in vitro 활성과 in vivo 평가결과를 종합하여 선정하였으며, 원료 생산과 완제 제작을 고려하여 **최종 원료 소재로써 용안육과 상지를 선정하였음**

나. 최종 후보군(원료 및 완제) 도출

후보생약 소재인 용안육과 상지를 대상으로 단일 추출물과 복합추출물에 분획물을 제조하고 활성평가를 실시해 최종 후보소재를 선정하였음. 추출물에 수득률(yield, %)은 사업적인 생산 공정을 고려하였을 때, 생산원가와 밀접한 관계가 있으므로 용안육 추출물, 상지 추출물 및 용안육・상지 복합물을 제조하고 각 수득률(yield, %)을 평가해 **용안육 열수추출물 및 용안육·상지 복합추출물을 원료 후보군으로 선정하였음**

표. 후보 원료소재에 수득률(yield, %) 평가

항목	용안육 추출물	상지 추출물	용안육·상지 추출물
수득률 (yield, %)	54.6%	6.4%	27.4%

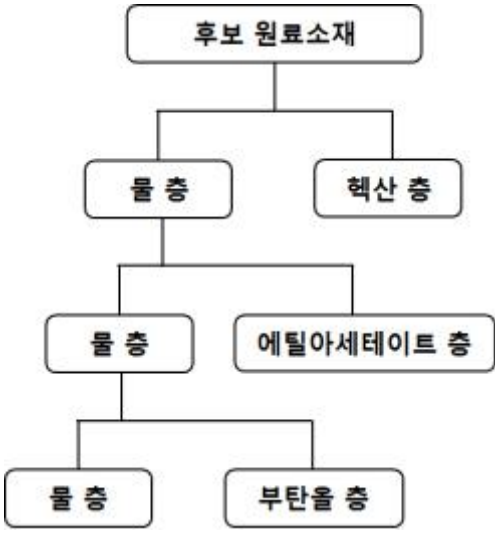
※ 추출용매는 물임

(1) 후보 원료소재 분획물에 in vitro 활성 평가

원료 후보군 소재에 분획물의 제조하고 활성을 규명해 최종 원료를 선정하였음

(가) 활성평가 샘플 제조

후보생약 소재로 선정한 용안육과 상지의 단일 추출물 및 복합추출물을 제조하여 최종 후보군(원료 및 완제) 도출을 하고자 하였다. 단일 추출물 생약 중량 대비 5배수에 물로 2회 반복 환류추출 후 여과하여 여액을 감압건조 및 동결건조를 통해 시료를 제조하였고, 복합물의 경우 2차년도 연구개발에서 실시한 효능평가용 샘플 제조법을 적용하여 용안육, 상지(1:1, w/w) 각 40 g씩을 칭량해 총 중량 대비 10배에 해당하는 30%에탄올을 넣어 4시간씩 2회 반복 환류추출 후 여액을 모두 모아 감압농축 및 동결건조하여 평가시료를 제조하였다.



[그림] 분획물 제조 scheme

No.	구성생약/ 배합 비	구분
1	용안육 Hexane 층	용안육 열수추출물
2	용안육 EA(ethyl acetate) 층	
3	용안육 BuOH(butanol) 층	
4	용안육 DW(distilled water) 층	
5	용안육·상지 Hexane 층	용안육·상지 복합추출물
6	용안육·상지 EA(ethyl acetate) 층	
7	용안육·상지 BuOH(butanol) 층	
8	용안육·상지 DW(distilled water) 층	

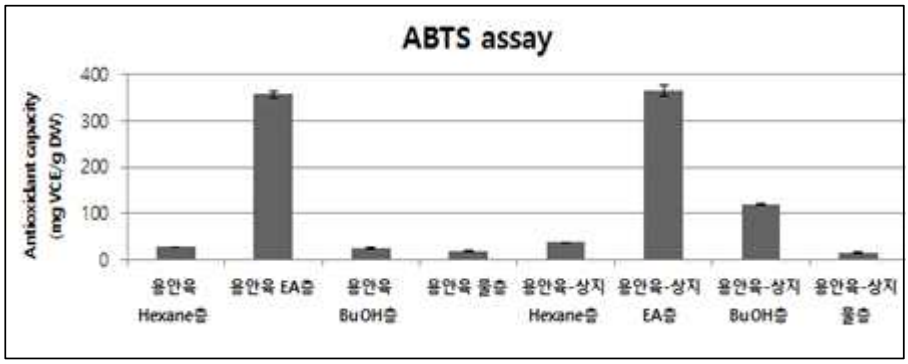
[표] 샘플 제조 표

(나) 항산화활성 측정

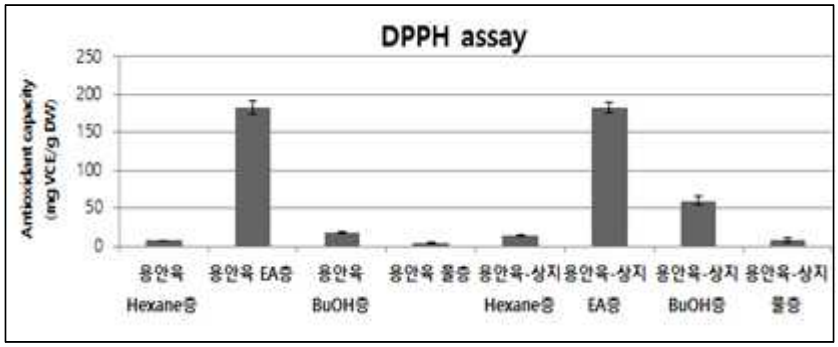
○ ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성

ABTS 라디칼 소거능은 시료 내 항산화 물질이 ABTS 시약과 2,2’-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochlo ride (AAPH)의 반응에 의해 생성된 ABTS 자유 라디칼을 소거시킴으로써 청록색이 탈색되는 원리를 이용하여 측정하였음

DPPH 라디칼 소거능 측정은 시료 내의 항산화 물질과 자유 라디칼인 DPPH 시약이 반응하여 시료의 항산화 작용에 의한 자유라디칼 소거능에 따라 보라색이 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정하였음



[그림] 후보 원료 소재에 ABTS 활성평가

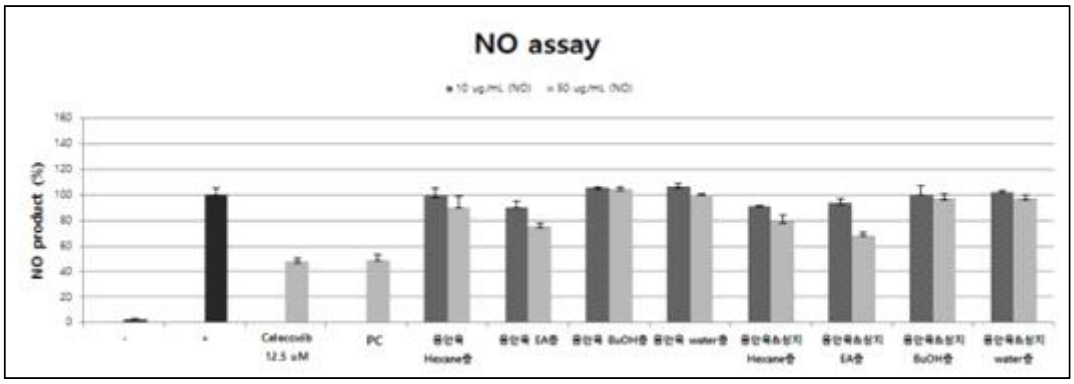


[그림] 후보 원료 소재에 DPPH 활성평가

용안육 열수추출물과 용안육・상지 복합물추출물에 ABTS, DPPH 라디칼 소거 활성 측정 결과, 각 분획에서 흡사한 항산화 활성이 관찰되었으며, **각 추출물에 에틸아세테이트 층(ethly acetate, EA)에서 가장 높은 항산화 활성을 보였음**

(다) NO(Nitrite Oxide) assay

원료 후보군 소재에 항염증 활성을 평가하기 위해 '가. 후보생약 선정 > (2) 2차 in vitro 활성평가 > (라) NO(Nitrie Oxide) assay'와 동일한 방법으로 평가한 결과, **용안육 열수추출물과 용안육·상지 복합물추출물에 에틸아세테이트 분획이 가장 높은 항염증 활성을 나타내었음**

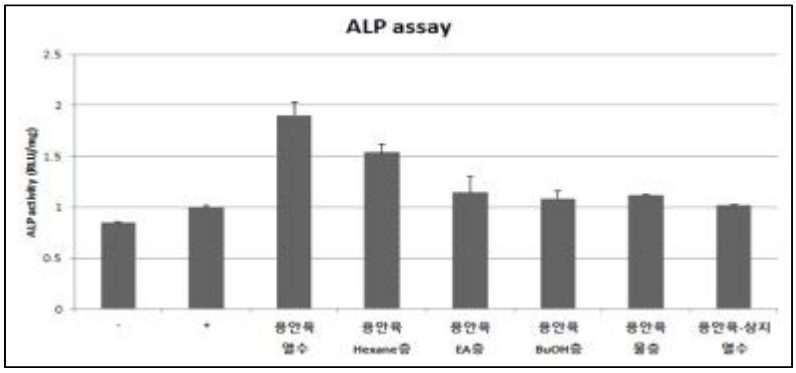


[그림] 후보 원료 소재에 NO 생성 활성평가

(라) 조골세포 분화 촉진 효과 측정

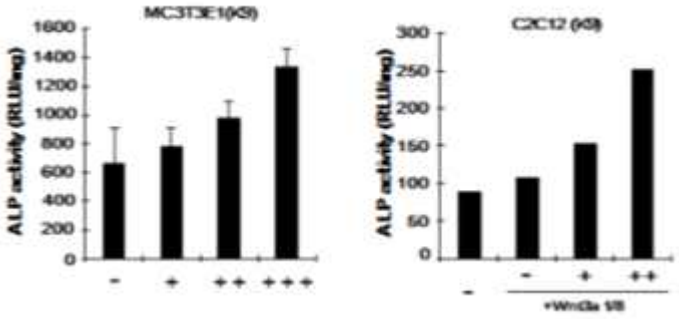
○ ALP(Alkaline phosphatase) assay

용안육 열수추출물에 분획물과 용안육·상지 혼합물을 MC3T3-E1 세포주에서 세포독성을 나타내지 않는 농도로 6일간 처리한 후 ALP 활성을 측정하였음. 실험 결과 **용안육 열수추출물에서 가장 높은 ALP 활성을 보였으며, 용안육·상지 혼합물에서는 ALP 활성을 보이지 않았음**



[그림] 후보 원료 소재에 ALP 활성 평가

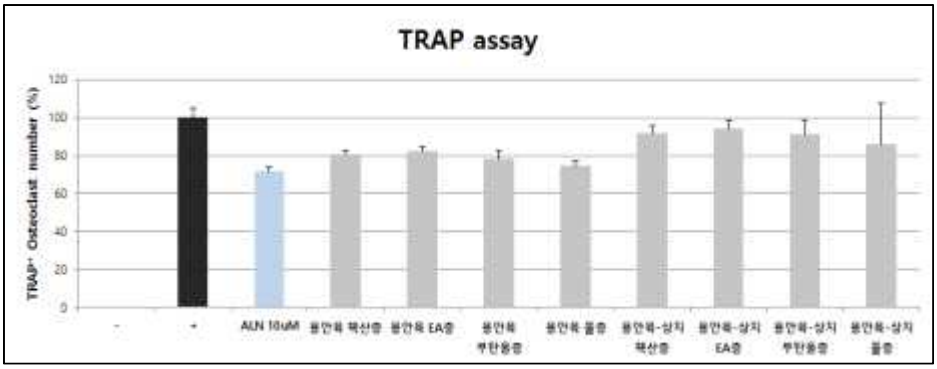
ALP 활성이 가장 높았던 용안육 열수추출물을 대상으로 농도에 따른 ALP 활성변화를 관찰한 결과 **용안육 열수추출물의 처리에 의해 농도 의존적으로 ALP활성이 증가됨을 확인하였음**



[그림] 용안육 열수추출물에 의한 농도 의존적 ALP 활성 증가

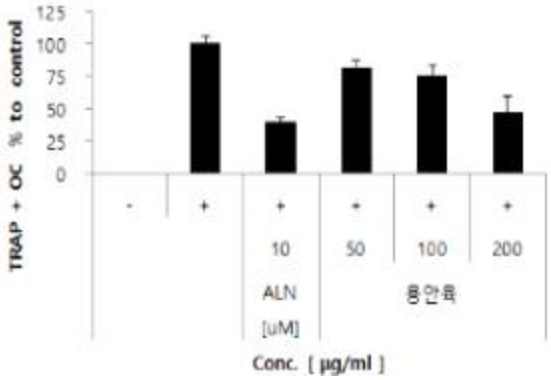
(마) 파골세포 분화 억제 효과 측정

파골세포 분화 억제 효과를 측정하기 위해 대식전구세포에 분화인자인 RANKL을 처리하여 파골세포 분화를 유도한 뒤 용안육 및 용안육·상지 혼합물에 분획물을 평가한 결과, **용안육 열수추출물 분획물이 가장 높은 파골세포 분화 억제 효과를 보였음**

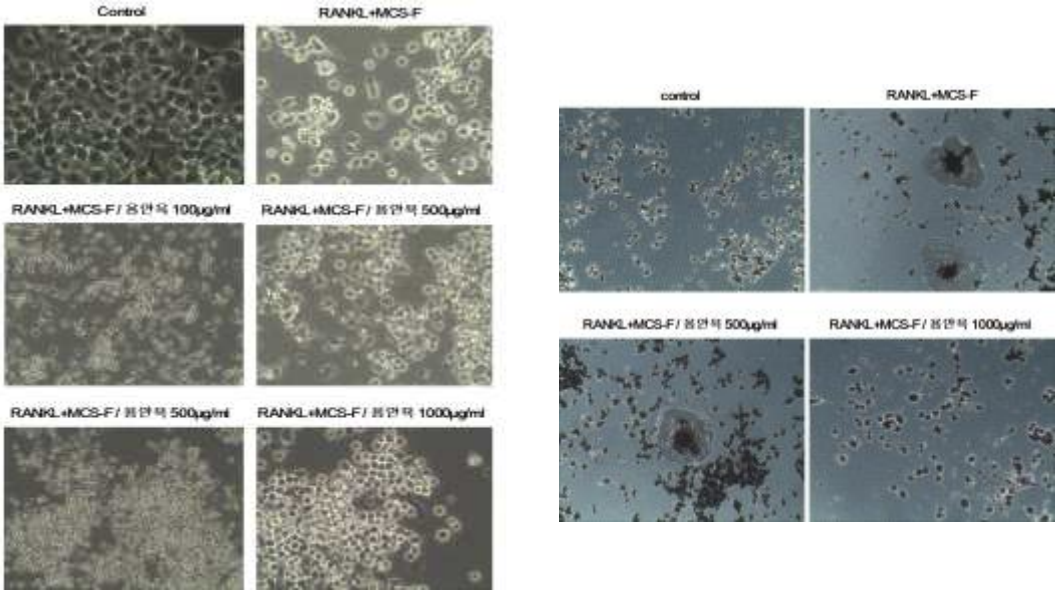


[그림] 후보 원료 소재에 TRAP 활성평가

파골세포 분화 억제 활성이 좋았던 용안육 열수추출물을 대상으로 농도에 따른 파골세포 분화 억제 활성을 평가한 결과 **용안육 열수추출물에 농도 의존적으로 파골세포로의 분화가 억제되는 것을 확인하였음**



[그림] 용안육 열수추출물 농도별 파골세포 분화 억제 활성평가

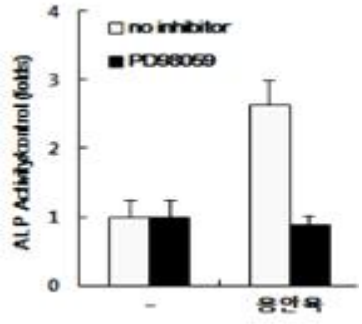


[그림] 용안육 열수추출물의 파골세포 분화 억제 관찰

용안육 열수추출물과 함께 처리한 세포는 파골세포로의 분화가 억제되어 control과 동일한 세포 형태를 유지하는 것을 확인하였고, **용안육 열수추출물에 의해 농도 의존적으로 TRAP positive osteoclast 분화가 억제되는 것을 확인하였음**

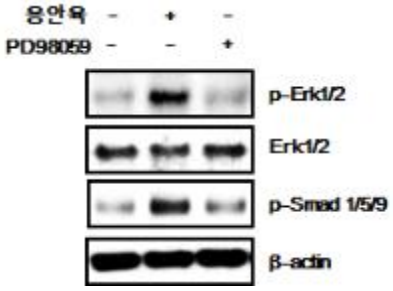
(바) 용안육 열수추출물의 골세포 분화 촉진 기전 연구

ALP 활성이 가장 높았던 용안육 열수추출물을 대상으로 Erk1/2 신호전달체계의 활성화를 통하여 골세포 분화가 촉진되는지에 대한 기전연구를 다음과 같이 수행하였음



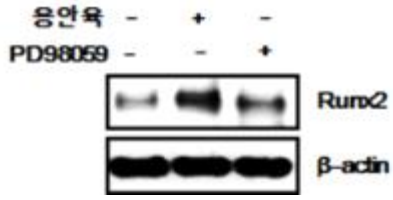
[그림] 용안육 열수추출물에 의한 Erk1/2 매개 ALP 조절

용안육 열수추출물을 처리할 경우 앞서 검증한 것과 같이 ALP 활성이 증가하지만 Erk1/2 inhibitor 인 PD98059 를 처리하면 증가되었던 ALP 활성 증가가 억제됨을 확인하였음



[그림] 용안육 열수추출물에 의한 Erk1/2 신호전달 체계 조절

용안육 열수추출물이 직접적으로 Ekr1/2의 활성화에 영향을 미치는지 확인한 결과 [그림]과 같이 Erk1/2가 인산화 되었으나 PD98059 처리 시 Erk1/2의 인산화가 저해되었고, Smad1/5/9에 인산화 역시 용안육 열수추출물에 의해 증가하나 Erk1/2를 저해하면 인산화가 일어나지 않음을 확인하였음

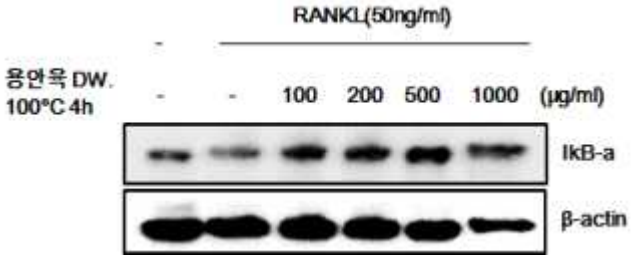


[그림] 용안육 열수추출물에 의한 Erk1/2 신호전달 체계 조절

용안육 열수추출물을 처리하면 Runx2 의 발현이 증가하나 PD98059 처리 시 Runx2 의 발현이 줄어드는 것을 확인하였음. 이를 통해 **용안육 열수추출물이 Erk1/2 신호전달체계를 통해 조골세포 분화를 조절하는 것을 확인할 수 있었음**

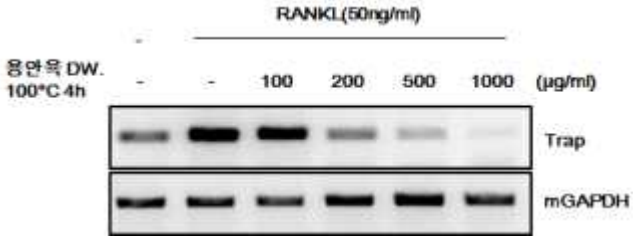
(사) 용안육 열수추출물의 파골세포 분화 억제 기전 연구

TRAP 억제 활성이 좋았던 용안육 열수추출물을 대상으로 NF-κB 신호전달체계를 통하여 파골세포 분화가 억제되는지에 대한 기전연구를 다음과 같이 수행하였음



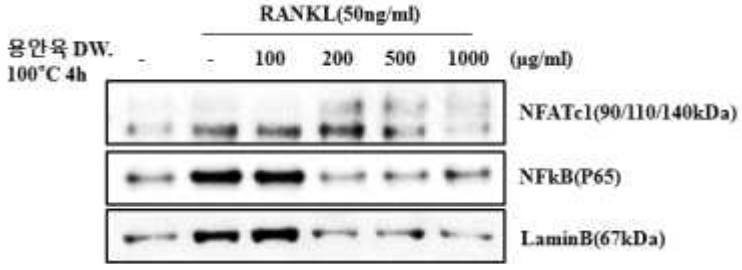
[그림] 용안육 열수추출물에 의한 NF-kB 신호전달 체계를 통한 파골세포 분화 억제

Raw264.7 세포주에 RANKL과 용안육 열수추출물을 이틀간 처리하고 western blot을 이용하여 IkB의 단백질양을 확인한 결과 용안육 열수추출물이 RANKL에 의해 감소된 IkB의 수준을 증가시키는 것을 확인하였음



[그림] 용안육 열수추출물에 의한 파골세포 특이적 유전자 발현 감소

용안육 열수추출물이 파골세포 특이적 유전자의 발현에 미치는 영향 관찰하기 위하여 용안육 열수추출물과 RANKL을 이틀간 처리하여 RT-PCR을 수행하였음. 용안육 열수추출물의 농도에 따라 RANKL에 의해 발현이 증가된 TRAP 유전자의 발현을 감소시키는 것을 확인하였고 internal control로 사용한 mGAPDH는 변화가 없었음



[그림] 용안육 열수추출물에 의한 파골세포 분화 표지 단백질 발현 조절

파골세포 분화 관련 신호전달 작용기전은 NF-κB 신호 전달체계가 활성화 되는 RANKL에

의해 IκB가 분해되어 핵 내로 NF-κB를 이동시켜 활성화하며, NF-κB 신호전달의 전사인자인 NFATc1의 발현을 증가시킴으로써 파골세포의 분화를 유도하였음. 용안육 열수추출물이 NF-κB 신호 전달의 표지 유전자 발현에 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 RANKL과 함께 이틀간 처리한 후 Western을 수행. 용안육 열수추출물을 농도에 따라 처리하였을 때, RANKL에 의해 증가된 NF-κB와 NFATc1의 단백질 발현이 감소되는 것을 확인하였음.

이 결과를 토대로 **골건강 개선 기능성원료 소재로 용안육을 최종적으로 선정하였으며, 용안육 열수추출물을 이용한 원료 및 완제를 생산하였음.** 본 연구에 최종 성과물은 용안육 단독 소재로 확정하였으며, 추후 용안육 + 상지 복합추출물의 연구를 진행할 예정임.

본 연구에서는 골다공증의 주요 원인인 파골세포의 활성 증가와 조골세포의 활성 감소의 불균형에 대한 효능을 평가하기 위하여, 가장 일반적으로 사용하는 모델 세포주인 RAW264.7과 MC3T3/E1 세포주를 이용하여 파골세포 활성 억제력과 조골세포 활성 촉진을 평가하여 가장 우수한 효능을 보이며 그 작용기전 연구를 통해 이중 작용기작을 갖는 용안육 추출물을 최종 선정하였다. 그러나, 일반적으로 사용하는 시험계이나 마우스 유래의 세포주를 이용한 한계점이 있는바, 동등한 혹은 동등이상의 효능이 human cell에서도 동일하게 확인이 되는지는 후속 시험이 필요하다. 이에 human osteoblast 계열의 Saos-2, human osteoblast primary cell을 이용한 ALP, mineralization, gene-expression 확인과, human osteoclast 계열의 Human Osteoclast Precursor Cells, human PBMC(human peripheral blood mononuclear cells)을 이용한 TRAP, gene-expression 및 작용기전 연구를 추가적으로 진행할 계획임.

(2) 원재료의 표준화

천연물제제 특성상 제조된 원료의 동등성 확보를 위해서는 원재료의 구입단계에서부터 관리가 필요하므로 가 소재들에 대한 성분연구 및 시험법 등을 개발하고 원재료에 대한 분석 데이터베이스를 확보하여 관리 방안을 구축하였음

(가) 생약 정보

○ 용안육(龍眼肉)

이 약은 용안(龍眼) *Dimocarpus longan* Loureiro (무환자과 Sapondaceae)의 헛씨껍질로 무환자나무과에 속하는 상록교목인 과실(용안)에서 과피를 제거하고 과육만을 말린 것으로 세로로 파열된 불규칙한 박편으로서 보통 여러 개가 끈끈하게 붙어 있음. 길이 2～4 cm, 두께 2～4 mm로 바깥면은 진한 적갈색～흑갈색으로 반투명함. 한 면은 주름이 지어 고르지 않고 다른 면은 윤기가 있으며 세로 주름이 있음. 질은 부드럽고 점착성이 있음. 이 약은 식품원료로 사용이 가능하며 용안나무는 중국 남부, 동남아시아, 인도 등 열대 아메리카에 널리 분

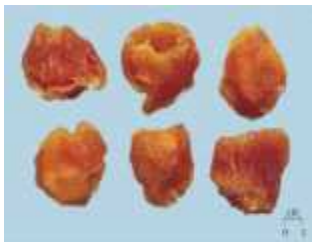
포하고 있음[1),2),3)]

이 약은 약용부위는 과고기이며 예로부터 심(心)과 비(脾)를 보익(補益)하는 효능과 혈(血)을 자양(滋養)하여 심신(心神)을 안정시키는 효능을 가져 건망(健忘)증과 불면증을 치료하고 기(氣)와 혈(血)에 부족을 채워주는 약재로 사용되어왔으며, 가슴이 몹시 두근거리고 불안해하는 심계정충(心悸怔忡)의 증세를 치료하였다 알려져 있음[2)]

용안육에 대한 성분연구는 활발히 이루어지고 있으며, 말린 용안육 열매 1개에는 풍부한 미네랄과 비타민, 아미노산이 존재하여 일반적으로 항스트레스. 혈압조절, 체중 감량 및 뼈 건강 증진, 시력 향상 등에 효능을 얻기 위해 널리 섭취하고 있어 단기간 내에 일반 식품으로의 개발도 가능함.


용안육 나무


용안육의 잎 및 열매


용안육

[그림] 용안육 식물 및 생약 사진

용안육 원재료에 수급은 베트남 및 태국 등 수입에 의존하고 있으며, 국내 유통되는 용안육의 단가는 평균 13,000원/500 g으로 고가에 원료이지만, 최적 원료제조공정 탐색을 통해 50%에 높은 추출효율을 가지는 원료제조공정을 개발하여 원료에 확보에 있어 충분한 사업성을 확인하였음. 또한, 현재 국내에서도 용안육과 같은 열대식물을 재배하고자 다양한 시도가 이루어지는 가운데, 용안육을 이용한 골건강(골다공증) 개선 건강기능식품 개발은 넓은 시장성을 가질 것으로 판단함

판매처	원산지	단가/중량(500 g)
H사	베트남	9,500원
D사	태국	17,500원
Y사	베트남	16,300원
Y사	태국산	10,500원
S사	베트남	13,000원

[표] 국내유통 용안육의 시장현황


Nutritional value of Longan Dried

[표] 용안육에 성분규격

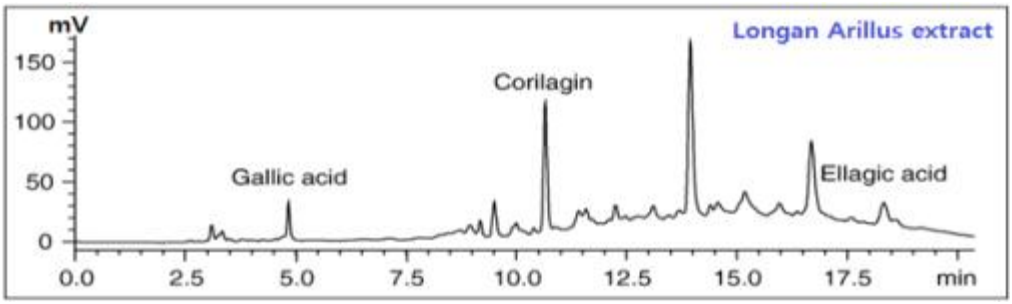
(나) 성분연구

용안육에는 폴리페놀성분인 코릴라긴(corilagin), 엘라그산(ellagic aicd), 4-O-메틸갈산

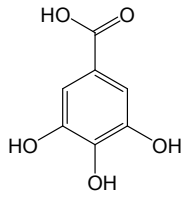
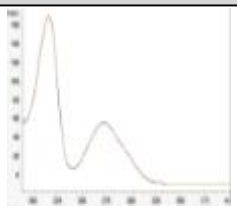
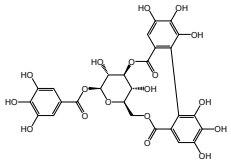
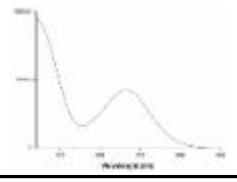
(4-O-methylgallic acid) 그리고 이들의 화합물들이 존재하고 플라보노이드 성분으로 쿼세틴의 글리코사이드(glycosides of quercetin), 캄페롤(kaempferol), 에틸 갈레이트(ethyl gallate), 1-β-O-갈로리-d-글루코피라노즈(1-β-O-galloyl-d-glucopyranose), 그레비포린(grevifolin) 그리고 4-O-α-l-람노피라노실-갈산(4-O-α-l-rhamnopyranosyl-ellagic acid) 등의 생리활성 성분이 존재함.[4] 신선한 용안육 열매 중량에 약 17%를 차지하는 씨(seed)에는 36.15 mg/g에 총 페놀릭 화합물이 함유되어 있으며[5], 특히, 코릴라긴(corilagin), 엘라그산(ellagic acid), 갈산(gallic acid) 와 같은 폴리페놀류가 함유되어 있어 강장작용, 항산화작용, 면역기능 활성화작용 등의 생리활성 약리작용을 나타냄. 코릴라긴은 탄닌의 일종으로 강한 항산화력과 항미생물 작용을 나타내며, 엘라그산, 갈산 또한 강력한 항산화, 항암작용을 나타내는 성분으로 잘 알려져 있음[6]

본 연구에서는 용안육을 이용한 여러 골 관련 활성평가를 통해 용안육에 우수한 골건강 증진 활성을 관찰하였으며, 건강기능식품원료 개발을 위해 추후 용안육에 성분연구를 통해 용안육에 활성성분을 분리·동정하고 골 대사에 유효한 활성성분을 규명할 계획임

용안육 원재료의 성분프로파일 문헌[7]을 통해 3가지 용안육 유래성분(gallic acid, corilagin, ellagic acid)를 확인하였으며, gallic acid 및 corilagin은 비교적 높은 함유량으로 용안육에 대한 대표성을 가질 것으로 예상함



[그림] 용안육 유래 성분 HPLC pattern 분석 크로마토그램

No	물질정보	구조	UV spectrum
1	· 성분명 : gallic acid · CAS No : 149-91-7 · 성상 : white powder · 분자식 : $C_7H_6O_5$ · 분자량 : 170.1 g/mol		
2	· 성분명 : corilagin · CAS No : 23094-69-1 · 성상 : yellow powder · 분자식 : $C_{27}H_{22}O_{15}$ · 분자량 : 634.4 g/mol		

[표] 용안육 유래 물질 정보

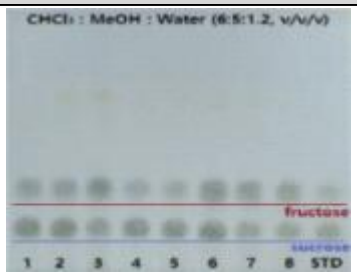
(다) 원재료 기준 · 규격 설정

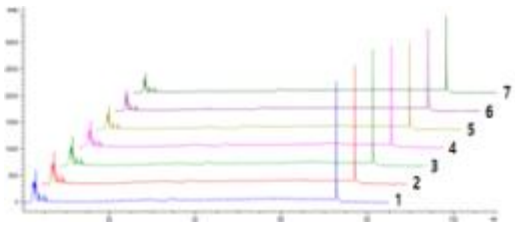
○ 원재료 모니터링

원재료의 산지, 수확시기 등을 확정하기 위해 각기 다른 경로로 구입된 용안육 원재료에 대해 모니터링을 진행하였음.[7] **<u>총 7~8종에 용안육 원재료를 모니터링하여, 베트남 또는 태국산에 용안육을 사용하기로 확정하였으며, 원재료에 성분프로파일 자료는 원료와 완제에 기초연구 자료로 사용하였음</u>**

용안육은 열대식물에 열매로써 베트남과 태국이 주를 이루나, 여러 열대지역에서도 널리 자생한다 알려져 있으므로, 추후 수입국별 원재료를 수집하여 성분프로파일 및 성분연구를 진행해 원재료에 안정성을 확보할 계획임

<table>
<tr><th>시험항목</th><th>시험방법</th><th>시험결과</th></tr>
<tr><td>확인시험
(TLC)</td><td>① 검액 제조
: 30 mg/mL의 농도가 되도록 70% 메탄올에 녹여 검액으로 함

② 전개 조건
: fructose, sucrose를 표준물질로, chloroform : methanol : water (6 : 5 : 1.2, v/v/v)를 전개용매로 하고, 전개한 후 anis-aldehyde로 발색하여 확인함</td><td> 

<table>
<tr><th>No.</th><th>code</th><th>산지</th></tr>
<tr><td>1</td><td>DLB-1</td><td>베트남</td></tr>
<tr><td>2</td><td>DLT-2</td><td>태국</td></tr>
<tr><td>3</td><td>DLT-3</td><td>태국</td></tr>
<tr><td>4</td><td>DLT-4</td><td>태국</td></tr>
</table>
<table>
<tr><th>No.</th><th>code</th><th>산지</th></tr>
<tr><td>5</td><td>DLB-5</td><td>베트남</td></tr>
<tr><td>6</td><td>DLB-6</td><td>베트남</td></tr>
<tr><td>7</td><td>DLB-7</td><td>베트남</td></tr>
<tr><td>8</td><td>DLB-8</td><td>베트남</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>성분
프로파일</td><td>용안육 추출물을 검액으로 사용하여 PDA 및 ODS column (4.0 × 250 ㎜, 5 ㎛)과 ACN을 이동상 (gradient)으로 하여 HPLC로 분석함</td><td> 
</td></tr>
</table>

[표] 원재료 모니터링 결과

○ 원재료 기준 · 규격 설정

원재료의 기준·규격 확보는 원료 생산에 사용된 원재료의 품질관리 차원에서 설정되고 관리되어야 함으로 공정서 및 시험법 개발을 통해 원재료에 대한 기준·규격을 설정하였음

항목	기준 · 규격	비고
확인	당 확인	KP
건조감량	15% 이하	
회분	5% 이하	
중금속	납 5 ppm 이하 비소 3 ppm 이하 수은 0.2 ppm 이하 카드뮴 0.3 ppm 이하	
잔류농약	고시 (기본 농약 5종)	
잔류이산화황	30 mg/kg 이하	

[표] 원재료의 기준 · 규격

(3) 원료 제조 및 기준 · 규격 설정

(가) 최적 추출공정 확립

앞서 진행한 in vitro, in vivo 스크리닝 결과를 종합하여 용안육 추출물을 본 과제의 원료 확정지었음. 용안육 추출물을 제조하기 위하여 최적의 추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출 횟수 등 많은 변수가 검토되었으며, 제조 원료에 상업적 가치와 경제적 효율을 고려하여 대량생산이 가능한 추출공정이 탐색되었음

공정변수 / 평가항목	추출 용매	추출 시간	추출 온도	추출 용매량	추출 횟수
세부 내용	물	2시간	90±5℃	2배수	1회
	메탄올	4시간	100±5℃	5배수	2회
	-	-	-	8배수	-
평가 방법	ALP assay, Runx2			수득률(yield, %)	

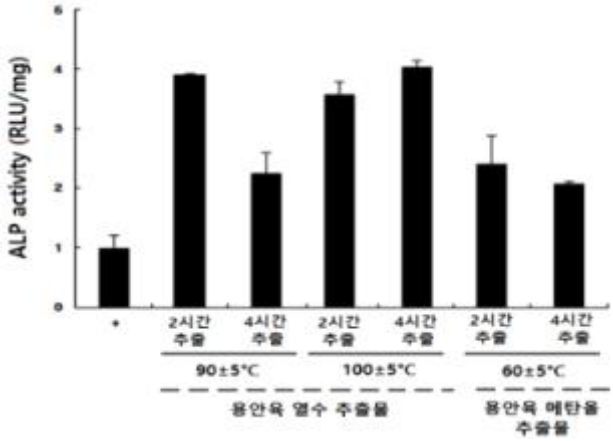
[표] 용안육 추출물 제조공정 탐색

○ 추출 용매, 추출 시간, 추출 온도 선정

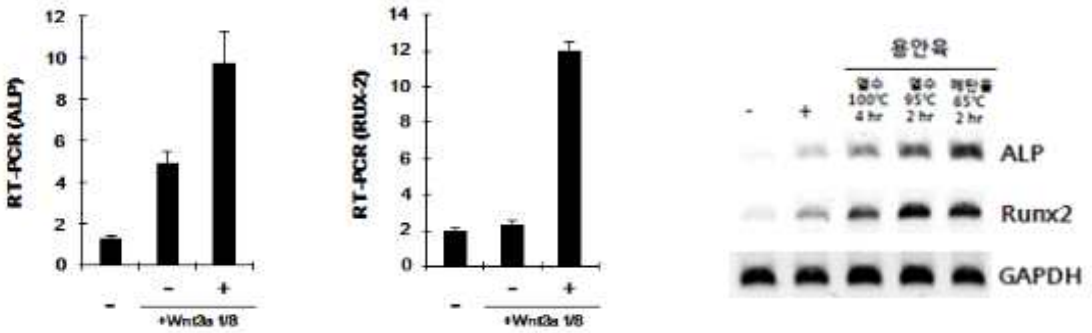
용안육에 사용부위가 씨앗을 제거한 과육임을 고려하여 함유 성분이 적절히 용출되는 용매를 검토하였음. 변수에 따라 추출물을 제조하였고 감압농축으로 건조분말을 제조하여 ALP 활성평가 시료로 사용하였음. ALP assay는 '가. 후보생약 > (1) 1차 in vitro 활성평가 > (나) ALP(alkaline phosphate) assay' 에 따라 진행하였음

최종농도 500 ㎍/㎖로 시료 평가하였을 때, 열수추출물에서 가장 높은 조골세포 분화 활성과 alkaline phosphatase(ALP), Runx2의 발현이 증가되는 것을 관찰하였으며, 100±5℃에 추

출온도에서 가장 높은 조골세포 분화 활성을 확인하였음. 100±5℃에 추출온도에서 2시간 추출물과 4시간 추출물은 활성측면에서 큰 차이가 나지 않아 제조공정 원가를 고려해 **용안육 추출물은 100±5℃ 열수로 2시간 환류 추출하는 것으로 확정하였음**



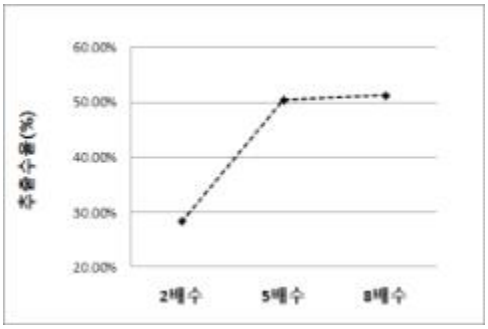
[그림] 추출물 제조공정 변수에 따른 ALP 활성 평가



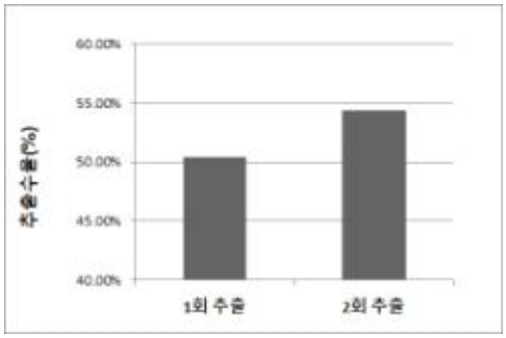
[그림] C2C12와 MC3T3-E1 세포주에서 조골세포 분화 특이적 유전자 발현 증가 확인

○ 추출 용매량, 추출 회수 선정

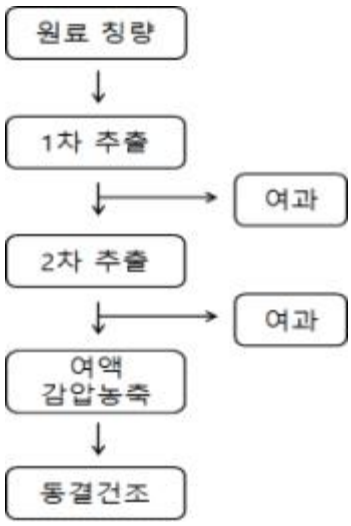
용매량과 추출 횟수에 따라 원료 수득율(yield, %)이 달라지고, 이는 생산원가와 밀접한 관계에 있으므로 경제적 효율을 높이기 위해 추출 용매량과 추출 횟수를 확정지었음. 그 결과 추출 용매 5배수와 8배수의 수득률(%)은 유사하였고, 1회 추출하였을 때에 비해 2회 반복 추출하였을 경우 약 5%에 수득률이 증가함을 확인하여 **용안육 추출물은 생약 중량대비 5배수의 물(w/v)로 2회 반복 환류 추출하여 제조하는 것으로 확정하였음**



[그림] 추출 용매량에 따른 수득률(%)



[그림] 추출 횟수에 따른 수득률(%)



[그림] 용안육 열수추출물 제조공정 scheme

(나) 제조공정의 표준화

○ 원료 scale-up 생산

용안육 열수추출물의 제조공정을 파일럿 원료생산에 적용하기 위해 우선적으로 lab 수준에서 scale-up 생산이 선행되었음. 약 2 kg에 용안육 열수추출물을 3회 제조하여 NET-DL-01, 02, 03 원료를 생산하였고, 성상을 비롯한 이화학적 평가로 각 원료에 동등성을 확인하여 원료 제조공정에 재현성과 적합성을 확보하였음

항목	롯트 번호		
	NET-DL-01	NET-DL-02	NET-DL-03
원료			
생약투입량	2.2 kg	2 kg	1.6 kg
원료생산량	1.2 kg	1.1 kg	0.9 kg
수율(%)	54.5%	54.3%	54.0%
성상	분말	분말	분말
건조감량	7.41%	8.02%	8.15%

[표] Scale-up 원료생산

공정명	내용	지표성분 함량 변화(mg/g)	수율 (kg)
원료칭량	① 생약 칭량 : 용안육 칭량 ② 용매 칭량 : 원재료 중량부에 5 배수(w/v)의 정제수를 칭량	0.2~0.3	100
1차 추출	원재료 중량 대비 5 배수의 정제수를 넣고 100±2℃에서 2 시간 환류 추출		600
여과	추출액을 10 ㎛ 이하의 페이퍼 필터를 사용하여 여과	0.2~0.3	450
2차 추출	잔사에 원재료 중량 대비 5 배수의 정제수를 넣고 100±2℃에서 2 시간 환류 추출		750
여과	추출액을 10 ㎛ 이하의 필터를 사용하여 여과	0.2~0.3	600
농축	1차, 2차 여과액을 모아 40~80 ℃ 에서 감압농축		
건조	동결건조	0.4~0.5	50

[표] 원료 제조공정표

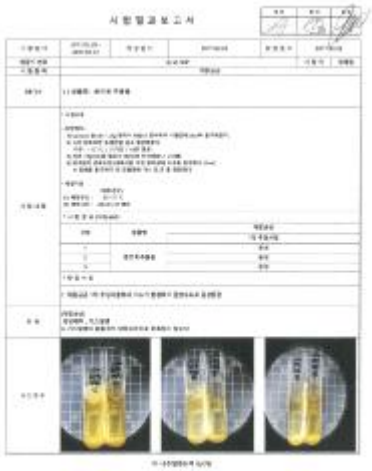
(다) 원료 기준 및 규격 확립

용안육 열수추출물의 기준 및 규격설정은 NET-DL-01, 02, 03 3가지 원료를 대상으로 평가되었고, '건강기능식품 기능성 원료 및 기준 · 규격 인정에 관한 규정, 식품의약품안전처 제2013-10호'에 근거하여 원료의 기준 및 규격을 설정하였음.

공정명		기준 및 규격	
성상		분말이다.	자사규정
건조감량		6.2~9.4% 이내	대한민국약전
중금속	총비소	1 mg/kg 이하	식품공전
	납	1 mg/kg 이하	식품공전
	카드뮴	0.5 mg/kg 이하	식품공전
	총수은	0.5 mg/kg 이하	식품공전
미생물		대장균균 음성	식품공전
*갈산(gallic acid) 함량(%)		0.004~0.006%	자사규정

* 갈산(gallic acid) 함량(%): 용안육 열수추출물 1g 당 함유된 갈산에 함량(%) 임

[표] 원료의 기준 · 규격

총수은	총비소, 납, 카드뮴	미생물
		
한국기능식품연구원	자사	자사

* 자사에서 시험이 불가능한 총수은 규격설정을 위해 한국기능식품연구원에 분석의뢰를 진행하여 공인성적서를 획득함

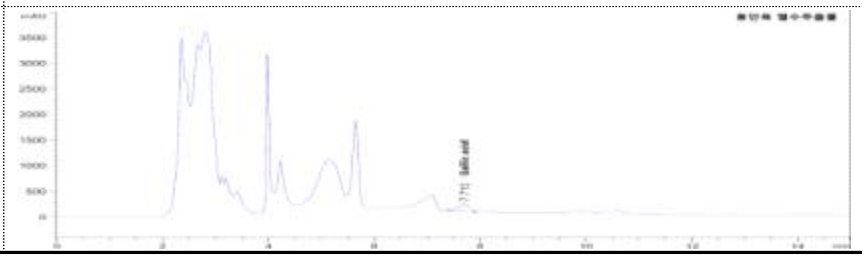
[표] 용안육 열수추출물에 규격설정 시험성적서

○ 지표성분 설정 및 분석법 개발

용안육은 사포닌과 다당체를 다량함유하고 있으며 함량시험법으로 당을 이용한 시험법이 검토되었으나, 정량분석에 어려움으로 원료의 지표성분으로써 다당체를 설정하지 못하였음. 각 문헌과 분석결과를 토대로 용안육 함유성분 중 상용성이 높고 분석이 용이한 페놀계 성분으로 지표성분을 선정하고자 하였으며, 용안육에 성분프로파일 결과 갈산(gallic acid)과 코랄긴(corilagin)을 후보 지표성분으로 예상하였음. 비록 함유량은 코라긴(corilagin)이 높았으나, 분석시간 측면에서 갈산(gallic acid)이 효율성이 높을 것으로 판단하여 최종 용안육 열수추출물에 지표성분을 갈산(gallic acid)으로 선정하고 분석법을 개발하고 검증을 실시하였음
그러나 갈산(gallic acid)의 경우 대표성이 떨어짐으로 추후 용안육에 성분연구를 통해 특이성 및 대표성이 확보된 성분을 지표성분을 재설정할 계획임

○ 유효성분 설정 및 분석법 개발 계획

제조공정 변수에 따른 ALP 활성평가를 토대로 최적의 제조공정을 설정(p44)하였으며, 후보생약 소재인 용안육 열수추출물의 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 순으로 분획물을 제조하고 각 분획물에 대한 항산화, 항염, ALP, TRAP 활성을 평가하였음.(p32~35) 지표물질의 평균 농도는 용안육 1g 함량대비 % 수준으로 기재하였으며(p47), 분석시 효율성을 판단하여 갈산을 지표물질로 선정하였으나 갈산이 유효활성 물질인지에 대한 연구는 추후 진행할 계획임.

항목	내용
Column	Zorbox eclipse C18 (4.6 X250 mm, 5 μm)
Column temp.	30℃
Detector	PAD-DAD (210 nm)
Injection vol.	10 μL
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	Isocratic degassed mixture of 0.1% phosphoric acid with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid with distilled water (5:95, v/v). * run time: 15 min
Chromatogram	

[표] 갈산(gallic acid) 함량분석 법

○ 분석법 검증

'의약품 등 시험방법 밸리데이션 가인드라인 해설서'를 참고하여 용안육 열수추출물 중 갈산(gallic acid) 분석법을 검증한 결과 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성 결과가 기준에 부합하여 **원료의 품질관리에 적용할 갈산(gallic acid) 함량시험법이 적합함을 증명하였음**

지표성분	분석법 검증 결과	
갈산	특이성	용안육 열수추출물에서만 존재하는 특이적인 성분으로, 분석 시 영향을 주는 내인성 물질은 없다.
	직선성	원료의 기준을 포함하는 11.3~0.7 ug/mL 농도범위에서 R^2 값이 0.999 이상의 검량선 갖고, 정량한계는 0.159 ug/mL 이다.
	정확성	원료의 회수율은 100±5% 이내, %RSD는 2.0% 이하로 기준에 적합하다.
	정밀성	원료의 %RSD는 2.0% 이하로 기준에 적합하다.

※ 시료조제
- 검액: 70 ㎎/㎖에 용안육 열수추출물 (with methanol)
- 표준원액: 10 ㎍/㎖에 갈산(gallic acid) (with methanol)

[표] 원료 중 갈산(gallic acid) 분석법 검증

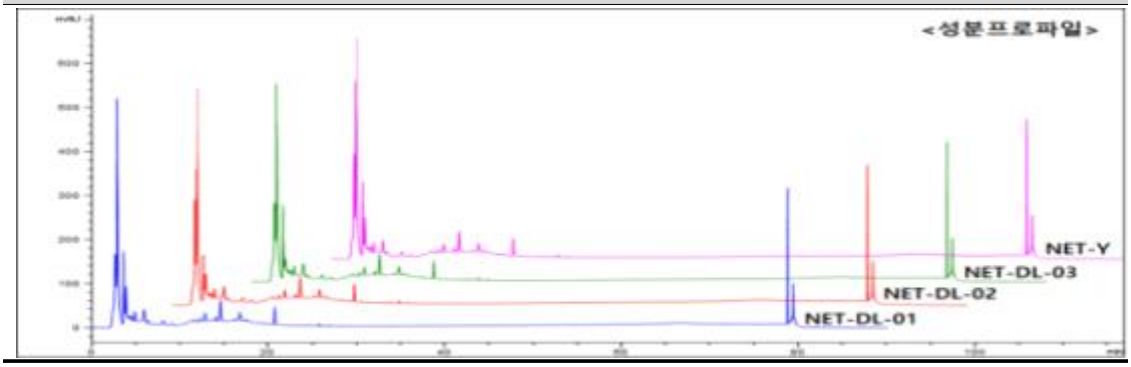
○ 원료 파일럿 생산

용안육 열수추출물에 scale-up 생산결과를 토대로 파일럿 생산을 진행하여 약 **10 kg의 원료 (NET-Y, 용안육 열수추출물)를 생산하였고,** NET-DL-01, 02, 03 세 원료와 NET-Y에 성분프로파일 및 갈산에 함량을 비교하여 원료 간에 이화학적 동등성을 확인하였음. 생산원료에 대하여 잔류농약 246항목을 '한국분석기술연구원'에서 실시하여 잔류농약 불검출에 결과 성적서를 획득하였음 **NET-Y에 성적서를 발행하여 기초 독성시험과 인체적용시험에 원료로 사용하였음**

파일럿 생산 원료 (NET-Y)	NET-Y CoA	잔류농약 246항목 시험성적서
		
	자사	한국분석기술연구원

[표] 원료 파일럿 생산

생산원료 성분프로파일 패턴비교



[표] 원료 간 성분프로파일 패턴비교

(4) 완제 제조 및 기준 · 규격 설정

(가) 제제연구 및 처방연구

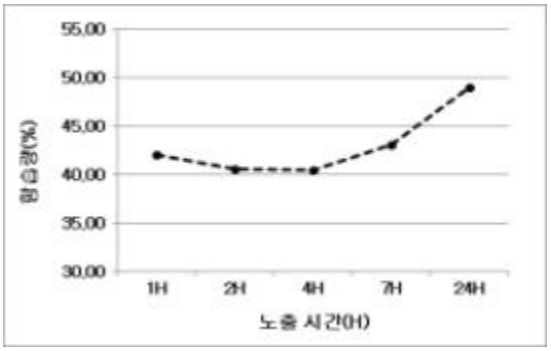
용안육 열수추출물을 주원료로 하는 완제(시작품)를 개발하기 위해 원료에 물리적 특성을 파악하는 제제연구를 진행하였음. 본 연구는 완제 처방연구에 기초자료가 되며, 원료의 흡습성, 흐름성 및 용해도 평가를 통해 원료특성에 맞는 최적에 첨가제를 선택하였음

항목	내용
제제연구	원료의 물리적 특성(흡습성 및 용해도) 평가
처방연구	원료와 부형제 간에 적합성 평가

[표] 완제 개발을 위한 기초연구

○ 원료의 흡습성 및 용해도 평가

원료의 흡습성는 완제 제조 시 작업환경과 보관조건에 영향을 미치고, 용해도는 완제의 제형 선정 시 가용용매에 대한 정보를 나타냄. 흡습성 평가는 특정한 환경조건에서 원료를 개봉하여 노출하였을 때, 노출시간에 따른 원료에 수분함량을 무게로써 평가하였음. 용해도 평가는 '대한민국약전' 통칙 중 용해성 평가 법에 따라 시험하였음. 평가 결과 **원료는 굉장히 높은 흡습성을 가지고 있으며, 가용용매는 물임을 확인하였음**



*장기보존조건: 25±2℃, RH 60±5%

[그림] 원료의 흡습성 평가

용매조건	판정
물	잘 녹는다
70% 에탄올	매우 녹기 어렵다
에탄올	거의 녹지 않는다

[표] 원료의 용해도 평가

○ 처방연구

원료(용안육 열수추출물)에 물성을 보완해 줄 수 있는 첨가제 중 원료와 interrupt 반응이 일어나지 않는 첨가제를 선정하고자 하였으며, 원료 특성상 조해성을 낮추고 흐름성을 높일 수 있는 첨가제에 초점을 맞추어 첨가제 스크리닝을 진행하였음

구 분	후보 첨가제
부형제	결정셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 유당수화물, 전호화전분, 옥수수전분
붕해제	L-HPC, CMC-Ca
활택제	스테아르산마그네슘, 이산화규소, 이산화티타늄, 경질무수규산, 탤크
유화제	글리세린지방산 에스테르
코팅기제	히드록시프로메틸셀룰로오스, 에칠셀룰로오스, 폴리비닐알콜, 레시틴

[표] 후보 첨가제

외 형	구분	첨가제
	부형제	결정셀룰로오스
		옥수수전분
	붕해제	스테아린산마그네슘
		이산화규소
		이산화티타늄
	유화제	글리세린지방산 에스테르
	색소	코치닐 추출색소
	코팅기제	히드록시프로필메틸 셀룰로오스

[표] 완제 처방

(나) 완제의 기준 · 규격 확립

처방연구를 통해 개발한 용안육 열수추출물 완제는 장방형 코팅제형 정제로 '건강기능식품 기능성 원료 및 기준 · 규격 인정에 관한 규정, 식품의약품안전처 제2013-10호' 에 근거하여 완제의 기준 및 규격을 설정하여 성적서를 발행하고 본 완제는 인체적용시험에 시작품으로서 사용하였음
성상, 붕해도, 중금속, 미생물 및 지표성분함량 시험은 자사에서 진행하였으며, 추후 원료에 개별인정 신청 전 지표성분에 대한 추가 연구 후 기능식품연구원을 통해 공인성적서를 획득할 예정임

공정명		기준 및 규격	
성상		탁한 자줏빛 분홍색의 제피정제로 이미, 이취가 없어야 한다.	자사규정
붕해도		30분 이내	건강기능식품공전
중금속	총비소	1 mg/kg 이하	식품공전
	납	1 mg/kg 이하	식품공전
	카드뮴	0.3 mg/kg 이하	식품공전
	총수은	0.5 mg/kg 이하	식품공전
미생물		총호기성미생물수(cfu/g) 5,000 이하	식품공전
		총진균수(cfu/g) 100 이하	식품공전
		특정세균 음성 (대장균군, 살모렐라, 대장균, 황색포도상구균)	식품공전
갈산(gallic acid) 함량		검액과 표준액의 주성분 피크의 유지시간은 일치한다. (0.003~0.005%)	자사규정

* 갈산(gallic acid) 함량: 주원료(용안육 열수추출물)로써 1g 당 함유된 갈산에 함량(%)임
* 원료의 평균 갈산함량(약 0.05 mg/g)과 완제의 평균 갈산함량(0.03 mg/g)에 차이는 완제 처방에 사용된 첨가제 때문임

[표] 완제의 기준 · 규격

○ 분석법 검증

완제의 지표성분은 원료와 동일하게 갈산(gallic acid)으로 선정하였으며, '의약품 등 시험방법 밸리데이션 가인드라인 해설서' 를 참고하여 완제 중 갈산 분석법을 검증한 결과 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성 결과가 기준에 부합하여 **완제의 품질관리에 적용할 갈산에 함량시험법이 적합함을 증명하였음**

지표성분	분석법 검증 결과	
갈산	특이성	용안육 열수추출물에서만 존재하는 특이적인 성분으로, 분석 시 영향을 주는 내인성 물질은 없다.
	직선성	원료의 기준을 포함하는 10 ~ 0.5 ug/mL 농도범위에서 R^2 값이 0.999 이상의 검량선 갖고, 정량한계는 1.114 ug/mL 이다.
	정확성	원료의 회수율은 100±4% 이내, %RSD는 2.0% 이하로 기준에 적합하다.
	정밀성	원료의 %RSD는 2.0% 이하로 기준에 적합하다.

※ 시료조제
- 검액: 용안육 열수추출물을 주성분으로써 70 ㎎/㎖ (with methanol)
- 표준원액: 10 ㎍/㎖에 갈산(gallic acid) (with methanol)

[표] 완제 중 갈산(gallic acid) 분석법 검증

완제 외형	시작품 CoA	
		
	한국기능식품연구원	완제품 성적서(자사)

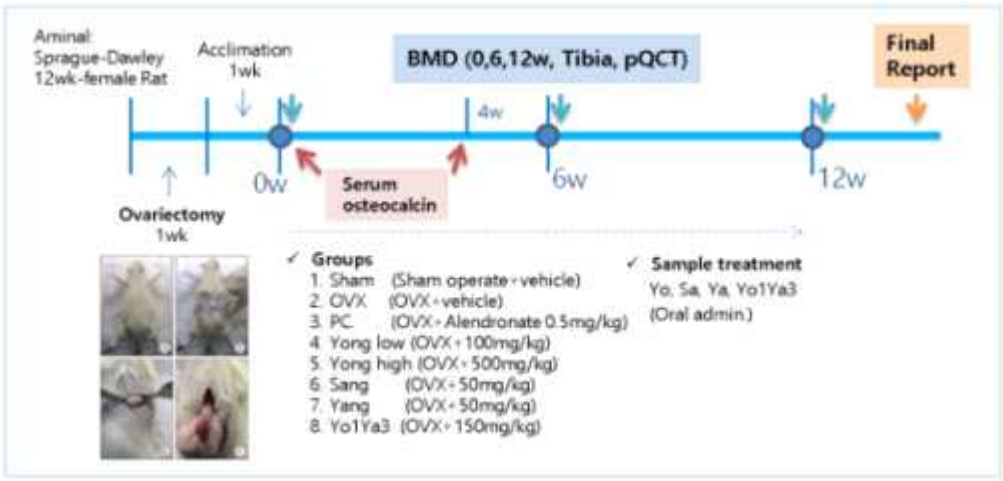
[표] 완제 외형 및 CoA

3.2. 비임상시험 및 허가자료 구비

가. 비임상시험

(1) 난소절제 랫드모델(Ovariectomized Rat)을 이용한 골다공증 치료 효력평가

1차 in vitro 스크리닝을 통해 선정된 3종에 후보 생약소재(용안육, 상지, 양강)에 대하여 난소절제 랫드(Ovariectomized Rat) 동물모델을 이용해 골다공증 유발 동물효력시험을 진행하였음. 시험물질을 1일 1회, 12주간 반복 경구 투여하여 골밀도(bon mineral density, BMD)를 측정해 시험물질의 골다공증 개선효과를 비교・평가하였음



[그림] 효력평가 시험계획 scheme

○ 시험 정보

① 시험동물

- 시험종: Rat(*Rattus norvegicus*) / 샘타코
- 시험계통: Sprague-Dawley Rat 특정병원체 부재동물(SPF)
- 시험개시 시 주령: 12주령

② 사육환경 조건

- HVAC 공조조건: 100% HEPA-filtered air, 환기횟수 최소 10 air changes/hr
- 온습도 범위: 22 ± 3 ℃, 50 ± 20 % (상대습도)
- 조명시간 및 조도: 2 시간 점등(조명시간: 08:00～20:00), 조도 150～300 Lux
- 사료 및 음수: 자율배식 (난소 적출 전날 16시간 절식)

③ 시험방법

- 동물입수 및 순화 → 군분리 → 골밀도 측정 → 난소절제 → 투여경로 및 선정근거

④ 시험군 구성 및 투여용량

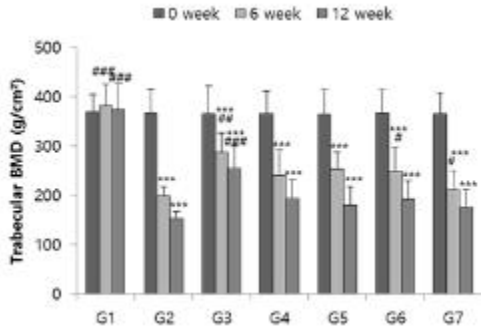
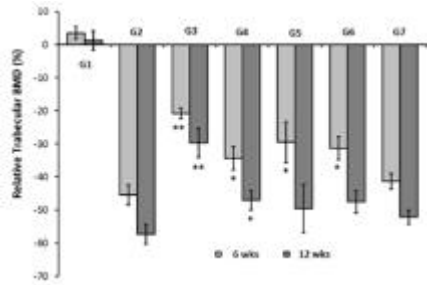
시험군	시험동물	시험처치	투여용량 (mg/kg/day/day)	투여농도 (mg/mL)	동물 수
					암컷
G1	Sham Control	Vehicle (Purified Water)	0	0	6
G2	Ovariectomized SD Rat	Vehicle (Purified Water)	0	0	6
G3		Alendronate(대조군)	0.5	0.05	6
G4		용안육 추출물(저용량)	100	10	6
G5		용안육 추출물(고용량)	500	50	6
G6		상지 추출물	50	5	6
G7		양강 추출물	50	5	6

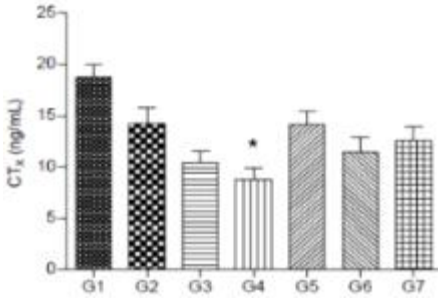
※ 투여경로는 임상 적용경로가 경구임을 고려하여 경구 투여로 실시함

⑤ 관찰항목

- 사망여부, 일반증상 관찰, 체중측정, 골밀도 측정, Osteocalcin 및 C-terminal Cross-linking Telopeptide (CTX) 측정, Micro CT 촬영
- 통계처리

○ 시험결과

시험항목	시험결과	비고
사망여부/ 일반증상	시험기간 동안 사망동물 및 일반증상은 관찰되지 않음	-
체중변화	시험물질에 의한 체중변화 관찰되지 않음	-
골밀도 (BMD)	- 6주 • Trabecular BMD: 용안육 추출물 저용량, 고용량군(G4, G5)에서 경계적 유의성(p=0.07, p=0.08)을 보임. 상지 추출물(G7) 통계적 유의함 확인됨 (p<0.05). • Relative Change of Trabecular BMD: 용안육 추출물 저용량(G4), 고용량(G5) 모두 통계적으로 유의함이 확인됨 (p<0.05). -12주 • Trabecular BMD: 용안육 추출물 저용량, 고용량군(G4, G5)에서 경계적 유의성 (p=0.07, p=0.08)을 보임. • Relative Change of Trabecular BMD: 용안육 추출물 저용량(G4) 군의 통계적 유의함이 확인됨 (p<0.05).	[Absolute Trabecular BMD(cm2)]  ***: p<0.001. vs G1. ; #: p<0.05. ##: p<0.01. ###: p<0.001. vs G2. Statistics by ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison Test [Relative Change of Trabecular BMD(%)]  *; p<0.05, **p<0.01 vs G2. Statics by T-test
CTx (Serum C-terminal cross-linking Telopeptide)	- 12주차 : 용안육 추출물(저용량)(G4) 섭취군에서 통계적 유의성이 관찰됨	[CTx]



*; p<0.05, **p<0.01 vs G2. Statics by T-test

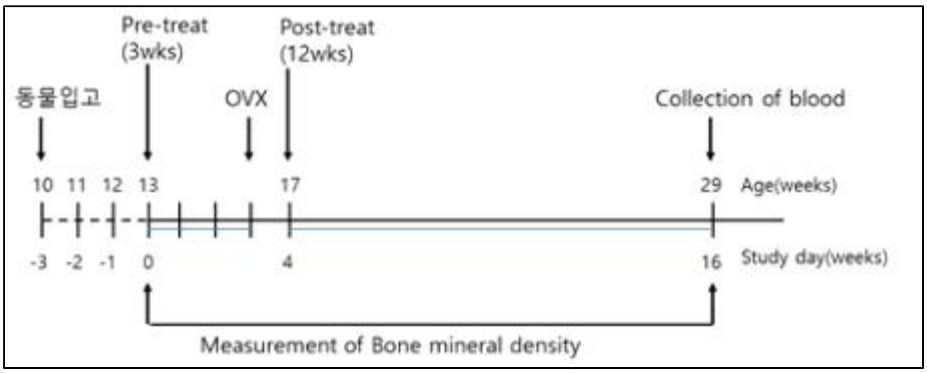
○ 결론

시험 6주차 및 12주차에 실시한 골밀도 측정결과에서 용안육 추출물(저용량) (G4) 및 상지 추출물 (G6)의 골밀도는 지속적으로 다른 시험군에 비해 증가하여 골밀도 감소 억제효능이 유지되는 것으로 사료되었으며, 골흡수 마커인 C-terminal Telopeptide(CT_X)에서도 용안육 추출물(저용량) (G4) > 양성대조군 (G3) > 상지 추출물 (G6) 섭취군의 순으로 감소하였으며, 그 중 **용안육 추출물(저용량) G4군의 경우 가장 낮은 골흡수 마커에 감소와 함께 유의한 변화 또한 관찰되었음**

결론적으로 본 시험 조건하에서 골밀도 및 CT_X결과 등을 고려하였을 때, 시판대조물질 Alendronate 0.5 mg/kg/day 투여군, 용안육 추출물 100 mg/kg/day 투여군 및 상지 추출물 50 mg/kg/day 투여군은 골밀도 감소 억제효능이 있으며, 이 중 **용안육 추출물(100 mg/kg/day) 투여군은 시판대조물질 다음으로 골다공증 개선에 효과가 있는 것으로 사료됨**

(2) 난소절제 랫드모델(Ovariectomized Rat)을 이용한 골다공증 예방 효력평가

난소절제 랫드(Ovariectomized Rat) 동물모델을 이용해 OVX 유발이전부터 3주간 선투여를 시작하여 골다공증 예방 동물효력시험을 진행하였음. 시험물질을 1일 1회, 15주간 반복 경구투여하여 골밀도(bon mineral density, BMD)를 측정해 시험물질의 골다공증 예방 및 개선효과를 비교・평가하였음



[그림] 효력평가 시험계획 scheme

○ 시험 정보

① 시험동물

- 시험종: Rat(*Rattus norvegicus*) / Koreatech
- 시험계통: Sprague-Dawley Rat 특정병원체 부재동물(SPF)
- 시험개시 시 주령: 10주령

② 사육환경 조건

- 온습도 범위: 22 ± 2 ℃, 50 ± 15 % (상대습도)
- 조명시간 및 조도: 12 시간 점등(조명시간: 07:00～19:00), 조도 150～300 Lux
- 사료 및 음수: 자율배식 (난소 적출 전날 16시간 절식)

③ 시험방법

- 동물입수 및 순화 → 군분리 → 골밀도 측정 → 선투여→ 난소절제 → 투여 → 측정

④ 시험군 구성 및 투여용량

시험군	시험동물	시험처치	투여용량 (mg/kg/day/day)	투여농도 (mg/day)	동물 수
					암컷
G1	Sham Control	Vehicle (Purified Water)	0	0	6
G2	Ovariectomized SD Rat	Vehicle (Purified Water)	0	0	6
G3		Alendronate(대조군)	0.5	0.11	8
G4		용안육 추출물(저용량)	250	55	8
G5		용안육 추출물(고용량)	500	110	8
G6		용안육·상지 추출물	500	110	8

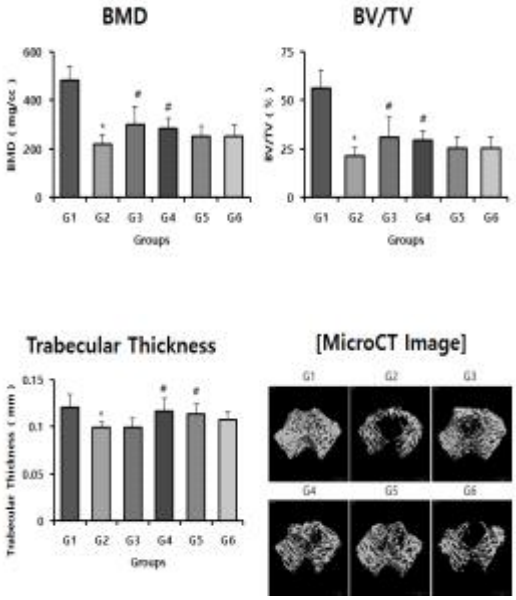
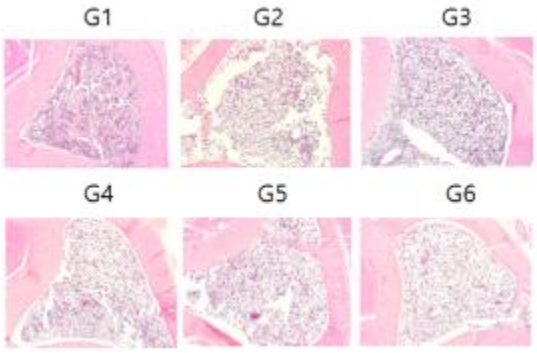
※ 투여경로는 임상 적용경로가 경구임을 고려하여 경구 투여로 실시함

⑤ 관찰항목

- 사망여부, 일반증상 관찰, 체중측정, 혈액생화학 분석, 골밀도 및 골면적 측정, 조직병리학적 검사
- 통계처리

○ 시험결과

시험항목	시험결과	비고
사망여부/ 일반증상	시험기간 동안 사망동물 및 일반증상은 관찰되지 않음	-
체중변화	시험물질에 의한 체중변화 크게 관찰되지 않음	-

골밀도 및 골면적 측정 (BMD)	-15주차 • sham군(G1) 대비 대조군(G2)의 수치가 유의하게 감소됨. • BMD: Alendronate 투여군(G3)과 용안육 250mg/kg 투여군(G4)에서 대조군과 비교하여 유의한 증가 관찰됨. • Bv/Tv분석*: Alendronate 투여군(G3), 용안육 250mg/kg 투여군(G4군)에서 음성 대조군 대비 유의한 차이의 증가가 관찰됨, • Trabecular thickness 분석: 용안육 250mg/kg(G4), 500mg/kg (G5) 투여군에서 음성 대조군 대비하여 통계적 유의성 확인함.	 ANOVA, Fisher's PLSD post-hoc tests: G1 vs G2 *; p<0.05, G2 vs G3~G6 #; p<0.05
Histology**	• Sham(G1)군은 trabecular bone, cortical bone의 형태와 marrow 분포, 구성에 큰 이상소견이 없음. • 음성 대조군(G2)의 세부 bone과 marrow 분포에 손상이 있음. • 용안육 250mg/kg 투여군(G4)이 손상된 정도가 경감된 것으로 판단.	

***VOI bone부위에서의 표면적 비율**
****조직병리분석: 좌측 하지 경골(tibia) 조직을 H&E 염색 후 병리분석.**

○ 결론

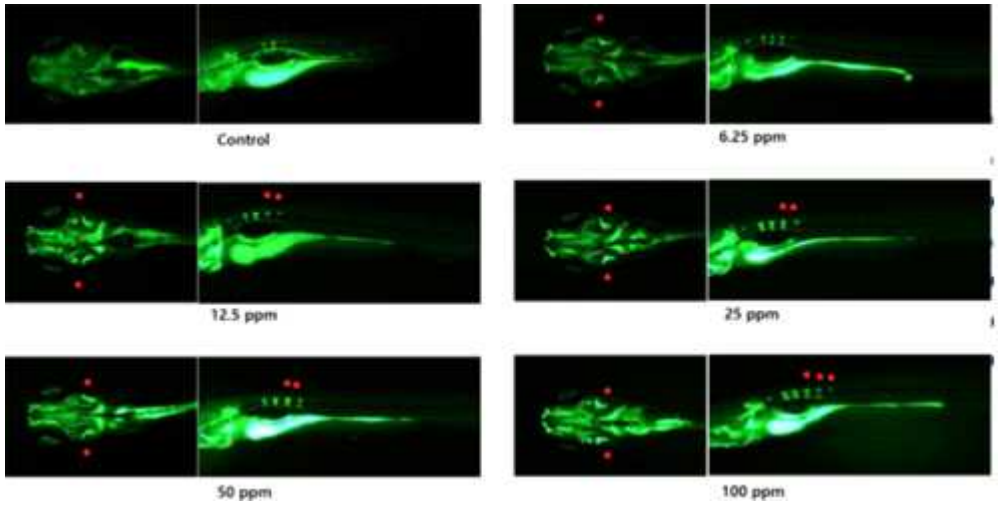
시험 15주차에 실시한 골밀도 측정결과에서 용안육 추출물 저용량군(G4)에서 골밀도(BMD)의 유의한 증가가 관찰되었으며, BV/TV 분석 결과도 용안육 추출물 저용량군(G4)에서 음성 대조군 대비 유의한 차이의 증가가 관찰되었고, Trabecular thickness 또한 용안육 추출물 저용량(G4), 고용량(G5) 투여군 모두에서 그 두께가 증가하여 음성 대조군 대비하여 통계적 유의성이 관찰되었음. 조직병리분석 또한 용안육 추출물 저용량군(G4)에서 조직손상 정도가 경감된 것으로 판단됨.

이상의 종합적인 결과, OVX surgery를 이용한 골다공증 질환 예방 동물에서 시험물질 투여로 인한 질환 개선 정도에서 골밀도, BV/TV, Trabecular thickness, 및 Histology 결과 등을 고려하였을 때, 음성대조군과 비교하여 시험 물질 용안육 추출물 저용량군(250mg/kg)에서 골다공증 예방 및 개선에 효과가 있는 것으로 사료됨

본 시험을 진행함에 있어, 대조군으로써 현재 골다공증 치료약으로 사용되고 있는 Alendronate를 이용하여 효능을 비교 평가하였다. Ovariectomized rat 모델을 이용하였으며, 폐경기 여성의 골다공증 완화를 목적으로 그 효능을 평가하기 위하여는 Estradiol을 대조군으로써 비교해야할 필요성이 있으며, 이는 임상기간 중에 개별인정형 건강기능식품 인정과 관련하여 식약처와 관련 면담을 진행할 예정으로, 논의 결과에 따라 Estradiol을 포함한 동물시험을 추가적으로 진행 할 계획임.

(3) 제브라피쉬를 이용한 후보 원료소재의 효력평가

○ 용안육 열수추출물에 골형성 촉진 및 저해 영향 평가 (Bone formation test)

항목	내용
시험방법	① 발생 후 3일째 제브라피쉬 배아를 12-well plate에 각각 5 개체씩 넣는다. ② 용안육 열수추출물을 Egg water로 희석하여 처리하고 28℃ 배양기에 넣는다. - 시험물질 노출 농도: 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppm ③ 6일 동안 인큐베이터에서 노출을 실시하며 시험물질은 매일 교체하여 준다. ④ 6일 후, zebrafish embryo는 immersion solutions (2 g/L of calcein powder in water)으로 15분 동안 staining 한 뒤, Egg water로 10min씩 3회 wash 한다 ⑤ Tricaine (MS-222)으로 마취시킨 후, 3% methyl cellulose에 고정하여 형광현미경을 통해 뼈의 형성정도를 측정한다.
시험결과	 용안육 열수추출물을 처리한 배아에서 정상군과 비교하여 농도 의존적으로 머리 부분의 뼈 형태가 더욱 뚜렷해지고 선명해지며, 꼬리와 체절의 형성 또한 증가된 것을 확인 할 수 있었음. 이를 통하여 용안육에 의하여 제브라피쉬 배아에서의 골 형성이 촉진되는 것을 확인함

- Egg water : sea salt 0.6 g/L (Cat. # S9883, SIGMA)
- Tricaine : Tricaine 4 g/L (pH 7) (Cat. # A5040, FLUKA)
- 3% Methyl cellulose : Methyl cellulose 30 g/L (Cat. # M0555, SIGMA)

○ 결론

용안육 열수추출물은 골형성에 효과적인 천연물 추출물로써 골건강 개선 건강기능식품 원료로 사용하기에 적합한 것으로 판단하였음

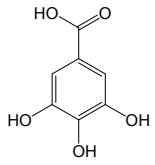
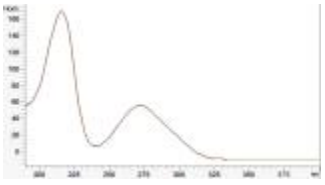
다. 허가자료 준비

(1) IRB 승인자료 구비

용안육 열수추출물을 이용한 골건강 개선 기능성원료인정을 위해 완제를 생산하였고, 원료 및 완제에 CMC 패키지를 구축하였음
인체적용시험 승인을 위한 IRB 심사자료를 작성하여 고려대학교구로병원에서 1차 IRB 심의를 마친 상태이며, 보안사항을 검토하여 9월 초 2차 심의를 통해 최종 인체적용시험 승인을 통과할 예정임

(2) CMC(Chemistry, Manufacturing and Controls, CMC) 패키지 구축

골건강 개선 건강기능식품 개발을 위한 CMC 패키지를 구축하였음

<table>
<tr><th>항목</th><th>내용</th></tr>
<tr><td>물리/
화학적</td><td>
<table>
<tr><th>지표성분 정보</th><th>구조</th><th>UV spectrum</th></tr>
<tr><td>· 성분명 : gallic acid
· CAS No : 149-91-7
· 성상 : white powder
· 분자식 : $C_7H_6O_5$
· 분자량 : 170.1 g/mol</td><td>  </td><td>  </td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>제조
공정</td><td>
<table>
<tr><th>공정명</th><th>내용</th></tr>
<tr><td>원료칭량</td><td>① 생약 칭량 : 용안육 칭량
② 용매 칭량 : 원재료 중량부에 5 배수(w/v)의 정제수를 칭량</td></tr>
<tr><td>1차 추출</td><td>원재료 중량 대비 5 배수의 정제수를 넣고 100±2℃에서 2 시간 환류 추출</td></tr>
<tr><td>여과</td><td>추출액을 10 ㎛ 이하의 페이퍼 필터를 사용하여 여과</td></tr>
<tr><td>2차 추출</td><td>잔사에 원재료 중량 대비 5 배수의 정제수를 넣고 100±2℃에서 2 시간 환류 추출</td></tr>
<tr><td>여과</td><td>추출액을 10 ㎛ 이하의 필터를 사용하여 여과</td></tr>
<tr><td>농축</td><td>1차, 2차 여과액을 모아 40~80 ℃ 에서 감압농축</td></tr>
<tr><td>건조</td><td>동결건조</td></tr>
</table>
</td></tr>
</table>

기준/규격	공정명		원료 기준 및 규격	공정명		완제 기준 및 규격
	성상		분말이다.	성상		탁한 자줏빛 분홍색의 제피정제로 이미, 이취가 없어야 한다.
	건조감량		6.2~9.4% 이내	붕해도		30분 이내
	중금속	총비소	1 mg/kg 이하	중금속	총비소	1 mg/kg 이하
		납	1 mg/kg 이하		납	1 mg/kg 이하
		카드뮴	0.5 mg/kg 이하		카드뮴	0.3 mg/kg 이하
		총수은	0.5 mg/kg 이하		총수은	0.5 mg/kg 이하
	미생물		대장균균 음성	미생물		총호기성미생물수(cfu/g) 5,000 이하 총진균수(cfu/g) 100 이하 특정세균 음성 (대장균군, 살모렐라, 대장균, 활색포도상구균)
	갈산함량(%)		0.004~0.006%	갈산함량 (%)		검액과 표준액의 주성분 피크의 유지시간은 일치한다. (0.003~0.005%)

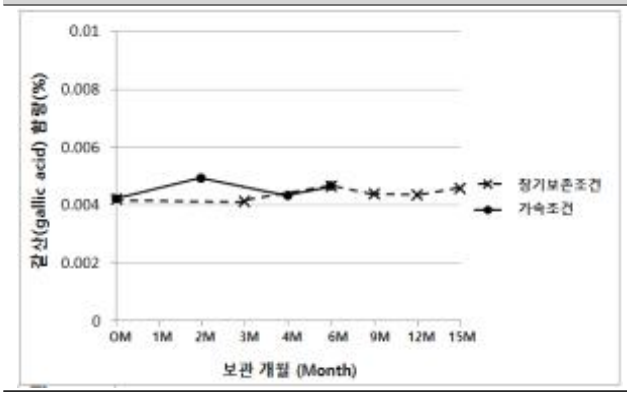
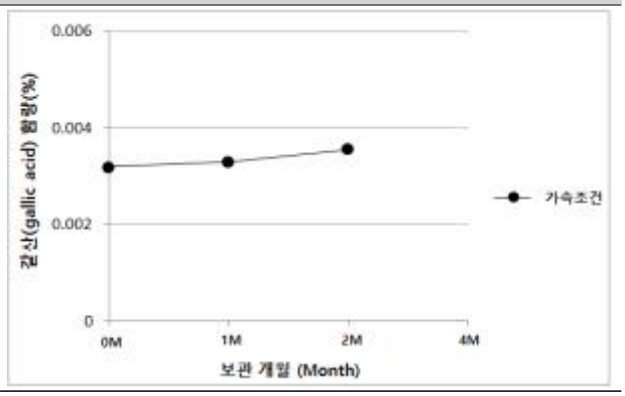
[표] 용안육 열수추출물의 CMC 패키지

(3) 안정성 평가

원료와 완제에 안정성을 평가하기 위해 보관 조건(장기보관조건, 가속보관조건)에 따라 일정시간 방치하였을 때, 지표성분 함량 변화를 관찰하였음. 시험결과 **원료는 최대 15개월, 완제는 최대 2개월간 보관하여도 안정함을 확인하였음**

보관 조건	보관 및 안정성 시험 계획	
	원료 (20150105-RN)	완제 (RN151103)
장기보존 조건 (25±5℃, 60±5% RH)	0, 3, 6, 9, 12, 15 개월	-
가속 조건 (40±5℃, 75±5% RH)	0, 2, 4, 6 개월	0, 2, 4, 6 개월

[표] 안정성시험 계획

원료 (20150105-RN)	완제 (RN151103)
	

×: 장기보존조건 함량 (25±5℃, 60±5% RH)

●: 가속조건 (40±5℃, 75±5% RH)

[표] 안정성시험 결과

(4) 안전성 평가

용안육 열수추출물에 대해 실시한 독성시험의 정보는 다음과 같음.

구분		시험물질	용량	결과
단회투여 독성시험		용안육 열수추출물	2000mg/kg 이상	개략의 치사량은 암수 각 2000mg/kg 이상
유전독성 시험	복귀돌연변이		5000μg/plate 이상	돌연변이 유발능은 음성
	염색체이상		5000μg/mL 이상	염색체이상 유발능은 음성

① 단회투여 독성시험 및 유전독성 시험

○ 시험방법

시험항목	시험방법
단회투여 독성시험	① 시험물질 0, 2000mg/kg을 암수 각각 5마리의 6주령 SD랫트에 단회경구투여. ② 투여 후 14일 동안 일반증상의 관찰 및 체중 측정을 실시. ③ 관찰기간 종료 시에 안락사하여 부검.
유전독성시험-복귀 돌연변이 시험	① 돌연변이 유발성을 평가하기 위해 히스티딘 요구성 살모넬라균 TA95, TA100, TA1535, TA1537 및 트립토판 요구성 대장균 WP2uvrA(pKM101) 을 이용하여 대사활성화 비존재하 및 존재하의 경우에 대하여 각각 평가를 실시. ② 용량설정시험을 위하여, 5,000 μg/plate을 최고용량으로 설정하고 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1 및 19.5 μg/plate를 설정. ③ 본시험 용량은 5,000 μg/plate을 최고용량으로 설정하고 이하 공비 2로 2,500, 1,250, 625, 및 313 μg/plate를 설정.

유전독성시험-염색체 이상 시험	① 염색체이상 유발 유무를 검토하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 실시. ② 용량설정시험을 위하여 5,000 μg/plate을 최고용량으로 하고 이하 공비 2로 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1 및 19.5 μg/plate를 설정. ③ 본시험의 용량은 단시간처리법의 대사활성화 존재하 및 비존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 최고용량을 5,000 μg/mL으로 설정하고, 이하 공비 2로 2,500, 1,250 μg/mL를 설정

○ 시험결과

시험항목	시험결과
단회투여 독성시험	• 암수 시험물질 투여군에서 사망례는 관찰되지 않음. • 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않음. • 용안육 열수추출물을 SD 랫트에 단회 경구 투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 각 2000mg/kg 을 상회하는 것으로 판단됨.
유전독성시험-복귀 돌연변이 시험	• 용량설정시험 결과, 시험물질에 의한 생육저해 및 침전은 대사활성화 비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않음. • 본시험 결과, 모든 용량의 시험물질의 복귀변이 콜로니수는 대사활성화 유무에 관계없이 음성대조군과 비교하여 2배 이상의 증가 및 생육저해는 관찰되지 않은반면, 양성대조군에서 복귀변이 콜로니수 증가 확인. • 용안육 열수추출물은 돌연변이 유발성에 대해 음성임을 확인하였음.
유전독성시험-염색체 이상 시험	• 용량결정시험결과, 단시간처리법의 대사활성화 존재하 및 비존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 모든 용량에서 세포독성 및 시험물질 침전이 관찰되지 않음. • 본시험에서, 단시간처리법의 대사활성화 존재하 및 비존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체이상 출현빈도는 5% 미만으로 음성대조군과 비교하여 통계학적 유의성 확인되지 않음. • 양성대조군에서는 구조이상 세포의 출현빈도가 10% 이상으로 유의성 확인. • 용안육 열수추출물은 염색체이상 유발성에 대해 음성임을 확인하였음.

② 제브라피쉬를 이용한 독성시험

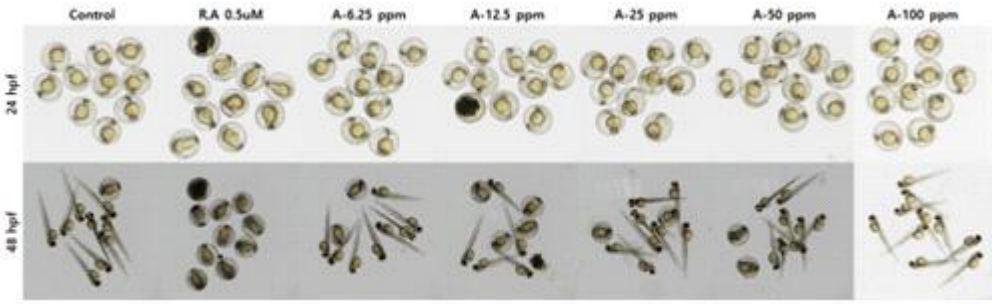
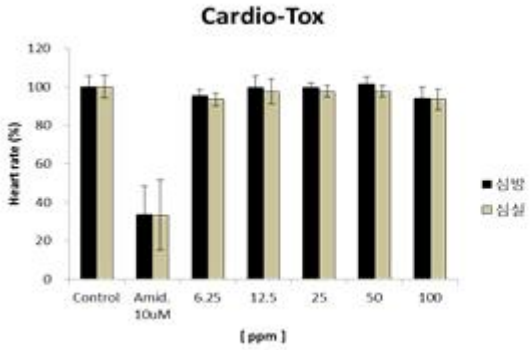
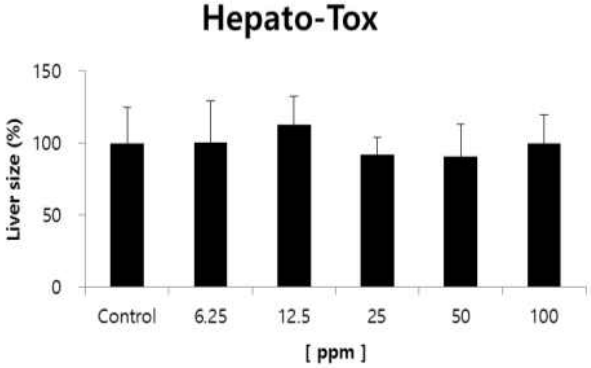
제브라피쉬는 척추동물로서 인간과 유전적으로 많은 공통점을 지니고 있으며 인간이 지니고 있는 대부분의 장기(심장, 간, 췌장, 신장, 흉선)를 지니고 있어 심혈관계, 근육계, 골형성, 신경계, 감각계, 생식계 등 인간에게 유발되는 거의 대부분의 질병분야 연구에 적용되어 독성평가 및 약효 평가에 대한 탁월한 이점을 가짐. 용안육 열수추출물에 대해 실시한 독성시험의 정보는 다음과 같음

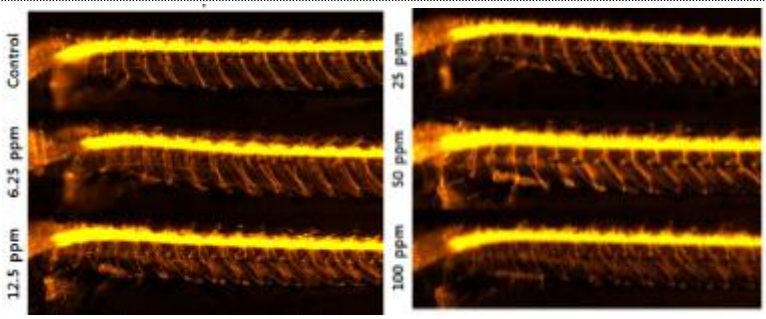
구분	시험물질	결과
발생독성	용안육 열수 추출물	전 농도에서는 치사, 기형 등 이상 발생 징후로 인한 발생독성 없음.
심장독성		전 농도에서 심장독성 없음
간독성		전 농도에서 간독성 없음
신경독성		전 농도에서 신경독성 없음

○ 시험방법

시험항목	시험방법
Terato Tox (발생 독성)	① 발생 후 4시간째 제브라피쉬 배아를 12-well plate에 각각 10 개체씩 넣음. ② Positive control과 용안육 열수추출물을 Egg water로 희석 처리하고 배양. - Positive control final Conc(Retinoic acid). 0.5μM - 시험물질농도: 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppm ③ 24시간 후, 배아를 관찰하여 응집여부, 꼬리의 분리 여부, 척추의 형성 여부, 기형 여부 등 관찰 ④ 약물을 교체해주고 28℃ 배양. ⑤ 수정 후 48시간째의 발생배를 tricaine (MS-222)으로 마취시킨 후, 현미경으로 지표들을 관찰하고 사진고, 특별한 defect를 나타내는 것이 있을 경우 융모막 (chorion)을 제거하고, 3% methyl cellulose에 고정하여 관찰.
Cardio Tox (심장 독성)	① 발생 후 3일째 제브라피쉬 배아를 12-well plate에 각각 5 개체씩 넣음. ② Positive control과 용안육 열수추출물을 Egg water로 희석 처리하고 배양. - Positive control final Conc. 10 μM - 시험물질 노출 농도: 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppm ③ 1.5시간 동안 인큐베이터에서 노출. ④ Tricaine (MS-222)으로 마취시킨 후, 3% methyl cellulose에 고정하여 심방과 심실의 심장박동수 측정.
Hepato Tox (간 독성)	① 발생 후 3일째 제브라피쉬 배아를 12-well plate에 각각 10 개체씩 넣음. ② 용안육 열수추출물을 Egg water로 희석하여 처리하고 28℃ 배양. - 시험물질 노출 농도: 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppm ③ 3일 동안 인큐베이터에서 노출하며, 시험물질은 매일 교체. ④ 3일 후, 발생배를 Tricaine (MS-222)으로 마취시킨 후, 3% methyl cellulose에 고정하여 형광현미경을 통해 간의 크기 측정.
Neuro-Tox (신경 독성)	① 발생 후 4시간째 제브라피쉬 배아를 12-well plate에 각각 10 개체씩 넣음. ② Positive control과 용안육 열수추출물을 Egg water로 희석 처리하고 배양. - 시험물질농도: 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppm ③ 24시간 마다 약물을 교체해주고 28℃ 배양. ④ 3일 후, 발생배를 tricaine(MS-222) 으로 마취시킨 뒤, 3% methyl cellulose에 고정하여 형광현미경으로 신경의 분화상태 관찰.

○ 시험결과

시험항목	시험결과
Terato Tox (발생 독성)	 Positive control (0.5 μM retinoic acid) 군에서 배발생이 제대로 이루어지지 않은 것과 비교하여, 용안육 열수추출물을 처리한 전 농도에서는 발생과정에서 발생할 수 있는 치사, 기형 등의 이상 발생 징후로 인한 독성 영향을 관찰할 수 없었음
Cardio Tox (심장 독성)	 Z19001-NET-Y 심방 심실 Heart rate (%) Mean ± SD Mean ± SD Control 100.0 ± 5.5 100.0 ± 5.8 Amiodarone 10uM 33.7 ± 14.6 33.3 ± 18.1 6.25 95.4 ± 3.0 93.4 ± 3.3 12.5 99.5 ± 6.0 97.5 ± 6.5 25 99.5 ± 2.6 97.5 ± 3.0 50 101.2 ± 3.9 97.6 ± 3.0 100 93.9 ± 5.9 93.4 ± 5.4 Positive control (10μM amiodarone) 군에서 심방, 심실의 심장박동수가 33%로 줄어든 것과 비교하여, 용안육 열수추출물을 처리한 전 농도에서는 심방과 심실의 박동수의 변화는 정상군과 큰 차이를 보이지 않아 심장 독성에의 영향을 관찰할 수 없었음
Hepato Tox (간 독성)	 용안육 열추출물을 처리한 전 농도에서의 간의 크기 변화는 정상군과 큰 차이를 보이지 않아 간에 대한 독성의 영향을 관찰할 수 없었음

Neuro-Tox (신경 독성)	 용안육 열수추출물에 대한 제브라피쉬의 신경독성평가 시험결과 시험물질의 노출에 의한 신경의 분화 저해 현상이 대조군과 비교하여 어떠한 신경세포의 생성에 대한 독성 영향도 관찰되지 않았음

○ 결론

용안육 열수추출물은 랫드 단회투여 독성 평가에 어떠한 독성에 영향이 없었으며, 복귀돌연변이, 염색체이상 유전독성 평가에서 또한 음성으로 확인되었음. 뿐만 아니라, **제브라피쉬 배아 모델을 이용한 발생독성, 심장독성, 간독성, 신경독성 평가에서 전 농도 음성으로 확인되어 용안육 열수추출물을 안전한 소재로 판단하였음**

(5) 임상시험 IRB 심사 접수

개발 원료에 인체적용시험을 위해 IRB 자료를 구비하였고, 2017.07.31. 인체적용시험을 위한 IRB 자료에 심의를 신청하였으며, 현재 1차 심의가 종료되었고 9월초 보완심사를 통해 인체적용시험 승인을 통과할 예정임

[그림] 인체적용시험 IRB 자료 심의신청 완료

- 용안육 추출물을 섭취한 동물 군에서 골밀도 감소 억제 효능이 확인되었으며, 비임상 독성시험에서 안전성 관련 자료가 확보되고, IRB 심의가 통과되었음

(6) 향후 연구 내용

① 인체적용시험
과제 종료 후, 인체적용시험을 실시하여 2018년 시험 완료를 목표로 하고 있음

② 표준화 연구
원재료의 산지별 특성과 추출물 및 제품 중의 지표성분에 대한 추가 연구를 실시하여 갈산 이외의 특이성이 확보된 성분에 대한 연구를 추가로 진행할 예정임. 특히 식약처 면담을 통해 원료 및 제품 물성과 관련된 가이드라인을 제시 받고 이에 충족하는 자료를 확보하고자 함

③ 효능 연구
in vitro 시험에서의 human osteoblast 계열의 Saos-2, human osteoblast primary cell을 이용한 ALP, mineralization, gene-expression 확인과, human osteoclast 계열의 Human Osteoclast Precursor Cells, human PBMC(human peripheral blood mononuclear cells)을 이용한 TRAP, gene-expression 및 작용기전 연구를 추가적으로 진행할 계획이며 in vivo 시험의 경우 Ovariectomized rat 모델에서 에스트로겐과의 비교 평가를 통해 이에 대한 자료를 확보할 예정임. 특히 식약처 면담을 통해 확보 또는 추가 확보하고자 하는 자료에 대한 관련된 가이드라인을 제시 받고 이에 충족하는 자료를 확보하고자 함

④ 특허 확보 방안
현재 등록 특허인 “용안육 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물” 이외에 용안육과 상지 복합물에 대한 특허 출원을 준비 중에 있음

④ 개별인정형 건강기능식품 인정
상기에서 언급한 개별인정형 건강기능식품으로 식약처 허가 신청에 필요한 유효성, 제조, 품질관리 서류 등을 준비하여 2019년 식약처 허가 획득을 목표로 하고 있음

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06

4-1. 목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
골형성 촉진 활성 및 골흡수 억제 활성을 갖는 신규 생약소재 탐색 연구	30	100	○ 골형성 촉진 및 골흡수 억제 활성 효능평가를 통하여 총 27종에 후보 생약소재 스크리닝 및 최종 생약소재를 선정완료 ○ 세포기반 조골세포 분화 작용기전 및 파골세포 분화 억제 작용기전 연구완료
신규 소재 추출물을 이용한 골 건강 및 골다공증 개선용 기능성 식품 소재 개발	25	100	○ 원재료에 표준화 관리 기준·규격 확립 및 모니터링 완료 ○ 신규 소재 최적 추출공정 확립 및 원료 파일럿 생산 완료 ○ 개발 원료에 제제연구 및 처방연구를 통해 완제개발 및 생산 완료 ○ 원료 및 완제에 기준·규격 확립 및 CMC 패키지 구축 완료
골다공증 동물모델 효력시험 및 독성시험 완료	25	100	○ 난소절제 랫드 동물모델에 대한 골다공증 치료·예방 효력평가 완료 ○ 제브라피쉬 동물모델에 대한 골형성 촉진 효력평가 완료 ○ 단회투여독성 외 6종(유전독성 2종, 발생독성, 심장독성, 간독성, 신경독성)에 시험으로 안전성 확보완료
골 건강 개선 인체효력시험 진행	20	100	○ 신규 소재 추출물을 이용한 인체적용시험 IRB 자료 구비완료 및 9월 IRB 심의통과 예상
합계	100	100	

4-2. 관련분야 기여도

(1) 기술적 측면

- 조골세포 분화 촉진 및 파골세포 저해활성을 갖는 천연 생약 추출 분획 탐색 기술 확보
- 신규 기능성 소재의 추출 공정 및 표준화 기술 확립
- 기존 치료제의 문제점을 해결한 안전한 기능성 골 건강(골다공증) 소재 개발

- 신규 작용기전의 골 건강 소재 개발로 골다공증과 노화로 인한 대사성 질환의 새로운 치료 요법의 가능성 확인
- 의약품 등 타 산업분야로 응용 가능

(2) 경제적·산업적 측면

- 기능성 식품 산업을 기반으로 nutraceuticals 및 의약 기술을 접목시킨 융합 기술 확립
- 경쟁력 있는 고부가가치의 생약 소재의 사업화 및 재배권장 자원의 실용화 사업으로 국내 농가 소득 증대 기여
- 미국 시장 진출을 통한 수입 대체 효과 및 외화 수입 증대 효과
- 골다공증 환자로 인한 사회적 비용을 줄임으로써 산업 발전의 기여가 가능

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07

□ 천연 생약 원료를 이용한 골건강 및 골다공증 개선 기능성 생약소재 추출물의 제조 및 효능평가 노하우 확보로 신제품 개발, 양산화 및 약효, 독성 데이터 확보

□ 고부가가치 기능성 핵심소재/ 완제품의 국내외 사업화로 매출창출

□ 골형성 증진 및 골흡수 억제의 이중 작용기작으로 경쟁력 향상

□ 신규 기능성 소재의 식약처 개별인정 획득.

□ 천연 소재 유래의 세포 분화 촉진 연구를 통해 골다공증 치료제 뿐 아니라 다양한 대사성 질환의 치료제 개발을 위한 라이브러리 구축 가능.

□ 건강기능식품 제품 외 해외 nutraceuticals 제품 및 향후 골다공증 개선 천연물 의약품 시장으로 확장 가능.

□ 사업화 계획

- 용안육 추출물을 섭취한 동물 군에서 골밀도 감소 억제 효능이 확인되었으며, 비임상 독성시험에서 안전성 관련 자료가 확보된 상태임
- 과제 종료 후, 허가용 인체적용시험을 실시하여 식약처 허가 신청에 필요한 유효성, 제조, 품질관리 서류 등을 준비하여 2018년 식약처 허가 획득을 목표로 하고 있음.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 : 해당사항 없음

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09

일반과제

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황
: 해당사항 없음

코드번호					D-10			
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11

「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 의하여 연구실 안전관리규정을 제정하여 연구실의 안전에 관한 기준을 확립하고 안전사고방지 및 최소화에 최선을 다하였음.

가. 기술적 위험요소 분석

(1) 연구실 안전점검 실시

(가) 일상점검

① 점검자 : 해당 연구실의 안전관리담당자

② 점검시기 : 업무일마다 연구활동 시작 전 실시

③ 연구실 이상 유무 확인 점검 및 미비사항 기록 보관

(나) 정기점검과 정밀안전진단

① 정기점검 : 1년 1회 이상 실시

② 정밀안전진단 : 2년 1회 이상 실시

③ 2016년 5월 10일 정밀안전진단 실시(외부전문기관 안전환경원 대행)

(2) 사전유해인자 위험분석

(가) 담당자 : 연구실책임자

(나) 국가연구안전정보시스템의 사전유해인자위험분석 보고서 작성 tool 사용

(3) 작업환경측정 : 작업장 내 유해인자 노출도 확인

나. 안전관리대책

(1) 연구실 안전관리규정 및 조직체계 구성

(가) 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 의한 안전관리규정 작성 및 게시

(나) 연구실 안전관리위원회 구성

① 연구실 안전점검 및 정밀안전진단의 실시계획 수립 및 실시

② 연구실 사고 발생의 원인조사 및 안전관리 현황 관리 등

(2) 연구 활동 종사자의 안전 교육

(가) 정기교육

① 교육대상 : 연구활동 종사자

② 교육시간 : 반기별 6시간 이상 실시

③ 교육방식 : 집체 또는 온라인 교육

(나) 신규교육

① 교육대상 : 신규 채용된 연구활동 종사자

② 교육시간 : 반기별 8시간 이상

③ 교육방식 : 집체 교육

(다) 안전교육일지(규정 내 별지3호)를 작성하여 전자문서와 출력물 형태로 관리

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

코드번호	D-12

번호	구분(논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/특허등록국가	Impact Factor	논문게재일/특허등록일	사사 여부	특기사항(SCI여부/인용횟수 등)
1	특허	용안육 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	㈜내츄럴엔도텍	출원인	PCT	-	2015.04.03	-	출원
2	특허	용안육 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	㈜내츄럴엔도텍	출원인	대한민국	-	2015.03.27	-	출원
3	특허	용안육 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	㈜내츄럴엔도텍	출원인	대한민국	-	2017.01.17	-	등록
4	논문	CGK-211, a Novel Carbazole Derivative, Suppresses Canonical Wnt Signaling by Promoting β-Catenin Degradation	국민대학교(김혜진외2인)		BULLETIN OF THE KOREAN CHEMICAL SOCIETY	0.835	2015.03.11		SCI
5	논문	Longan (Dimocarpus longan Lour.) Fruit Extract 1 Stimulates Osteoblast Differentiation via Erk1/2-Dependent RUNX2 Activation	국민대학교(박서영외3인)		Journal of Microbiology and Biotechnology	1.685	2016.03.14		SCI
6	논문	Smenospongidine suppresses the proliferation of multiple myeloma cells by promoting CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein-mediated β-catenin degradation	국민대학교(박서영외5인)		Archives of pharmacal research	-	2017.04.08		SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13

해당사항 없음

12. 참고문헌

코드번호	D-14

1) 대한민국약전, 11개정
2) 한국전통지식포털사이트, 동의보감
3) 한약재관능검사 지침, 식품의약품안전처
4) Bao Yanga et al. Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (Dimocarpus longan Lour.) fruit – A review. *Food Research International*. 44(2010), pp. 1837-1842
5) Jin-yu Chena et al., 2015. Structural elucidation and antioxidant activity evaluation of key phenolic compounds isolated from longan (Dimocarpus longan Lour.) seeds., *Journal of Functional Foods*, 17(2015), pp. 872-880.
6) Ref. Journal of Chromatography A. 1085(2): 270~277 (2005)
7) K.NP et al, antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan fruit pericarp., *J sciencedirect*. 10(2009), pp. 413-419
8) 한약(생약)제제의 성분프로파일 설정 가이드라인, 식품의약품안전처, 2016
9) 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정, 식품의약품안전처, 2013
10) 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가인드라인 해설서, 식약처, 2015.12
11) 생약종합정보시스템, 식품의약품안전평가원
12) 식품안전나라, 식품안전정보포털
13) 現代生藥學, 學窓社, 생약연구회, 2004
14) 약용식물학, 학창사, 한국약용식물학연구회, 2003
15) Rob L. Dean. (2002) Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations. *BMBE, Vol.30, No.6, 401-407*
16) Gao J, Liu Q, Liu X, Ji C, Qu S, et al. (2014) Cyclin G2 Suppresses Estrogen-Mediated Osteogenesis through Inhibition of Wnt/b-Catenin Signaling. *PLoS ONE 9(3): e89884. doi:10.1371/journal.pone.0089884*
17) Abnova, Alkaline Phosphatase Assay Kit *(Cat. KA1642, 250 assays, Version: 02)*
18) Enzymatic Assay of PHOSPHATASE, ALKALINE1 (EC 3.1.3.1) Glycine Assay
19) Seon-Yle Ko (2010) Luteolin Induces the Differentiation of Osteoblasts *IJOB, 35(3), 99~106*
20) Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages.
21) Anti-inflammatory Effect of Salvia officinalis L. Extract, Eun-A Hyun, 2013
22) Korean J. Medicinal Crop Sci.) 22(2) : 98 – 104 (2014), H, K, Jung et al.
23) Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y., 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J. Agric. Food Chem. 50, 3713 - 3717.
24) Boxin Ou, Maureen Hampsch-Woodill, Ronald L. Prior (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absobance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. J. Agric Food Chem. 49, 4619-4626.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">골형성 촉진작용을 갖는 골 건강(골다공증)개선 기능성 식품 소재 개발</td></tr>
<tr><td colspan="5">Development of functional food for improving bone health using bone anabolic natural resources</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">㈜내츄럴엔도텍</td><td rowspan="2">주 관 연 구
책 임 자</td><td colspan="2">(소속) ㈜내츄럴엔도텍</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2"></td><td colspan="2">(성명) 이용욱</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비

(801,000천원)</td><td>계</td><td>801,000천원</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2014. 8. 01 ~ 2017. 7. 31 (3년 월)</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>600,000천원</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>28명</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>201,000천원</td><td>내부인원</td><td>28명</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td></td><td>외부인원</td><td></td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 성과

골다공증은 가벼운 충격에도 골절이 일어나 삶의 질을 현저히 저하시켜, 급속한 노령화 시대에 골건강을 유지하기 위한 노력은 더욱 중요성이 커지고 있다. 현재까지 이루어진 골다공증 치료제의 대부분은 골분해(흡수) 억제제로 골다공증의 진행을 예방하는 수준이며, 골형성 촉진 기능을 갖는 파라티로이드호르몬(PTH) 제제의 경우는 호르몬이라는 한계가 있다. 이러한 이유로 본 과제에서는 현재 사용 중인 치료제의 여러 단점들을 극복하기 위하여, 골형성 촉진작용과 골소실 억제 기능성이 뛰어나며 안전성이 확보되어 부작용이 최소화된 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재를 개발하는 것을 목표로 다음과 같은 연구를 진행하였다. 동물 모델을 이용한 비임상 효력시험을 통해 최종 후보물질의 효능을 확인하였으며, 후보소재의 안전성을 평가하기 위한 다양한 독성시험에서 안전성을 확보하였다. 또한 개발 소재의 표준화 및 품질관리 기준을 설정하였으며 시제품의 제형을 결정하고 개발제품에 대한 안정성 시험을 진행하였다. 개발소재의 용도 특허출원/등록 및 학술지 투고를 통하여 과학적 근거자료를 마련하였다.

○ 연구내용 및 결과

1. 개발 소재의 품질관리설정 및 표준화 (물질특성, 효능평가 및 작용기전 연구 등)

- 생약원료 선정구매/ 탐색평가용 시료제조
- 시작품의 제품화 연구 및 활용기술개발
- in vitro 효능평가: 조골세포 분화 촉진, 파골세포 분화 억제 활성평가
- 조골세포분화 유도 작용기전 연구
- 파골세포분화 억제 작용기전 연구

2. 원재료 제조 및 기준 · 규격 설정

- 최종 추출공정 확립
- 원료 기준 및 규격 확립
- 완제 제조 및 기준 · 규격 설정

3. 비임상 효력시험 완료

- 난소절제 랫드모델을 이용한 골다공증 치료 효력시험
- 난소절제 랫드모델을 이용한 골다공증 예방 효력시험
- 제브라피쉬 모델을 이용한 골형성 효력시험

4. 허가자료 준비

- IRB 제출 자료 구비
- CMC 패키지 구축
- 원료 및 완제 안정성 평가
- 비임상 독성시험 안전성 평가(단회경구투여, 복귀돌연변이, 염색체이상시험, 제브라피쉬모델을 이용한 발생, 심장, 간, 신경독성)
- 임상시험 IRB 심사 접수(고려대학교 구로병원 IRB 심의 진행 중임)

5. 개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표(과학적 근거자료 마련)

- 발굴소재의 특허출원 2건 /등록 1건
- 학술지 게제 3건 완료

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 골건강 및 골다공증 개선 기능성 생약소재 추출물의 제조 및 효능평가 노하우 확보로 신제품 개발
- 고부가가치 기능성 핵심소재 원료/완제품의 국내외 사업화로 매출창출
- 골형성 증진 및 골흡수 억제의 이중작용기작으로 골관련 제품의 경쟁력 향상
- 의약품 등 타 산업분야로 응용확대
- 임상시험을 위한 신뢰성 있는 독성학적 기초자료를 확보함으로써, 의약외품 IND에 필요한 근거자료 제공
- 국내산 고품질 식품생약조달 및 재배권장 자원의 실용화 사업으로 농민 소득증대 기여

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

				코드번호	D-15
		과제번호			114030-3
사업구분	고부가가치식품기술개발 사업				
연구분야	-			과제구분	단위
사 업 명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	-			총괄책임자	-
과 제 명	골형성 촉진작용을 갖는 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	㈜내츄럴엔도텍			연구책임자	이용욱
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014. 8. 01 - 2015. 7. 31	200,000	67,000	267,400
	2차년도	2015. 8. 01 - 2016. 7. 31	200,000	67,000	267,400
	3차년도	2016. 8. 01 - 2017. 7. 31	200,000	67,000	267,400
	계	2014. 8. 01 - 2017. 7. 31	600,000	201,000	801,000
	참여기업				
	상 대 국		상대국연구기관		
참여기업					
상 대 국			상대국연구기관		

2. 평가일 : 2017년 9월 13일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
㈜내츄럴엔도텍	연구이사	이용욱

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	이용욱

Ⅰ. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 아주우수 ○ 실적 : 골형성 촉진 및 골흡수 억제 활성평가를 통해 천연물 원료 및 완제 개발 완료하였고, 랫드 및 제브라피쉬 모델을 이용한 골다공증 예방·치료 효력평가로 개발 원료에 골건강 개선 효력을 검증하였음. 개발 소재에 안전성 및 CMC 패키지 구축을 완료하였으며 제브라피쉬를 이용한 효력평가 및 독성평가는 기존 랫드 동물모델을 이용한 평가에 비하여 높은 개체수와 짧은 시험기간으로 유의성 있는 결과를 도출하였기에 우수한 연구결과와 창의성 높은 연구를 도래하였다 사료됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 우수 ○ 실적 : 본 연구를 통해 천연 신규소재에 골 건강 개선 활성을 mechanism 수준에서 증명하였고, 신규 소재에 활성분획을 밝혀내어 골 건강 개선효능에 대한 과학적 근거를 구축하였음. 또한 의약품으로써 개발 가능성이 높은 소재 확보에 성공하였음. 본 연구를 통해 구축된 골형성 촉진 활성과 골흡수 억제 활성 평가법은 나아가 동물, 광물 및 해양식물까지 그 연구에 범위를 확대하여 골 건강에 효과적인 소재를 탐색할 수 있다는 점에서 사회적으로 큰 의의를 지님.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 우수 ○ 실적 : 골 건강에 효과적인 천연 원료 및 완제품 개발을 완료하여 인체적용시험 완료 후 관절·뼈 건강에 도움을 줄 수 있는 ‘개별인정형’ 건강기능식품원료로 개발이 가능할 것으로 판단되어짐. 지속적인 소재 탐색 및 발굴로 개발 원료에 시너지 효과를 줄 수 있는 소재를 연구하고 골 건강과 관련된 건강기능식품 및 의약품 개발에 높은 가능성을 예상함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 아주우수 ○ 실적 : 골 건강에 효과를 줄 수 있는 천연물 소재개발을 위해 활성 및 효력평가에 초점을 맞추어 연구를 진행하였으며, 골형성 촉진 및 골흡수 억제 활성 평가법 set-up에 성공하였음. 27종에 후보 소재 중 최적에 신소재를 탐색·발굴하였음. 난소절제 랫드 및 제브라피쉬 동물모델을 이용한 안전성과 유효성 확보로 개발 소재에 대한 개별인정형 건강기능식품원료화를 위해 CMC 패키지 구축과 인체적용시험 IRB 자료심의 신청을 완료하였음.

5. 공개 발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 아주우수 ○ 실적 : 2건에 특허출원, 1건에 특허 등록, 2건에 고용창출, 3건에 학술지 게제, 7건에 학술발표, 2건에 전시회 참석을 완료하여 최초 목표를 모두 달성하였음.

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
골형성 촉진 활성 및 골흡수 억제 활성을 갖는 신규 생약소재 탐색 연구	30	100	○ 조골세포 분화 촉진 활성평가 및 파골세포 분화 억제 활성평가를 통한 신규 생약소재 탐색・선정 완료
신규 소재 추출물을 이용한 골 건강 및 골다공증 개선용 기능성 식품소재 개발	25	100	○ 신규 소재 추출물의 최적 추출공정 확립 및 원료의 파일럿 생산 완료. 원료의 제제화 연구 및 처방연구를 통한 완제 개발 완료. ○ 신규 소재 CMC 패키지 구비 및 안정성 시험 완료.
골다공증 동물모델 효력시험 및 독성평가 완료	30	100	○ 난소절제 랫드 및 제브라피쉬 동물모델을 이용한 골 건강 개선 효력평가 완료 ○ 단회투여 독성시험 외 6종(유전독성 2종, 발생독성, 심장독성, 간독성, 신경독성)에 독성시험 완료
인체 효력 시험 진행 (개별인정 가이드라인)	15	100	○ 신규 소재 추출물을 이용한 IRB 자료 구비 완료 및 9월 중 인체적용시험 심의 통과 예정
합계	100점	100	

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

골형성 촉진 활성평가 및 골흡수 억제 활성평가를 통해 27종의 생약소재에 활성을 평가하여 신규 소재를 선정하였으며, 원재료에 기준·규격 설정 및 모니터링을 통해 원재료 단계부터 표준화된 관리 기준을 마련하였음. 최적 제조공정 확립과 제제연구를 통해 골 건강 개선에 효과적인 원료 및 완제 개발에 성공하였으며 기능성 식품 소재 개발을 위한 CMC 패키지 및 안정성을 확보하였음. 난소절제 랫드와 제브라피쉬 동물모델을 이용한 유효성 및 안전성 확보에 성공하였으며, 개발 소재에 인체적용시험을 앞두고 있음. 이후 개별인정형 건강기능식품 소재로써 다양한 제품으로 골 건강 개선 건강기능식품을 출시 할 예정임

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 골 건강 개선 기능성 식품 소재 개발을 최종목표로 진행되었음. 연구결과를 바탕으로 현재 인제척용시험을 위한 IRB 서류심사에 진행 중이며, 9월 보완 심사를 거쳐 9월 중순 인체적용시험에 돌입할 예정임

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

인체적용시험 완료 후 개별인정형 건강기능식품으로 용안육 열수추출물을 신청할 예정이며, 본 연구를 통해 구축한 골형성 촉진 활성평가 및 골흡수 억제 활성평가를 이용해 추가적 생약소재를 탐색하여 개발 신규 소재에 시너지 효과가 기대되는 후보소재를 추가적으로 탐색하여 골 건강 개선 건강기능식품을 개발할 예정임

Ⅳ. 보안성 검토

해당사항 없음: 일반과제로 진행

※ *보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.*

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	☑자유응모과제 □지정공모과제	분 야	
연 구 과 제 명	골형성 촉진작용을 갖는 골 건강(골다공증) 개선 기능성 식품 소재 개발		
주관연구기관	㈜내츄럴엔도텍	주관연구책임자	이용욱
연 구 개 발 비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	600,000	201,000		801,000
연구개발기간	2014. 8. 01 ~ 2017. 7. 31			
주요활용유형	☑산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
골형성 촉진 활성 및 골흡수 억제 활성을 갖는 신규 생약소재 탐색 연구	- 27종 생약에 대한 조골세포 분화촉진 및 파골세포 분화억제 활성평가 완료 - 조골세포 분화촉진 및 파골세포 분화억제 활성기전 규명 - 최적의 후보 생약소재 3종(상지, 양강, 용안육) 선별
신규 소재 추출물을 이용한 골 건강 및 골다공증 개선용 기능성 식품소재 개발	- 골건강 개선 관련 in vitro, in vivo 및 이화학적 평가를 통해 최종 후보 원재료(용안육) 선정 - 신규 소재추출물에 최적 추출공정 확립 및 scale-up 생산을 통해 제조공정에 적합성/재현성 평가완료 - 원료에 파일럿 생산완료 및 제제화 연구/ 처방연구를 통한 완제개발, 기준·규격 확립 (원료/완제) - CMC(chemistry, manufacturing and controls) 패키지 구비 완료 및 안정성 확보
골다공증 동물모델 효력시험 및 독성평가 완료	- 난소절제 랫드 및 제브라피쉬 동물모델을 이용한 골다공증 예방 및 치료 효력평가 완료 - 7종(단회투여독성, 유전독성 2종, 발생독성, 심장독성, 간독성, 신경독성) 독성시험 완료 및 안전성 확보
인체 효력 시험 진행 (개별인정 가이드라인)	- 신규 소재 추출물을 이용한 IRB 자료 구비 완료 및 9월중 인체적용시험 심의 통과 예정

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치																				
최종목표	2								2			2			6				2	
연구기간내 달성실적	2	1							2			3			7		1		2	
달성율(%)	100	100							100			120			120		100		100	

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	조골세포 분화 촉진활성을 가진 천연 무독성 식품생약 소재 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계최초	국내최초	외국기술복제	외국기술소화·흡수	외국기술개선·개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①의 기술		v				v	v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	생약소재를 이용한 골건강 개선 개별인정형 건강기능식품원료 인정 예정

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명			
가중치																				
최종목표	2	2		1		1			2			3			7				3	
연구기간 내 달성실적	2	1							2			3			7		1		2	
연구종료후 성과창출 계획		1		1		1													1	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함): **자체 제품화 예정**

핵심기술명[1]			
이전형태	□무상 □유상	기술료 예정액	천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기[3]	
기술이전시 선행조건[4]			

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품 기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품 기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.