

11-1543
000-001
715-01

국내 식물자원 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재 개발 및 산업화
최종 보고서

2017

농림축산식품부

생명산업기술개발사업 R&D Report

발간등록번호

11-154300-001715-01

국내 식물자원 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재 개발 및 산업화 최종보고서

2017. 04. 07.

주관연구기관 / 경희대학교
협동연구기관 / 가천대학교
동국대학교
메콕스큐어메드 (주)
한국건설생활환경시험연구원

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 식물자원 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재 개발 및 산업화”(개발기간 : 2011. 12. 26 ~ 2016. 12. 25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 02. 08.

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단
세부연구기관명 : 가천대학교 산학협력단

(대표자) 홍충선 (인)
(대표자) 황보택민 (인)



주관연구책임자 : 강 세 찬
세부연구책임자 : 송 윤 재

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 식물자원 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재 개발 및 산업화”(개발기간 : 2011. 12. 26 ~ 2016. 12. 25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 02. 08.

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

(대표자) 홍충선 (인)

협동연구기관명 : 동국대학교 산학협력단

(대표자) 이용규 (인)



주관연구책임자 : 강 세 찬

협동연구책임자 : 서 태 근

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 식물자원 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재 개발 및 산업화”(개발기간 : 2011. 12. 26 ~ 2016. 12. 25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

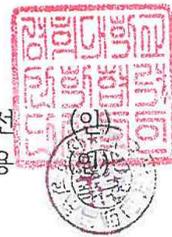
2017. 02. 08.

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

(대표자) 홍충선

협동연구기관명 : 메콕스큐어메드(주)

(대표자) 정재용



주관연구책임자 : 강 세 찬

협동연구책임자 : 정 재 용

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

2. 제출문

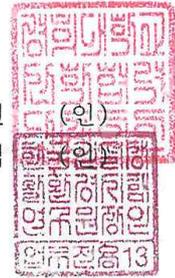
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 식물자원 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재 개발 및 산업화”(개발기간 : 2011. 12. 26 ~ 2016. 12. 25)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 02. 08.

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 홍충선 (인)
협동연구기관명 : 한국건설생활환경시험연구원 (대표자) 김경식



주관연구책임자 : 강 세 찬

협동연구책임자 : 이 진 규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	311063-5	해당단계 연구기간	2011. 12. 26 ~ 2016. 12. 25	단계구분	3/3
연구사업명	중사업명	농림수산식품 연구개발사업			
	세부사업명	생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	국내 식물자원 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재 개발 및 산업화			
	세부과제명	제1세부 : 허피스바이러스억제제 천연물신약 개발연구 제2세부 : 국내 자원식물 추출물을 이용한 신규 HCMV 및 EBV 억제제 발굴 및 기전분석 제1협동 : 국내 자원식물 추출물을 이용한 신규 HSV 억제제 발굴 및 기전 분석 제2협동 : IND 신청을 위한 천연물 신약 개발자료의 산출 및 승인 제3협동 : OECD 가이드라인 및 식약처 고시에 따른 독성시험자료 생산			
연구책임자	강세찬	해당단계 참여 연구원 수	총: 20명 내부: 11명 외부: 9명	해당단계 연구개발비	정부:500,000천원 민간:170,000천원 계:670,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 75명 내부: 20명 외부: 55명	총 연구개발비	정부:2,500,000천원 민간:850,000천원 계:3,350,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경희대학교 산학협력단			참여기업명 메콕스큐어메드(주) (주)한국파비스제약	
위탁연구	연구기관명: 고려대학교			연구책임자: 송문정	
요약 1. 바이러스 복제 및 재활성화 검출 시스템 구축을 통한 가이드라인 구축 2. 국내 식물자원 추출물로부터 허피스바이러스 억제 효과를 스크리닝하여 우수 소재 선별 - 담팔수, 낭독, 비쭈기나무 3. 선별된 후보물질들의 전임상 유효성 평가를 통한 효능 입증 및 작용기전 규명을 통한 과학적 자료 확보				보고서 면수: 168	

-
4. 담팔수의 유효성분 규명 및 지표성분 설정을 통한 규격설정 및 원료 표준화, 안정성 평가 완료 (완제 포함)
 5. 전임상 안전성 평가를 통한 독성 자료 확보
 6. 연구개발 자료 수집 및 임상프로토콜 개발을 통한 IND filing 완료, 임상시험 승인 신청 완료
-

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ■ 연구 목적 <ul style="list-style-type: none"> - 국내자원식물로부터 만성감염바이러스 제어기술 및 억제 소재 개발 ■ 연구 내용 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 자원식물 라이브러리 구축 및 항바이러스 소재 선별 - 단순포진, 성기포진, 대상포진 허피스바이러스에 대한 최적소재 선택 - 신규 HCMV 및 EBV 치료제 선도물질 개발 - HSV 복제 및 재활성화 검출 시스템 구축 및 항바이러스 작용기전 분석 - VZV (대상포진)바이러스 억제 작용기전 규명 - 제제/제형 설계, 임상프로토콜 작성 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ■ HSV, HCMV, EBV 복제 및 재활성화 검출 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - Real-time PCR, plaque assay, luciferase assay 등 screening 시스템 구축 ■ 국내자원식물 추출물을 이용한 항허피스바이러스 소재 선별 <ul style="list-style-type: none"> - 담팔수, 낭독, 비쭈기나무 추출물 선정 ■ 바이러스에 대한 후보물질의 작용기전 분석 <ul style="list-style-type: none"> - Immediate Early gene 발현 저해 효과 확인 ■ 원료표준공정 개발 및 안정성 평가 완료 ■ GLP 전임상 안전성 평가 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 단회, 4주/13주 반복투여 독성평가, 유전독성 ■ 임상프로토콜개발 및 IND filing 완료, 임상시험 신청 ■ 기술이전 완료 (선급기술료 5억 원; 경상기술료 3% (순매출액 대비)) 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 본 연구를 통해 확립된 활성 검색 시스템은 다양한 국내자원식물 추출물 및 화합물의 항바이러스 활성 검증을 위한 기초 기술로 활용할 수 있음 ■ 국내 자원식물 추출물 library를 활용하여 바이러스 감염에 대한 선택적이고 보다 강력한 억제 소재의 개발이 가능할 것으로 사료되며, 이로 인한 안전하면서 고효율을 나타내는 항바이러스제 개발이 가능함 					
중심어 (5개 이내)	허피스바이러스	천연물신약	자원식물	IND		

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호		D-02	
Purpose& Contents	Development of chronic infection virus control technology and inhibition material from domestic resource plants				
Results	1. Establishment of HSV, HCMV, EBV replication and reactivation detection system - Screening system such as real-time PCR, plaque assay, and luciferase assay 2. Selection of anti-herpes virus agents using domestic plant extracts - <i>Elaeocarpus sylvestris</i> var. <i>ellipticus</i> , <i>Euphorbia pallasii</i> Turcz. <i>Cleyera japonica</i> Thunb choice 3. Mechanism of action of natural products against viruses - Immediate Early gene inhibits viral replication by inhibiting expression 4. Development of standard process for raw materials and stability evaluation. 5. GLP single dose, 4 weeks / 13 weeks repeated dose toxicity assessment, safety pharmacology 6. Clinical protocol development, IND filing, application for clinical trial approval 7. IND supplementation				
Expected Contribution	It is possible to develop high value-added materials that prevent and treat these viral infections by developing a selective and more potent inhibitor against viral infections using the domestic resource plant extracts library. The active screening system established through this study will be utilized as the basic technology for verifying the antiviral activity of various domestic resource plant extracts and compounds.				
Keywords	Herpes virus	Natural medicine	Plant resources	IND	

6. 영문목차

1. Summary of research	9
2. Preliminary research for current research development	9
3. Contents and results of research	11
4. Objectives achievement and contribution of related fields	162
5. Application of research outcome	164
6. Collected international scientific & technical information in the research process	165
7. Security level of research achievement	166
8. Current research facilities and equipments	166
9. Results of laboratory safety management	166
10. Research achievements	167
11. Other matters	167
12. Reference	167

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	9
3. 연구수행 내용 및 결과	11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	162
5. 연구결과의 활용계획	164
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	165
7. 연구개발성과의 보안등급	166
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	166
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	166
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	167
11. 기타사항	167
12. 참고문헌	167

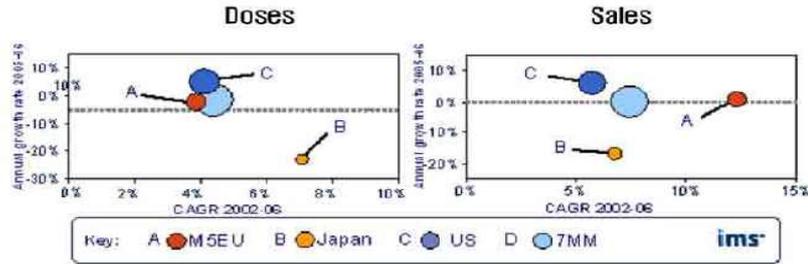
1. 연구개발과제의 개요

	코드번호	D-03		
<p>1-1. 연구개발 목적</p> <p>가. 국내 자원식물 추출물로부터 안전한 허피스바이러스 억제소재 개발</p> <p>나. 후보소재로부터 허피스바이러스 치료제 (천연물신약) 개발을 위한 기반 구축</p> <p>1-2. 연구개발의 필요성</p> <p>가. 의료수준의 향상으로 인류의 수명이 증가하고 현대화에 따른 스트레스 증가에 따라 만성 감염바이러스에 의한 난치성 질환의 발병률이 증가하는 추세임.</p> <p>나. 현재 시중에 판매되는 허피스 바이러스에 대한 항바이러스제제는 다양한 부작용이 있는 것으로 알려져 있지만 이외에 다른 제제가 개발되고 있지 않음. 또한 항바이러스제제에 대한 내성증가 및 저효율 등의 문제점을 갖고 있음.</p> <p>다. 만성감염 바이러스성 질환 치료를 위해 장기적으로 복용이 가능한 저독성, 고효율의 천연물 기반 항바이러스제 개발이 시급한 현실임.</p> <p>라. 본 연구를 통하여 풍부한 식물자원을 바탕으로 한 다양한 종류의 항바이러스제 후보물질을 선별할 수 있으며, 보다 구체적인 분자적 기작을 연구함으로써 최소한의 부작용과 최대한의 효능을 나타내는 치료제 개발이 가능함.</p> <p>마. 다른 바이러스 치료제 개발에 적용함으로써 항바이러스제 시장에서의 고부가가치 창출 뿐 아니라 후발 연구진들의 효율적인 기술개발에 큰 도움이 될 수 있음.</p> <p>1-3. 연구개발 범위</p> <p>가. 항바이러스 활성 검출 시스템 구축</p> <p>나. 국내자원식물 추출물을 이용한 허피스바이러스 억제 소재 선별 및 작용기전 분석</p> <p>다. 후보 천연소재의 유효성분 규명, 지표성분 설정 및 원료표준공정개발, 원료시험기준, 생산 공정확립 및 안정성 평가</p> <p>라. 전임상 안전성 평가, 임상프로토콜 작성 및 IND filing</p>				

2. 국내외 기술개발 현황

	코드번호	D-04		
<p>○ 감염증 치료제를 항바이러스, 항박테리아, 항진균 제품군으로 나누었을 때, 항바이러스 치료제제품에 대한 세계시장은 2005년 17,493백만 달러를 형성하였고, 2010년에는 35,199백만 달러, 2015년에는 70,7669백만 달러로 연평균 15%씩 성장하여, 앞으로도 큰 시장을 형성할 것으로 예상. 항박테리아 제품군은 2005년 항바이러스 제품군보다 규모가 큰 시장을 형성하였으나, 시간이 흐를수록 항바이러스에 대한 시장이 더 높은 성장률로 가장 큰 시장을 형성할 것으로 전망.</p>				

- 세계 주요 7개 시장 (미국, 일본, 영국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인)에서 항바이러스 치료제의 기술 분야별 판매액 분포를 보면, HSV, CMV 관련 제품이 47% 가량 차지하며, 간염 치료제 관련 제품이 46%를 차지함 (출처 : MIDAS Sales Data, IMS Health Market Prognosis. 2007).



* 버블의 크기는 시장 규모임

출처: MIDAS Sales Data, IMS Health, August 2007.

그림 5. 주요 7개 시장에서 항바이러스 치료제 시장의 규모 및 분포

- 국내 항바이러스 치료제 관련 시장은 2005년 1,225억원에서 연평균 15%씩 성장. 표. 항바이러스 치료제 관련 국내 산업체 현황

회사명	개발현황
(주)부광약품	- 항바이러스 물질 합성 및 원료 중간체의 국산화 개발 연구
(주)삼천리제약	- 바이러스 특이효소제 및 에이즈 치료제 개발
(주)종근당	- 간염치료제 신규 항바이러스제 개발
(주)중외제약	- 간 보호제
(주)한미약품	- 간염 치료제
(주)SK케미칼	
(주)LG화학	- 에이즈 치료제
(주)한미약품	- HBV, HCV 치료제 개발 연구
(주)태림제약	- 항AIDS제, HCV 치료제 연구개발 및 특허 등록완료
(주)셀트리온	- 미국 CDC(질병통제센터)와 바이러스 항체 공동개발 - 국내 바이오의약품 개발 기업인 (주)셀트리온은 미국 질병통제센터가 보유하고 있는 광견병 바이러스 치료용 항체 물질 중 최종 선별한 항체의 세포주 개발을 포함한 신약개발과 임상을 진행, 2011년 출시 목표
(주)LG생명과학	- 독자기술로 개발한 신규 B형 간염치료제 LB80380에 대해 미국 Anadys사와 총 3,000만 불 규모의 기술수출계약 체결
(주)경동제약	- 항바이러스제 팜크로바(헤르페스 치료제) 미국특허 취득 - 다국적 제약사 노바티스를 상대로 팜크로바 관련 특허침해소송 항소심 승소('07)
(주)유한양행	- HIV 치료제 원료약품 엠트리시타빈 미국 GM사와 221억 공급체결
(주)제놀루션	- RNAi 기반 항바이러스제 개발 연구

- 항바이러스제는 일반적으로 바이러스 종에 따라 각기 다른 치료제를 사용하기도 하나 적용되는 범위가 겹치는 바이러스 질환도 있음. 1960년대부터 항바이러스제 개발이 가시화

되었으며, 1998년 B형간염에 대한 항바이러스제 인터페론이 개발됨.

- 최근 다양한 생리활성의 자원으로서 천연자원을 활용하는 연구가 급속히 늘고 있으며, 특히 감마 허피스 바이러스 관련 항바이러스 연구도 Antiviral Res.에 최근 보고된 바 (De Leo et al., 2012), 본 연구과제에서 발굴하고자 하는 천연자원 유래 항바이러스 활성물질의 분리 및 활성 기전 연구의 중요성이 더욱 부각되고 있음.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제1절 연구개발의 목표 및 주요내용

가. 최종목표 : 국내 자원식물 추출물로부터 허피스 바이러스 치료제 (천연물 신약) 개발을 위한 기반 구축

나. 주요내용

- 1) HSV, HCMV, EBV 복제 및 재활성화 검출 시스템 구축
- 2) 국내자원식물 추출물을 이용한 허피스바이러스 억제 소배 선별 (선물물질 기구축 및 Back-up물질선별)
- 3) 바이러스 억제 소재의 작용기전 분석 (Acyclovir 계열 비교평가)
- 4) 유효성분 규명 및 지표성분 설정
- 5) 원재료 및 원료 기시범 개발, 원료 validation을 통한 표준공정개발
- 6) 원료시험기준 설정, 생산공정확립, 물성 및 안정성평가
- 7) In vitro 및 in vivo 전임상 유효성 평가
- 8) 단회 및 4주, 13주반복투여 독성평가, 유전독성 등의 GLP 전임상 안전성 평가
- 9) 유효성 및 약리작용기전 자료산출
- 10) 임상제제연구 및 용량/용법 설정
- 11) 완제규격 및 분석법 개발, 완제 기시범확립 및 validation
- 12) 안정성 시험 배치생산 및 레코드, 완제 안정성 평가
- 13) 임상프로토콜개발, 원료자료집/문헌 자료 수집, IND filing, 임상시험 신청

제2절 과제별 (세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 주관기관 (제1세부) : 허피스 바이러스 억제제 천연물신약 개발연구

- 1) 연구개발의 목표
 - : 항허피스바이러스 천연물신약개발 전체 총괄 (경희대학교 강세찬)
 - 작용기전, 전임상평가, CRO 등 각 기관 연계 IND자료의 종합적 산출
- 2) 연구개발 내용
 - 가) 바이러스기반 및 Cell based assay 시료제공 및 라이브러리 구축
 - 각 세부과제의 시료제공 및 선별된 후보물질의 유효성분 규명을 위한 용매분획
 - 용매 분획물에 대한 라이브러리 구축

- 용매 분획물로부터 activity-guided fractionation을 통한 유효성분 규명

나) 최적추출공정개발

- 우수한 항허피스 후보소재로부터 용매분획, 소분획, Open C.C, MPLC, Prep. LC를 이용한 유효성분 분리

- NMR 및 3D분석 등을 통한 유효성분 구조결정, 분석법 확립

- 유효성분 함량 비교 및 항바이러스 효능 비교, 물질 수급 적합 등을 고려한 최적의 지표성분 설정

- 지표성분 함량 분석을 통한 최적추출공정 개발

다) 대량생산 및 제제/제형연구

- 대량생산 업체선정 및 제제/제형(참여기업과 공동개발)

라) GLP/CRO연계 독성자료 생산을 위한 기반 구축

- 기초연구용량 설정 (non-GLP DRF)

- GLP기관 단회, 4주반복, 13주반복투여 독성 기초 용량 설정

마) 생산 scale-up지원

- 최적추출공정을 바탕으로 생산단계의 기시법을 위한 분석법 확립 및 제공

바) 완제생산 등 기시법 개발, 제제/제형상의 밸리데이션을 위한 유효성분, 지표성분의 대량분리 및 제공

사) 완제생산 제약사(글로벌 네트워크 형성제약사) 선정 : 기술이전 및 권리이전 협의 포함

아) CRO기업 연계 IND filing 및 임상승인을 위한 협동연구

- 자료수집, 전임상 결과 기반의 임상적용 항목, 자료 분석 등

나. 제2세부기관 : 국내 자원식물 추출물을 이용한 신규 Human Cytomegalovirus (HCMV) 및 Epstein-Barr virus (EBV) 억제제 발굴 및 기전 분석
(가천대학교 송윤재)

1) 연구개발의 목표

: Herpes virus 중 유행률이 가장 높은 2종의 바이러스 선별 및 적용

2) 연구개발 내용

가) HCMV 억제제 High-throughput screening을 위한 바이러스 기반 또는 cell-based assay system 구축

- HCMV-GFP 재조합바이러스를 이용한 항바이러스제 스크리닝 시스템 확립 및 시험법 설정

- HCMV major immediate-early (MIE) promoter (MIEp)를 이용한 cell-based assay system 구축

나) 국내 자원식물 추출물을 이용한 HCMV 억제제 스크리닝

- HCMV-GFP 및 HCMV MIEp cell-based assay system을 이용한 항바이러스 후보물질 스크리닝

- Plaque assay 및 real-time PCR을 이용한 선별된 후보물질의 효능 심화분석

- Screening시 acyclovir 비교 평가

다) 선별된 후보물질의 항바이러스 작용 기전규명

- 항바이러스 후보물질의 바이러스 작용점 (바이러스 부착, 진입, 탈피, 유전자 발현 및 복제, 입자 조립, 성숙, 방출) 및 표적 분석
- 항바이러스 후보물질에 의한 숙주세포의 세포생리학적 변화 분석
- 항바이러스 후보물질에 의한 바이러스 유전자 발현 조절 분석
- 동물모델을 이용한 항바이러스 후보물질에 의한 생체독성의 일차적 분석
- MIEp reporter mouse를 이용한 생체 내 항바이러스 후보물질의 기전 분석

다. 제2세부 위탁기관: 국내 자원식물 추출물을 이용한 신규 Epstein-Barr virus 억제제 발굴 및 기전분석 (고려대학교 송문정)

1) 연구개발의 목표 및 내용

가) 국내 자원식물 추출물을 이용한 감마헤르페스바이러스 억제제 스크리닝

- 형광단백표지 리포터바이러스를 활용한 항바이러스활성 스크리닝
- Plaque assay 및 real-time PCR을 이용한 선별된 후보물질의 효능 심화분석

나) 선별된 후보물질의 항바이러스 작용 기전규명

- 항바이러스 후보물질의 바이러스 작용점 (바이러스 부착, 진입, 탈피, 유전자 발현 및 복제, 입자 조립, 성숙, 방출) 및 표적 분석
- 항바이러스 후보물질에 의한 숙주세포의 세포생리학적 변화 분석
- 항바이러스 후보물질에 의한 바이러스 유전자 발현 조절 분석

다) 선별된 후보물질의 생체내 항바이러스 효능 분석 (동물모델)

- 감마헤르페스바이러스를 비강내 감염 후 항바이러스 후보물질의 생체내 효능 분석
- 항바이러스 후보물질에 의한 생체독성의 일차적 분석

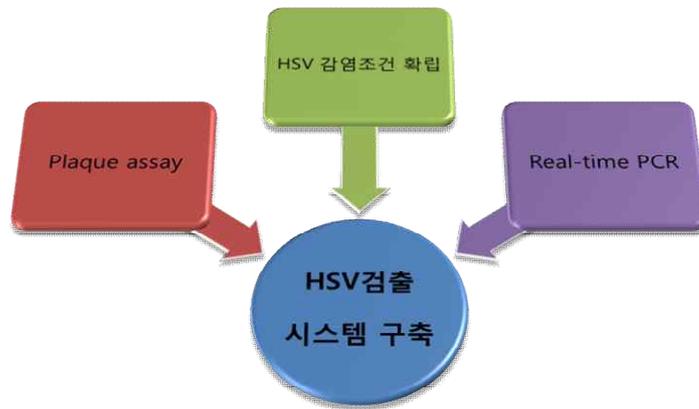
라. 제1협동기관 : 국내 자원식물 추출물을 이용한 신규 Herpes Simplex Virus (HSV) 억제제 발굴 및 기전 분석 (동국대학교 서태근)

1) 연구개발의 목표 및 내용



가) HSV 복제 및 재활성화 검출 시스템 구축

- HSV 민감성 세포인 vero 세포에 바이러스 감염 조건 확립
- Plaque assay를 이용한 HSV 복제 및 감염성 검출 시스템 구축
- Real-time PCR을 이용한 HSV 복제 검출 시스템 구축
- 바이러스 재활성화 검출 시스템 구축



<HSV 복제 및 재활성화 검출 시스템 구축>

나) 국내 자원식물 추출물을 이용한 항바이러스 효능 스크리닝

- HSV plaque assay를 이용한 항바이러스 효능 스크리닝
- Real-time PCR을 통해 바이러스 유전체양을 검출하여 항바이러스 효능 스크리닝
- 바이러스 감염 후 HSV의 재활성에 중요한 VP16 유전자 발현 억제제 스크리닝
- 항바이러스제 후보 추출물에 대한 세포 독성 평가

다) 항바이러스 천연물의 작용기전 분석

- 항바이러스 후보물질의 바이러스 작용점(바이러스 부착, 진입, 탈피, 유전자 발현 및 복제, 입자 조립, 성숙, 방출) 및 표적 분석
- 항바이러스 작용점에 관련된 신호전달 단백질의 분석
- 항바이러스 작용점에 관련된 세포 및 바이러스 유전자 발현의 분석

마. 제2협동 : IND 신청을 위한 천연물 신약 개발자료의 산출 및 승인

(메콕스큐어메드(주) 정재용)

1) 연구개발의 목표

: IND신청을 위한 천연물 신약 개발자료 일체의 산출

2) 연구개발 내용

가) 허피스바이러스 치료 목적의 천연물 신약 개발을 위한 임상시험 설계

- 임상2상 시험을 위한 프로토콜 작성

나) 전임상 자료 및 원재료, 원료, 완제의 규격 자료 확보에 따른 IND filing

- 각 기관과 연계하여 임상시험 허가를 위한 자료 수집 및 filing
- 식약처 Q&A를 통한 자료 보완

다) 기존의 허피스바이러스 억제제의 단점을 보완한 안전하고 장기적인 처방이 가능한 천연물신약을 개발하는데 중점을 둠

- 아래의 표와 같이, 신약개발에 필요한 임상전단계의 IND신청을 위한 모든 기술을 총망라함

0	항허피스바이러스 천연물신약개발(IND)	2.2.1	단회투여
1.1	생약원료 조사선정	2.2.2	4주 반복투여
1.1.1	지표물질확보	2.2.3	13주 반복투여
1.1.2	생약원료 분석 및 표준화	2.2.4	안전성약리
1.2	분석기관 선정	2.2.5	기타안전성시험
1.2.1	원료규격 및 분석법 개발	2.2.6	조제균질성시험
1.2.2	원료생산업체 선정	2.3	유효성 및 약리기전연구
1.2.3	추출/농축/건조 방법연구	2.4	임상제제연구
1.2.4	최적추출조건 확립	2.4.1	용량/용법 선정
1.2.5	원료표준공정(Lab Scale)	2.4.2	완제 Formulation
1.2.6	원료시험생산(Plant Scale)	2.4.3	제조공정연구
1.2.7	원료생산공정 확립	2.4.4	완제규격 및 분석법 개발
1.2.8	원료시험기준 및 방법 확보	2.4.5	완제 기시법 확립
1.2.9	원료 기시법 밸리데이션	2.4.6	완제 기시법 밸리데이션
1.2.10	원료 물성분석	2.4.7	안정성시험 배치 생산
1.2.11	원료 안정성 시험	2.4.8	배치레코드
1.2.12	원료 안정성 확보	2.4.9	완제 안정성 시험
1.3	제형업체 선정	2.5	임상시험계획서 작성
1.3.1	비임상 제제연구	2.5.1	임상프로토콜 개발
1.4	GLP기관(참여기관)협의	2.5.2	IND Document 작성
1.4.1	안전성평가지험준비	2.5.3	원료 자료집/문헌
1.4.2	in vitro 효력시험	2.5.4	임상시험승인 신청서류 준비
1.4.3	전임상효력시험	2.5.5	임상시험승인 신청
2.1	생산 scale up 확립	2.5.6	IND 및 IRB 보완서류
2.2	원료안전성연구	2.6	임상시험 승인

바. 제3협동: OECD 가이드라인 및 식약처고시에 따른 독성시험자료 생산
(한국건설생활환경시험연구원 이진규)

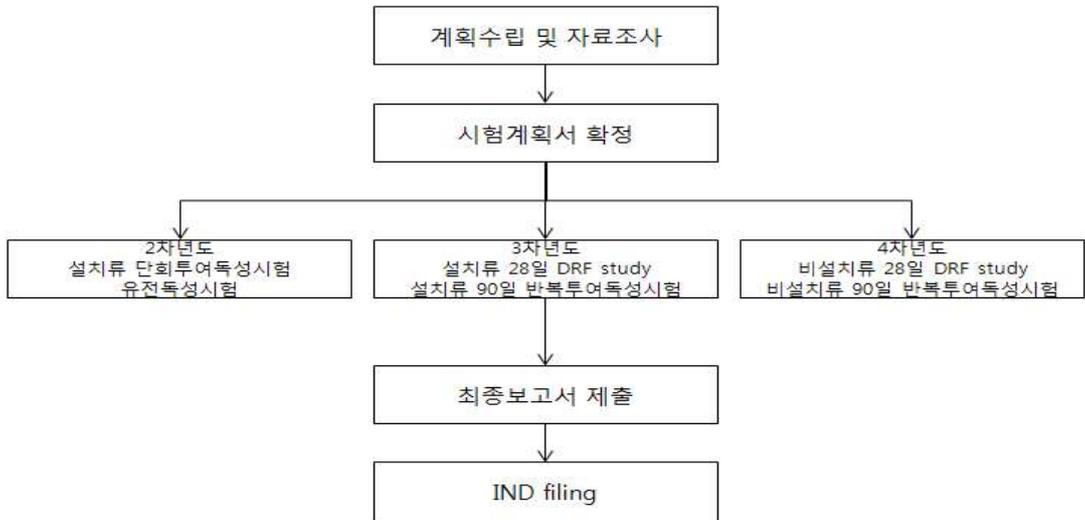
1) 연구개발의 목표

: OECD 가이드라인 및 식약청 고시에 따른 독성시험자료 생산

- 설치류 단회 및 반복투여독성시험 (단회, 4주, 13주에 대한 설치류 시험평가)
- 각 단계별 (천연물신약 후보물질 도출, 추출공정개발에 따른) 유전독성시험(미생물복귀돌연변이시험, 체외 염색체이상시험, 소핵시험)
- 비설치류 단회 및 반복투여독성시험

2) 연구개발 내용

※ 현재까지, 국내 자원식물을 이용한 항허피스바이러스 체제에 대한 의약품 개발 근거가 없고, 본 연구과제의 결과물은 “천연물신약”에 해당하므로, 신약개발을 위한 IND 자료 산출 중, 유효성분에 대한 약리 및 독성동태외의 모든 GLP 독성시험항목을 평가하며, 단, 천연물신약이고, 투여기간이 6개월이 넘지 않으므로, 잔류용매 비검출 공정개발 시 특수독성/발암성 항목은 불필요한 것으로 사료됨



가) 설치류 단회투여 독성시험

항 목	시 험 개 요			
시험목적	<i>In Vivo</i> 독성시험 동물 종인 랫드에서의 단회투여 독성시험을 통하여 개략의 치사량 (Approximate Lethal Dose) 또는 단회투여 최대내성용량(Maximum Tolerated Dose) 확인하고 반복투여 독성시험의 용량선정을 위한 데이터 확보			
시험기간	총 6주 1주차: 시험계획 및 동물주문 2주차: 동물입수 및 순화 3~5주차: 투여, 임상증상관찰, 부검 5~6주차: 데이터정리 및 시험보고서 작성			
시험동물	국내산 SD 랫드 (Specific pathogen free, 수컷, 5~6주령)			
시험군/동물수	4군, 군당 입수 각 5마리			
	시험군	시험처리	시험용량(mg/kg)	동물 수 랫드(암/수)
	1	용매	0	5/5
	2	시험물질	TBD	5/5
	3	시험물질	TBD	5/5
4	시험물질	TBD	5/5	
투여빈도/기간	1회 투여			
시험용량	시험물질 3용량(저, 중, 고용량)			
조제	시험물질 투여직전 조제함			
관찰항목	(1) 사망률 시험기간 중 최소 1일 2회 사망 및 빈사동물 관찰 (2) 임상증상(14일간) 시험기간 중 최소 1일 1회(투여 후 1시간 내외) 임상증상 관찰 (3) 체중측정 시험기간 중 주 1회 또는 2회 체중측정 (4) 부검 사망/빈사동물/생존동물에서 육안부검 실시			

	(육안소견을 보인 장기에 대한 조직병리 고려)
Documentation	시험계획서 및 최종보고서 작성

나) 설치류 반복투여 독성시험(랫드 28일 반복투여 용량결정시험(DRF))

항 목	시 험 개 요			
시험목적	In Vivo 독성시험 동물 종인 랫드에서의 90일 반복투여 독성시험 용량결정을 위하여 28일 반복투여를 통하여 최대내성 용량(Maximum Tolerated Dose) 확인			
시험기간	총 10주 1주차: 시험계획 및 동물주문 2주차: 동물입수 및 순화 3~7주차: 투여, 임상증상관찰, 부검 8~10주차: 시험보고서 작성			
시험동물	국내산 SD 랫드 (Specific pathogen free, 수컷, 5~6주령)			
시험군/동물수	4군, 군당 암수 각각 5마리			
	시험군	시험처리	시험용량(mg/kg)	동물 수 랫드(암/수)
	1	용매	0	5/5
	2	시험물질	TBD	5/5
	3	시험물질	TBD	5/5
4	시험물질	TBD	5/5	
투여빈도/기간	1일 1회, 28일간 반복투여			
시험용량	시험물질 3용량(저, 중, 고용량)			
조제	시험물질 투여직전 조제함 (조제물 안정성자료 확보 시 주 1회 조제)			
관찰항목	(1) 사망률 시험기간 중 최소 1일 2회 사망 및 빈사동물 관찰 (2) 임상증상 시험기간 중 최소 1일 1회(투여 후 1시간 내외) 임상증상 관찰 (3) 체중측정 시험기간 중 주 1회 또는 2회 체중측정 (4) 임상병리검사 부검직전 독성시험 동물에 대하여 혈액학/혈액생화학 검사 실시 (5) 부검/장기중량 측정 사망/빈사동물/생존동물에서 간, 흉선, 신장, 고환(난소), 전립선/자궁 심장, 폐 부검 실시 및 주요 장기중량 측정			
Documentation	시험계획서 및 최종보고서 작성			

다) 설치류 반복투여 독성시험 (랫드 90일 반복투여 독성시험)

항 목	시 험 개 요	
시험목적	In Vivo 독성시험 동물 종인 랫드에서 시험물질을 90일간 반복투여하여 시험물질의 무해용량(NOEL) 및 표적장기를 평가	
시험기간	총 29주	

	1주차: 시험계획 및 동물주문 2주차: 동물입수 및 순화 3~16주차: 투여, 임상증상관찰, 부검 17~24주차 : 조직병리 25~29주차: 시험보고서 작성																					
시험동물	국내산 SD 랫드 (Specific pathogen free, 수컷, 5~6주령)																					
시험군/동물수	4군, 군당 암수 각각 10마리(독성시험)																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">시험군</th> <th rowspan="2">시험처리</th> <th rowspan="2">시험용량(mg/kg)</th> <th>동물 수</th> </tr> <tr> <th>랫드(암/수)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>용매</td> <td>0</td> <td>10/10</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>시험물질</td> <td>TBD</td> <td>10/10</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>시험물질</td> <td>TBD</td> <td>10/10</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>시험물질</td> <td>TBD</td> <td>10/10</td> </tr> </tbody> </table>	시험군	시험처리	시험용량(mg/kg)	동물 수	랫드(암/수)	1	용매	0	10/10	2	시험물질	TBD	10/10	3	시험물질	TBD	10/10	4	시험물질	TBD	10/10
	시험군				시험처리	시험용량(mg/kg)	동물 수															
		랫드(암/수)																				
	1	용매	0	10/10																		
2	시험물질	TBD	10/10																			
3	시험물질	TBD	10/10																			
4	시험물질	TBD	10/10																			
투여빈도/기간	1일 1회, 90일간 반복투여																					
시험용량	시험물질 3용량(저, 중, 고용량)																					
조제	시험물질 투여직전 조제함 (조제물 안정성자료 확보 시 주 1회 조제)																					
관찰항목	(1) 사망률: 시험기간 중 최소 1일 2회 사망 및 빈사동물 관찰 (2) 임상증상: 시험기간 중 최소 1일 1회(투여 후 1시간 내외) 임상증상 관찰 (3) 체중측정: 시험기간 중 주 1회 또는 2회 체중측정 (4) 사료섭취량 측정: 시험기간 중 주 1회 측정 (5) 임상병리검사: 부검직전 독성시험 동물에 대하여 혈액학/혈액생화학/노검사 실시 (6) 부검/장기중량 측정: 사망/빈사동물/생존동물에서 부검 실시 및 장기중량 측정																					
Documentation	시험계획서 및 최종보고서 작성																					

라) 비설치류 단회투여 독성시험(Beagle Dog)

항 목	시 험 개 요																					
시험목적	<i>In Vivo</i> 독성시험 동물 종인 비글개에서의 단회투여 독성시험을 통하여 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose) 또는 단회투여 최대내성용량(Maximum Tolerated Dose) 확인하고 반복투여 독성시험의 용량선정을 위한 데이터 확보																					
시험기간	총 10주 1주차: 시험계획 및 동물 주문 2~5주차: 동물입수 및 순화 6~7주차: 투여, 임상증상관찰, 부검 8~10주차: 시험보고서 작성																					
시험동물	수입산 Beagle dog (8~12개월령)																					
시험군/동물수	4군, 군당 암수 각각 1마리																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">시험군</th> <th rowspan="2">시험처리</th> <th rowspan="2">시험용량(mg/kg)</th> <th>동물 수</th> </tr> <tr> <th>랫드(암/수)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>용매</td> <td>0</td> <td>1/1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>시험물질</td> <td>TBD</td> <td>1/1</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>시험물질</td> <td>TBD</td> <td>1/1</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>시험물질</td> <td>TBD</td> <td>1/1</td> </tr> </tbody> </table>	시험군	시험처리	시험용량(mg/kg)	동물 수	랫드(암/수)	1	용매	0	1/1	2	시험물질	TBD	1/1	3	시험물질	TBD	1/1	4	시험물질	TBD	1/1
	시험군				시험처리	시험용량(mg/kg)	동물 수															
		랫드(암/수)																				
	1	용매	0	1/1																		
2	시험물질	TBD	1/1																			
3	시험물질	TBD	1/1																			
4	시험물질	TBD	1/1																			

투여빈도/기간	1회 투여
시험용량	시험물질 4용량까지 시험
조제	시험물질 투여직전 조제함
관찰항목	(1) 사망률 시험기간 중 최소 1일 2회 사망 및 빈사동물 관찰 (2) 임상증상(14일간) 시험기간 중 최소 1일 1회(투여 후 1시간 내외) 임상증상 관찰 (3) 체중측정 시험기간 중 주 1회 또는 2회 체중측정 (4) 부검 사망/빈사동물/생존동물에서 육안부검 실시 (육안소견을 보인 장기에 대한 조직병리 고려)
Documentation	시험계획서 및 최종보고서 작성

마) 비설치류 반복투여 독성시험(Beagle Dog, 90일 반복투여독성시험)

항 목	시 험 개 요			
시험목적	In Vivo 독성시험 동물 종인 비글개에서 시험물질을 90일간 반복투여하여 시험물질의 무해용량(NOAEL) 및 표적장기를 평가			
시험기간	총 31주 1주차: 시험계획 및 동물 주문 2~5주차: 동물입수 및 순화 6~19주차: 투여, 임상증상관찰, 부검 20~27주차: 조직병리 28~31주차: 시험보고서 작성			
시험동물	수입산 Beagle dog (8~12개월령)			
시험군/동물수	4군, 군당 암수 각각 3마리			
	시험군	시험처리	시험용량(mg/kg)	동물 수 랫드(암/수)
	1	용매	0	3/3
	2	시험물질	TBD	3/3
	3	시험물질	TBD	3/3
4	시험물질	TBD	3/3	
투여빈도/기간	1일 1회, 90일간 반복투여			
시험용량	시험물질 4용량까지 시험			
조제	시험물질 투여직전 조제함			
관찰항목	(1) 사망률: 시험기간 중 최소 1일 2회 사망 및 빈사동물 관찰 (2) 임상증상: 시험기간 중 최소 1일 1회(투여 후 1시간 내외) 임상증상 관찰 (3) 체중측정: 시험기간 중 주 1회 또는 2회 체중측정 (4) 사료섭취량 측정: 시험기간 중 주 1회 측정 (5) 임상병리검사: 부검직전 독성시험 동물에 대하여 혈액학/혈액생화학/노검사 실시 (6) 부검/장기중량 측정: 사망/빈사동물/생존동물에서 부검 실시 및 장기중량 측정			
Documentation	시험계획서 및 최종보고서 작성			

바) 유전독성시험(복귀돌연변이시험)

항 목	시 험 개 요			
시험목적	시험물질의 돌연변이 유발가능성을 특정 아미노산 요구 균주를 통해 검색			
시험기간	총 6주 1주차: 시험계획 2주차: 예비시험 3~4주차: 본시험 5~6주차: 데이터 정리 및 시험보고서 작성			
시험생물	살모넬라 : TA98, TA100, TA1535, TA1537, 대장균 : WP2uvrA			
시험군 구성				

	구 분	사용 플레이트수	농도단계	양성대조, 용매대조 사용플레이트 수
	직접법	2매	5이상	2매
	대사활성화법	2매	5이상	2매
투여빈도	1회			
시험용량	시험물질 5 용량이상 시험			
조제	시험물질 투여직전 조제함			
관찰항목	(1)균주 별 복귀집락수 (2)무균시험			
Documentation	시험계획서 및 최종보고서 작성			

사) 유전독성시험(염색체이상시험)

항 목	시 험 개 요				
시험목적	시험물질의 염색체이상 유발성 유무를 chinese hamster 유래 세포를 이용검색				
시험기간	총 10주 1주차: 시험계획 2~3주차: 예비시험 4~8주차: 본시험 9~10주차: 데이터 정리 및 시험보고서 작성				
시험계	CHO-k1				
시험군 구성	구 성	세포 접종수 /60 mm plate	시험물질 투여시기	시험물질 노출기간	추 가 배양시간
	직 접 법	20,000	접종 후 4일째	24 시간	-
	대사활성화법	20,000	접종 후 4일째	6 시간	18시간
노출기간	직접법 : 24시간, 대사활성법 : 6시간				
시험용량	시험물질 5 용량이상 시험				
조제	시험물질 투여직전 조제함				
관찰항목	(1)세포증식억제율 (2)염색체의 구조이상, 숫적이상 관찰				
Documentation	시험계획서 및 최종보고서 작성				

아) 유전독성시험(소핵시험)

항 목	시 험 개 요
시험목적	시험물질의 마우스 골수세포의 다염성 적혈구에 대한 소핵유발 정도검색

시험기간	총 10주 1주차: 시험계획 및 동물주문 2주차: 동물입수 및 순화 3~8주차: 본시험 9~10주차: 데이터 정리 및 시험보고서 작성				
시험동물	ICR mice (수컷)				
시험군 구성					
	군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)
	G1 (V.C)	Male	6	1 ~ 6	10
	G2	Male	6	7 ~ 12	10
	G3	Male	6	13 ~ 18	10
	G4	Male	6	19 ~ 24	10
G5 (P.C)	Male	6	25 ~ 30	10	
투여방법	복강 또는 임상예정 경로로 1회투여				
시험용량	시험물질 3 용량으로 시험				
조제	시험물질 투여직전 조제함				
관찰항목	세포도말상태가 좋은 곳을 선택하여 다염성 적혈구 (PCE) 2000개에서 소핵을 갖는 세포를 계수한다. 또 전체 적혈구 (다염성 적혈구 및 정염성 적혈구) 200개를 관찰하여 그 중 다염성 적혈구의 비율을 계측한다.				
Documentation	시험계획서 및 최종보고서 작성				

제3절 연차별 연구개발 내용 및 평가 기준

가. 1차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2012년	시스템 구축 및 예비연구	<ul style="list-style-type: none"> 만성감염바이러스 억제 자원식물 소재 라이브러리 구축 및 소재개발 국내 자원식물 라이브러리로부터 항 바이러스 소재 선별구축 최적의 천연물 신약 후보 식물추출물 확보 및 back-up소재 선정 원료구입의 용이성, 신약개발시의 경제성, 기시법 개발의 용이성, 글로벌 신약 타겟으로의 진보성 등을 갖춘 원료소재 선발 작용기전 규명 : 바이러스 복제 및 숙주세포 내의 조절기능 분석
		HSV 복제 및 재활성화 검출 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> HSV, HCMV, EBV 민감성 세포에서의 바이러스 감염 조건 확립 GFP 재조합 바이러스, Plaque assay를 이용한 HSV, HCMV, EBV 복제 및 감염성 검출 시스템 구축 Real-time PCR을 이용한 바이러스 복제 검출 시스템 구축 바이러스 재활성화 검출 시스템 구축
		국내 자원식물 추출물을 이용한 항 바이러스제 스크리닝 및 유효성분 분리	<ul style="list-style-type: none"> 형광현미경, Plaque assay, Real-time PCR로 바이러스 유전체양을 검출하여 항바이러스제 스크리닝 바이러스 감염 후 바이러스 재활성에 중요한 유전자 발현 억제제 스크리닝 및 acyclovir비교 평가 항바이러스제 후보 추출물에 대한 세포 독성 평가 최적용매추출법에 따른 용매별 분획, 유효성분의 분리
		CRO 및 GLP연구 (GLP부분은 1차년도 제외)	<ul style="list-style-type: none"> 개발연구단계에 이은 공업화 연구에서는 Scale up을 목적으로 하는 조립기의 중요한 조작조건 (조작 parameter)과 과립특성의 선택이 행해지므로, 선별된 천연물신약 후보에 대하여, 전반적인 IND를 위한 고려요소를 적용하여 처방검토의 단계부터 IND제출자료 전반에 대하여 검토하여, 원료선정에 참여함

나. 2차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도	2013년	최적추출공정 개발, 유효성분 구조 규명, 지표성분 설정 (3종 공정, 유효성분 6종 등) - 최종 1종 확정 및 복합제제 검토 완료	<ul style="list-style-type: none"> 만성감염바이러스 복제 검출 시스템을 이용하여 항바이러스제 후보물질에 대한 activity-guided fractionation/isolation을 통하여 표준물질이면서, 유효성분인 물질 도출 - 원료, 원재료 기시범 및 제제/제형 개발시 밸리데이션이 가능한 물질을 선택할 수 있도록 다양한 유효성분 및 지표성분 도출 - GC/MS, LC/MS, HPLC, NMR을 연계시켜 성분 도출 - 생약원료 (천연식물원료)의 분석 및 표준화, 지표성분 확보 - 참여연구기관외의 외부 분석기관 선정 - 원료규격 및 분석법 개발 - 원료생산업체 선정 : 연구단계별 원료추출시의 용매조건에 따른 생산시설을 보유하고 있고, 장기적으로 원료생산이 가능한 업체 선정
		2차 스크리닝 및 최적추출공정개발, 최적추출공정 및 분획 및 성분 연구단계 별 작용기전 평가	<ul style="list-style-type: none"> 형광현미경, Plaque assay, Real-time PCR로 바이러스 유전체양을 검출하여 항바이러스제 스크리닝 바이러스 감염 후 바이러스 재활성에 중요한 유전자 발현 억제제 스크리닝 항바이러스제 후보 추출물에 대한 세포 독성 평가
		GLP 독성시험 자료 생산	<ul style="list-style-type: none"> 설치류 단회투여독성시험 유전독성시험
		생산공정의 확립	<ul style="list-style-type: none"> 원료표준공정 (Lab. scale) 원료시험생산 (Plant scale) 대량추출공정 확립 및 원료시험기준 및 방법 확보 원료기시범 밸리데이션

다. 3차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	2014년	제제/제형 개발 및 최적원료 조달, 재배단지 육성	<ul style="list-style-type: none"> • 재배단지 육성 • 제제/제형개발 <ul style="list-style-type: none"> - 원료물성분석, 원료안정성 시험, 원료 안정성 확보 - 제형업체 선정 (CRO와의 협의) : 최종 기술이전 대상 기업 고려 - 비임상 제제연구 - 조제균질성 및 기타 안정성 시험 - 완제 formulation 및 용량/용법 선정 (안전성/유효성 시험 평가에 따라 수행) • 항바이러스 작용점에 관련된 세포 및 바이러스 유전자 발현의 분석
		항바이러스 천연물의 작용기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 항바이러스 후보물질의 바이러스 작용점 (바이러스 부착, 진입, 탈피, 유전자 발현 및 복제, 입자 조립, 성숙, 방출) 및 표적 분석 • 항바이러스 작용점에 관련된 신호전달 단백질의 분석 • 항바이러스 작용점에 관련된 세포 및 바이러스 유전자 발현의 분석
		GLP 안전성 평가 / 전임상 효력시험 동시 수행	<ul style="list-style-type: none"> • 안전성평가지험 준비 : 주관기관에서 non-GLP DRF수행 • in vitro 효력시험 완료단계, 전임상 효력시험 동시 수행 • 설치류 단회투여 • 설치류 4주반복투여 • 13주 반복투여 평가 수행시작 • 안전성 약리평가
		CRO 및 전체 1단계 (1~3차년도) 전체 IND자료 산출	<ul style="list-style-type: none"> • 항허피스바이러스 자원식물 소재 선정, 효력 및 경제적 측면에서 우수한 소재선별, 최적추출 공정 (신약원료)개발 및 유효성분, 지표성분설정, 원료 벨리데이션, 전임상 시료 확보, 전임상 안전성, 유효성평가, 작용기전 규명

라. 4차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
4차년도	2015년	최적추출공정 확립 및 대량생산공정 개발완료 유효성분 분석법 확립 완료	<ul style="list-style-type: none"> • 원료, 원재료 기시법 및 제제/제형 개발시 벨리테이션이 가능한 물질을 선택할 수 있도록 다양한 유효성분 및 지표성분 도출 • GC/MS, LC/MS, HPLC, NMR을 연계시켜 성분 도출 • 원료물성분석, 원료안정성 시험, 원료 안정성 확보 • 제형업체 선정 (CRO와의 협의) : 최종 기술 이전 대상 기업 고려 (GMP시설기업) • 비임상 제제연구 • 조제균질성 및 기타 안정성 시험 • 완제 formulation 및 용량/용법 선정 (안전성/유효성 시험 평가에 따라 수행) • 제제/제형 연구개발 업체 선정 및 OEM생산
		항바이러스 천연물의 효능 및 독성 검증에 위한 동물모델시스템 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 항바이러스 후보물질의 효능 및 독성 검증 동물모델시스템 구축 및 acyclovir비교 평가
		GLP 안전성 평가 / 전임상 효력시험 동시 수행	<ul style="list-style-type: none"> • 설치류 단회투여 (Back-up물질) • 설치류 4주반복투여 평가 완료 및 비설치류 설계 • 13주 반복투여 평가 완료 • 비설치류 단회/반복 평가
		IND자료 및 기술이전 자료의 산출	<ul style="list-style-type: none"> • 신약개발 조건의 가~마)사항의 정리 • 완제 규격 및 분석법 개발 • 완제 기시법 확립 및 벨리테이션 • 안정성시험 배치 생산 • 배치레코드 • 완제 안정성 시험 • 임상프로토콜 개발 • 원료 자료집/문헌 • 임상시험승인 신청서류 준비

마. 5차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
5차년도	2016년	천연물신약 개발 산출자료의 완료	<ul style="list-style-type: none"> • 항바이러스 후보물질의 효능 및 독성 자료 재검증 • 제약사 기술이전자료의 산출 - 안전성 약리시험 평가 / 기타 안전성 시험 - 약리독성 및 작용기전 규명 완료 - 추가 유효성성분 및 IND용 SCI급 논문의 확보 - 임상제제 연구 - 용량/용법 선정 및 완제 formulation - 완제품 제조공정연구/규격, 분석법 개발 - 완제 기시법확립/밸리데이션 - 배치별 안정성시험 완료 - 임상프로토콜개발 - IND filing - 원료자료집/문헌 생산 - 임상프로토콜 개발 및 임상시험승인 신청
		동물모델을 이용한 항바이러스제 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 항바이러스 후보물질의 효능 및 독성 검증 • 동물모델시스템을 이용한 작용기전 분석
		임상프로토콜에 따른 임상시험 승인신청 및 보완자료 제출 (최종 승인)	<ul style="list-style-type: none"> • 임상시험승인 신청서류 준비 및 신청 • IND승인 및 IRB보완서류 제출 및 최종 임상시험 승인
		2단계 (4~5차년도)의 자료에 대한 검증 및 전체 IND자료의 filing	<ul style="list-style-type: none"> • 2단계 (4~5차년도) : 1단계자료에 대한 보완 및 IND신청 서류작성 및 필요시험 진행 (전임상 안전성-반복투여 및 비설치류, 완제 formulation, 제조공정, 임상시험승인)

바. 평가의 착안점 및 기준

구분	1단계(1~3차년도)	2단계(4~5차년도)
연구단계	최적의 만성감염 바이러스 치료용 신약소재 개발	신약원료개발 및 임상시험승인
단계별 목표	<ul style="list-style-type: none"> - 허피스바이러스 치료용 소재 선정연구 - 최적원료선정 및 원재료 기시법 개발 - 최적추출공정 및 대량추출공정 개발 - 작용기전 및 유효성분 규명 - 전임상 유효성평가, 설치류안전성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 비설치류 안전성 평가 - 약리독성/작용기전 규명 및 용량/용법 선정 - 제제, 제형개발, QC 및 추가성분 규명 - 임상프로토콜개발 - 임상계획승인
단계별 세부 연구내용	<ul style="list-style-type: none"> - 항허피스바이러스제 탐색, 선정, 선정자료조사 - 원료분석 및 표준화 - 지표물질, 유효물질의 확보 - 원료생산업체 선정, 추출/농축/건조방법연구 - 항바이러스 작용기전 규명(in vitro) - 원료표준공정 및 시험생산 · 원료시험기준, 방법확보/기시법 밸리데이션 · 원료물질, 안정성시험, 제형업체 선정 - 전임상 효력시험 평가 - 생산 scale up 확립 - 원료안정성 연구 - 전임상 안전성(설치류 단회, 반복) 	<ul style="list-style-type: none"> - 안전성 약리시험 평가 / 기타 안전성 시험 - 약리독성 및 작용기전 규명 완료 - 추가 유효성성분 및 IND용 SCI급 논문의 확보 - 임상제제 연구 - 용량/용법 선정 및 완제 formulation - 완제품 제조공정연구/규격, 분석법 개발 - 완제 기시법확립/밸리데이션 - 배치별 안정성시험 완료 - 임상프로토콜개발 - IND filing - 원료자료집/문헌 생산 - 임상프로토콜 개발 및 임상시험승인 신청
주요 성과물	결과물	결과물
	<ul style="list-style-type: none"> - 항바이러스 원료소재 선정 - 신약개발 원재료 및 원료추출공정개발 - 전임상효력 및 작용기전 - 원료단계의 허가자료 생산 	<ul style="list-style-type: none"> - 전임상 안전성 시험평가결과 - 완제품 개발 및 안정성시험 완료 - 임상프로토콜 개발 - 임상시험승인
	측정, 평가방법	측정, 평가방법
	<ul style="list-style-type: none"> - 최적원료 선정 및 라이브러리 구축 여부 - 표준원료생산 여부 및 분석법 개발 여부 - 유효성분 및 지표성분 획득여부 - 원료안정성 확보 및 비임상 제제개발 여부 - GLP설치류 안전성평가 완료 여부 	<ul style="list-style-type: none"> - GLP비설치류 및 기타독성평가 완료 여부 - 완제품 생산 및 기시법, 규격확립 여부 - 완제 안정성시험 완료 여부 - IND document작성 여부 - 임상프로토콜 및 임상시험승인 신청서류 확인

제4절 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계

가. 연구의 추진전략

- 1) 단일 식물추출물을 이용하여, 현재 국내에서 천연물을 이용한 항허피스바이러스 개발 근거가 없으므로, 천연물신약에 해당하여 “사용례가 없는 (허가되지 아니한)본질 조성 또는 기원이 전혀 새로운 생약을 주성분으로 하는 단일제”로 ADME, 가교시험, 상호작용, 발암성 및 특수독성외의 모든 시험항목을 대상으로 하며, 전임상 안전성 평가단계에서 발생하는 독성영향에 대한 결과를 근거로 특수독성 면제 등 천연물신약개발에 소

요되는 비용을 최대한 경제적으로 해결하고자 하였음

- 2) 본 연구를 진행하기 위해서는 우선적으로 HSV, HCMV, EBV의 적절한 감염 조건과 감염 후에 이를 분석하기 위한 기술이 필요하다고 판단되었음
 - 본 연구진은 이들 바이러스를 보유하고 있었으며, 이를 이용하여 천연물 유래 물질의 항바이러스 효능을 입증한 바 있으므로 본 연구에 적합한 조건을 가지고 있었음
 - 본 연구진은 감염된 바이러스를 검출하기 위해 GFP 재조합 바이러스를 이용한 형광 현미경 분석법 및 plaque 분석법을 이용한 선행 연구를 진행한 바 있으며, real-time PCR을 이용하여 확인한 바 있으므로 바이러스 검출 기술 개발을 위한 적합한 조건을 갖추고 있었음
 - 허피스 바이러스가 재활성화 되기 위해 필수적인 바이러스 단백질을 표적으로 mRNA, protein 수준에서 각각 real-time PCR, western blot 기법을 이용하여 분석함
- 3) 본 연구를 진행하기 위해서는 다양한 식물자원을 스크리닝하기 위한 체계적인 계획이 필요하다고 판단되었음
 - 이전 연구에 따르면 같은 식물 자원이라도 추출 용매에 따른 활성이 크게 차이가 나는 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구진은 식물자원 라이브러리를 에탄올, 메탄올, 아세톤 등 다양한 용매를 이용한 추출 방법을 통해 그 효능을 입증함
 - 다양한 식물자원 추출물을 처리한 후 plaque 분석법, 현미경적 방법, real-time PCR 분석법 등 다양한 실험기법을 이용하여 항바이러스 효능을 입증함
 - 높은 항바이러스 효능을 보이는 식물자원이 스크리닝과 더불어 세포 수준에서 그 독성을 분석함으로써 안전성 높은 후보 물질의 선별이 가능할 것으로 판단하였음
- 4) 본 연구를 통해 항바이러스 효능 뿐 아니라 그 작용기전을 밝혀 부작용이 없고 높은 활성을 보이는 식물자원 유래 항바이러스제 개발이 가능할 것으로 판단되었음
 - 선별된 식물자원 유래 물질이 어떠한 기전을 통해 항바이러스 효능을 보이는지에 대한 체계적인 분석을 통해 입증
 - 시중에 판매되는 대부분의 HSV 억제제는 acyclic guanosine analogue로 HSV polymerase를 타겟으로 하며, 이를 위해서는 HSV의 TK 단백질의 발현을 필요로 함. 본 연구진은 TK 단백질을 발현하지 못하는 HSV를 보유하고 있기 때문에 이를 이용하면 지금까지 사용되어 왔던 억제제와는 완전히 다른 기작을 통해 항바이러스 효능을 보이는 억제제 개발이 가능함. 이는 다른 연구 개발 방법과의 차별성을 높이고 경쟁력을 향상시킬 수 있음
 - 식물유래 추출물의 처리 시점을 다르게 하고 다양한 시점에서 바이러스를 검출하는 기술 개발을 통해 부착, 진입, 탈피, 복제, 입자조립, 방출 등 어느 시점에서 작용하는지를 밝혀서 안정성이 있고 고효율을 가지는 항바이러스제 개발이 가능
 - 식물유래 추출물의 항바이러스 작용점을 분석하여 세포 내 어떤 신호 전달 기작이 관련되어 있는지를 구체적이고 명확하게 분석
 - 세포 내 신호 전달 기작의 변화 뿐 아니라 식물유래 추출물에 의해 변하는 바이러스 유전자 전사, 단백질 발현을 분석
- 5) 기술개발 시 고려해야할 사항 : 천연물신약 개발 허가사항
 - ADME 면제 사항고려

- 제제/제형개발시 유효성분 및 지표성분의 밸리데이션
- 전임상 안전성 평가 시 비설치류반복 투여 시험 범위에 대하여 식약처 논의 필요

신규 항 헤피스 바이러스제 개발을 위한 연구개발의 추진체계



- HSV, HCMV, EBV 감염 및 검출 시스템 구축
- 국내 자원식물유래 추출물을 이용한 항바이러스제 스크리닝
- 항바이러스 효능 천연물의 효능 평가 및 분자적 기작 분석



- 전임상 유효성 평가 시 인체감염바이러스를 사용하여 유효한 tool을 개발
- 6) 확보해야할 세부기술 내용
- 천연물신약 개발에 따른 임상계획의 승인을 위한 세부적 시험기술 실현
- 7) 고려해야 할 사항
- 1차 탐색 후 원료조달의 체계가 구축된 원료 선정 : 경제성, 원료의 균질성 고려
 - 효능이 가장 우수한 원료일지라도 경제성 및 표준화를 극복할 수 없는 원료는 배제
- 8) 도출된 기술

가) 지표(유효)성분의 도출

- 만성감염바이러스 복제 검출 시스템을 이용하여 항바이러스제 후보물질에 대한 activity-guided fractionation/isolation을 통하여 표준물질이면서, 유효성분인 물질 도출
- 원료, 원재료 기시법 및 제제/제형 개발시 밸리데이션이 가능한 물질을 선택할 수 있도록 다양한 유효성분 및 지표성분 도출
- GC/MS, LC/MS, HPLC, NMR을 연계시켜 성분 도출

나) 최적추출공정 개발

- 생약원료(천연식물원료)의 분석 및 표준화, 지표성분 확보
- 참여연구기관 외의 분석기관 선정
- 원료규격 및 분석법 개발
- 원료 생산업체 선정 : 연구단계별 원료추출시의 용매조건에 따른 생산시설을 보유하고 있고, 장기적으로 원료생산이 가능한 업체 선정

다) 생산 공정의 확립

- 원료표준고정 (Lab. scale)
- 원료시험생산 (Plant scale)
- 대량추출공정 확립 및 원료시험기준 및 방법 확보
- 원료기시험 밸리데이션

라) 제제/제형 개발

- 원료물성분석, 원료안정성 시험, 원료 안정성 확보
- 제형업체 선정 (CRO와의 협의) : 최종 기술이전 대상 기업 고려
- 비임상 제제연구
- 조제균질성 및 기타 안정성 시험
- 완제 formulation 및 용량/용법 선정 (안정성/유효성 시험 평가에 따라 수행)

마) GLP 안정성 평가 / 전임상 효력시험 동시 수행

- GLP 기관선정 : 참여기관
- 안전성평가지험 준비 : 주관기관에서 non-GLP DRF 수행
- *in vitro* 효력시험 완료단계, 전임상 효력시험 동시 수행
- 설치류 단회투여
- 설치류 4주 반복투여 및 13주 반복투여
- 안전성 약리평가

바) IND document 작성

- 가)-마) 사항의 정리
- 완제 규격 및 분석법 개발
- 완제 기시험 확립 및 밸리데이션
- 안정성시험 배치 생산
- 배치레코드
- 완제 안정성 시험
- 임상프로토콜 개발
- 원료 자료집/문헌
- 임상시험승인 신청서류 준비 및 신청
- IND 및 IRB 보완서류 제출 및 최종 임상시험 신청

나. 추진체계

1) 전체과제 조직구성 및 체계

제1세부	제2세부	제2세부 (위탁)	제1협동	제2협동	제3협동
경희대학교	가천대학교	고려대학교	동국대학교	메릭스큐어메드	KCL
담당기술 개발내용	담당기술 개발내용	담당기술 개발내용	담당기술 개발내용	담당기술 개발내용	담당기술 개발내용
허피스바이러스 억제 천연물신약개발 연구 - IND자료의 종합적 산출/관리 - 시료제공/라이브러리 구축 - 최적추출공정 개발 - 대량생산 및 제제/제형연구 - 제3,4협동 연계예비시험 - 생산지원 - 밸리데이션 구축 위한 성분제공 - 기술이전	EBV 및 HCMV에 대한 억제제 발굴 및 작용기전 분석 - 항바이러스 후보물질의 작용점 및 표적 분석 - MIEP reporth mouse 생체 작용기 분석 - HCMV-GFP를 이용한 탐색 (3종 도출) - 1세부 유효성분 연구시 activity 측정	EBV 및 HCMV에 대한 억제제 발굴 및 작용기전 분석 - 감마허피스 바이러스 억제제 스크리닝 (angelicin 도출) - 마우스감마허피스 바이러스에 대한 작용기전 규명 - 제1세부과제 연계, angelicin 및 유사체에 대한 성분 연구시 activity 측정 (보골지의 최적 추출공정 확보 공동연구)	신규 Herpes Simplex virus (HSV) 억제제 발굴 및 기전분석 - 제1협동, 제2협동과제를 통하여 제1세부의 도출 최적화원료선정 항바이러스 작용점 및 표적분석 - 신호전달 단백질의 분석 및 유전자 발현분석 - 선행연구 결과의 curcumin의 보골지, 고련피 등에 대한 연구	IND신청을 위한 천연물신약개발자료 산출 및 승인 - 국내 자생식물에 대한 퍼시스바이러스 제제개발근거가 없으므로, 신약에 준하여 IND 자료 산출 및 관리 - 생약원료조사에서 전임상 유효성, 제제/제형안정성 및 분석개발의 전 분야 참여	OECD 가이드라인 및 식약청 고시에 따른 안정성 평가 자료 산출 - 모든 후보물질에 대한 유전독성 평가 - 최적후보물질에 대한 최적추출공정별 DRF - 최종 후보 물질에 대한 단회, 반복투여 독성평가 - 비설치류 단회/반복독성 평가

제5절 세부연구수행 결과

가. 항바이러스 스크리닝 시스템 구축 및 후보물질 선별

1) 국내 (강원, 충북 및 제주도) 자원식물 및 한약재 추출물을 이용한 라이브러리 구축

가) 강원, 충북 300여종, 제주도 600여종, 국내외 자원식물 2,000여종에 대하여 경희대학교 한방재료학과에 구축

나) 국내유통한약재 추출물 라이브러리 구축

2) 항바이러스 소재 선별에 따른 유효성분 분리

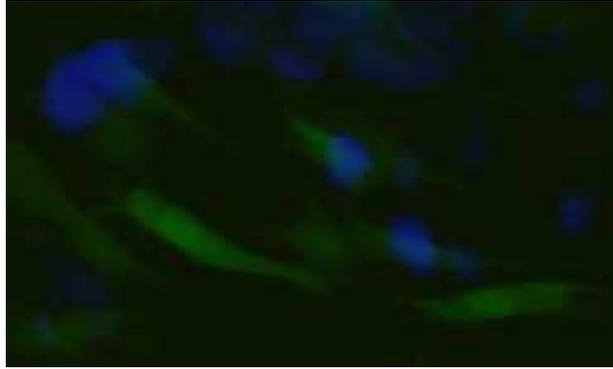
가) 허피스바이러스에 대한 α , β , γ 의 각각에 대하여 1차 screening 결과를 토대로, 재배단지 육성의 가능성, 원료단가의 실현성, 단방처방의 가능성, 복방의 가능성을 CRO 및 연구자들과 함께 토의

나) 선별된 각각의 1차 screening 결과를 토대로 2차 screening 및 재현성 확인

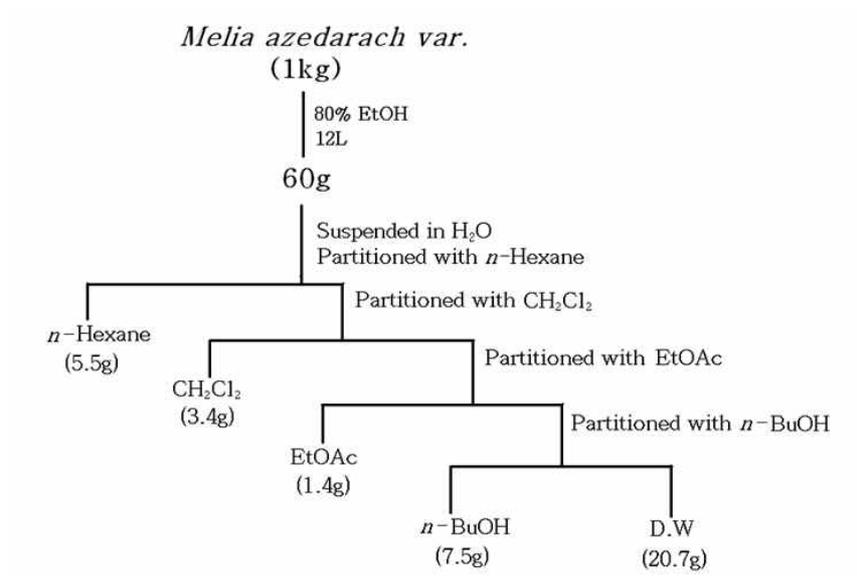
다) 최종 선별된 원료에 대한 유효성분 규명

○ 고련피

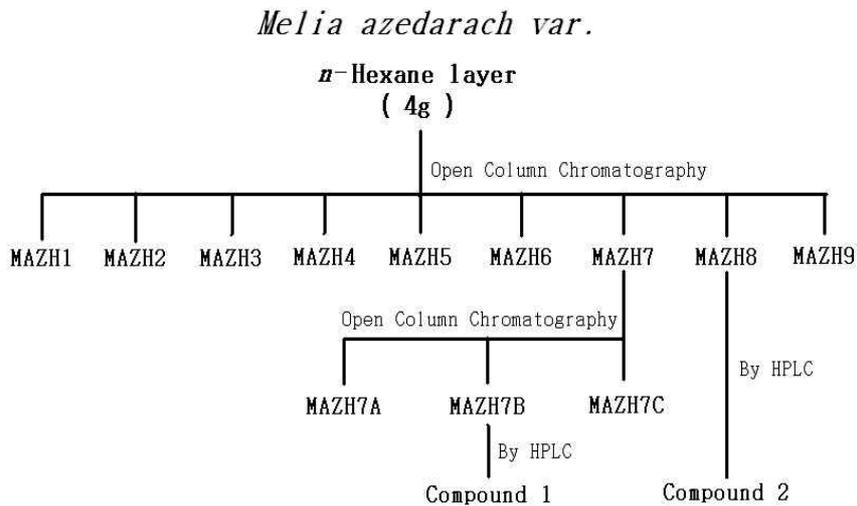
- Virus autophagy system에서 고련피 추출물 성분인 Kumujian B의 autophagy activity를 확인한 결과, autophagy의 발현이 유도되면서 동시에 HCMV가 억제됨을 나타냄



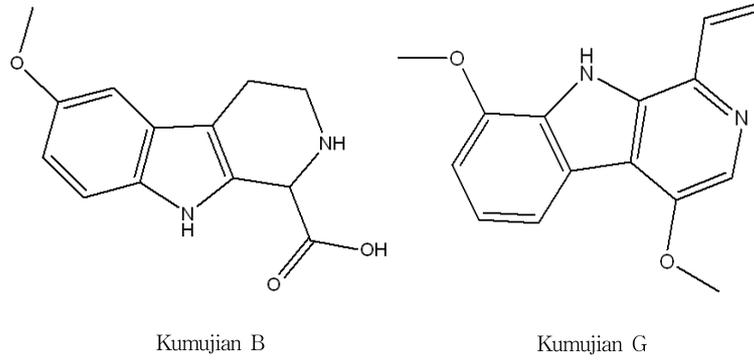
Autophagy 발현 유도 효과
 초록색 : HCMV-GFP, 파란색 : autophagosome



고련피의 유효성분 분리를 위한 분획

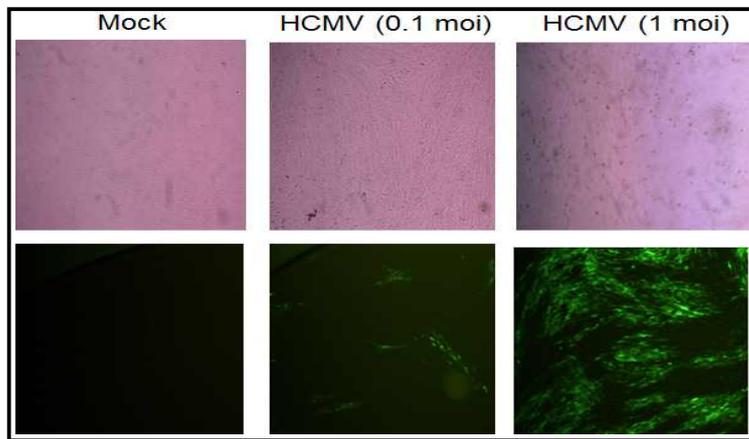


고련피 유효성분 분리



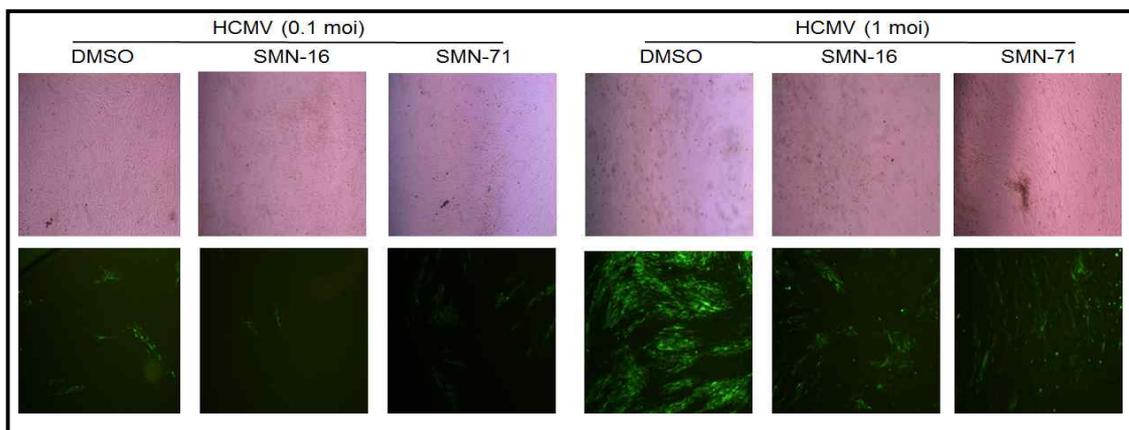
3) HCMV 복제 및 재활성화 검출 시스템 구축

가) GFP tagging 된 HCMV를 이용하여 0.1, 1 m.o.i. (multiplicity of infection)로 human foreskin fibroblast (HFF)에 감염시킨 뒤 형광현미경을 이용하여 다양한 시간동안 배양을 통해 바이러스의 복제를 분석할 수 있는 최적 조건을 설정하였음



HCMV-GFP 및 형광현미경을 이용한 바이러스 복제 분석

나) HCMV-GFP 0.1, 1 m.o.i.로 HFF를 감염시키고, 감염된 세포를 DMSO 또는 다양한 국내자원식물 추출물을 처리하고 7일 후에 형광현미경을 이용하여 바이러스의 복제를 분석하였음



국내자원식물 추출물에 의한 HCMV-GFP 복제 억제 분석 예

4) 형광단백표지 리포터바이러스를 활용한 항바이러스 활성 1차 스크리닝

가) HCMV-GFP와 형광현미경을 이용하여 761종의 국내자원식물 추출물의 항 HCMV 효능을 정성적으로 분석한 1차 스크리닝 결과 약 205종에서 HCMV-GFP의 복제가 억제되는 것을 확인하였음

HCMV-GFP와 형광현미경을 이용한 항바이러스 효능의 국내자원식물 추출물 1차 선별소재 일부

Sample Number	Extracts with anti-HCMV activity		
SMN-1	라일락	<i>Syringa dilatata</i>	있
SMN-2	개망초	<i>Erigeron annuus</i>	전초
SMN-3	산피불주머니	<i>Corydalis speciosa</i> Maxim.	전초
SMN-4	황새냉이	<i>Cardamine flexuosa</i> With.	전초
SMN-5	꽃다지	<i>Draba nemorosa</i> L. for. <i>Nemorosa</i>	전초
SMN-7	싸리	<i>Lespedeza bicolor</i> Turcz.	있
SMN-7-1	싸리	<i>Lespedeza bicolor</i> Turcz.	있
SMN-8	회화나무	<i>Sophora japonica</i>	있, 가지
SMN-11	자루개자리	<i>Medicago sativa</i> L.	전초
SMN-12	석잠풀	<i>Stachys japonica</i> Miq.	전초
SMN21-1	명아주	<i>Chenopodium album</i> var. <i>centrorubrum</i>	전초
SMN-22	뫼지풀	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> var. <i>elatio</i> r	전초
SMN-30	개망초	<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.	전초
SMN-32	질경이	<i>Plantago asiatica</i>	전초
SMN-33	산쑥	<i>Artemisia Montana</i>	전초
SMN-38	미역줄나무	<i>Tripterygium regelii</i>	전초
SMN39-2	신갈나무		있
SMN-40-1	파리풀	<i>Phryma leptostachya</i> var. <i>asiatica</i>	
SMN-42	갈참나무	<i>Quercus aliena</i>	있, 가지
SMN-45	인동	<i>Lonicera japonica</i>	전초
SMN-46	조팝나무	<i>Spiraea prunifolia</i> var. <i>simpliciflora</i>	있, 가지
SMN-48	개웃나무	<i>Rhus trichocarpa</i>	있, 가지
SMN-51	미국가막사리	<i>Pteropsida</i>	전초
SMN-52	황새냉이	<i>Cardamine flexuosa</i> With.	전초
SMN-53	개나리	<i>Forsythia koreana</i> Kumsun	꽃잎, 가지
SMN-55	돌콩	<i>Glycine soja</i> Siebold & Zucc.	전초
SMN-57	익모초	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt.	전초
SMN-60	삼백초	<i>Saururus chinensis</i> (Lour.) Baill.	전초
SMN-69	회나무	<i>Euonymus sachalinensis</i> (F.Schmidt)	가지
SMN-74	일본잎갈나무	<i>Larix kaempferi</i> (Lamb.) Carriere	가지, 잎

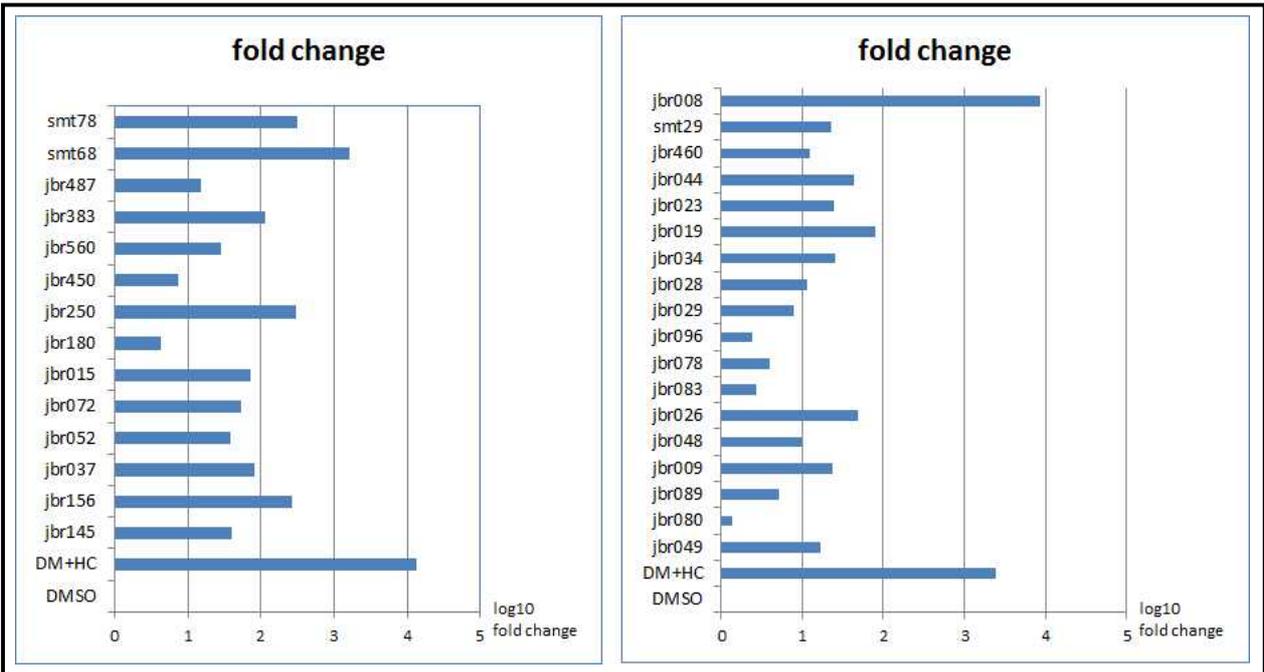
나) 이 중 현미경 시야에서 세포독성을 보인 추출물과 미미한 항바이러스 효능을 보인 추출물을 제외한 51종의 추출물에 대한 항 HCMV 효능을 HCMV immediate-early 유전자인 UL123과 housekeeping gene인 β -actin을 이용한 real-time PCR을 통해 정량적으로 분석하였음

1차 스크리닝 결과 우수한 항 HCMV 효능이 검출된 국내자원식물 추출물

Sample Number	Extracts with anti-HCMV activity		
JBR008	도깨비고비	<i>Cyrtomium falcatum</i> (L.) Presl	상부
JBR009	sedum속		
SMT68	백굴채		
SMT29	낭독		
JBR023	섬잣나무	<i>Pinus parviflora</i> Sieb. et Zucc.	있
JBR026	털머위	<i>Farfugium japonicum</i> Kitamura	있
JBR028	주목	<i>Taxus cuspidata</i> Sieb. et Zucc.	있
JBR029	참식나무	<i>Neolitsea sericea</i> (BL.) Koidz.	있
JBR034	홍가시나무	<i>Photinia glabra</i> (Thunb.) Max.	있
JBR037	생달나무	<i>Cinnamomum japonicum</i> Sieb.	있
JBR041	석송	<i>Lycopodium clavatum</i>	전초
JBR044	졸가시나무	<i>Quercus phillyraeoides</i> A. Gray	있
JBR048	일엽초	<i>Lepisorus thunbergianus</i> (Kaulf.) Ching	전초
JBR049	구상나무	<i>Abies koreana</i> Wils.	있
JBR052	광나무	<i>Ligustrum japonicum</i> Thunb.	있
JBR072	사스레피나무	<i>Eurya japonica</i> Thunb.	있
JBR078	협죽도	<i>Nerium indicum</i> Mill.	있
JBR080	비자나무	<i>Torreya nucifera</i> Sieb. et. Zucc	있
JBR083	담팔수	<i>Elaeocarpus sylvestris</i>	있
JBR096	비쭈기나무	<i>Cleyera japonica</i> Thunb.	있
JBR145	사방오리나무	<i>Alnus firma</i> S. et Z.	열매,꽃
JBR156	삼전네블		열매
JBR180	당유자	<i>Citrus grandis</i> Osbeck	있
JBR250	부챗말	<i>Padina arborescens</i> Holmes	
JBR383	참나리	<i>Lilium longiflorum</i> Thunb.	전초
JBR450	통탈목	<i>Tetrapanax papyriferus</i> K. koch	있
JBR460	좀참빗살나무	<i>Euonymus bungeanus</i> Max	있
SMT78	백화사설초		
SMN48	개웃나무	<i>Rhus trichocarpa</i>	있,가지
SMN51	미국가막사리	Pteropsida	전초
SMN69	회나무	<i>Euonymus sachalinensis</i> (F.Schmidt)	가지
SMN74	일본잎갈나무	<i>Larix kaempferi</i> (Lamb.) Carriere	가지,있
SMN81	쑥부쟁이	<i>Aster yomena</i> (Kitam.) Honda	전초
SMN102	고들빼기		전초

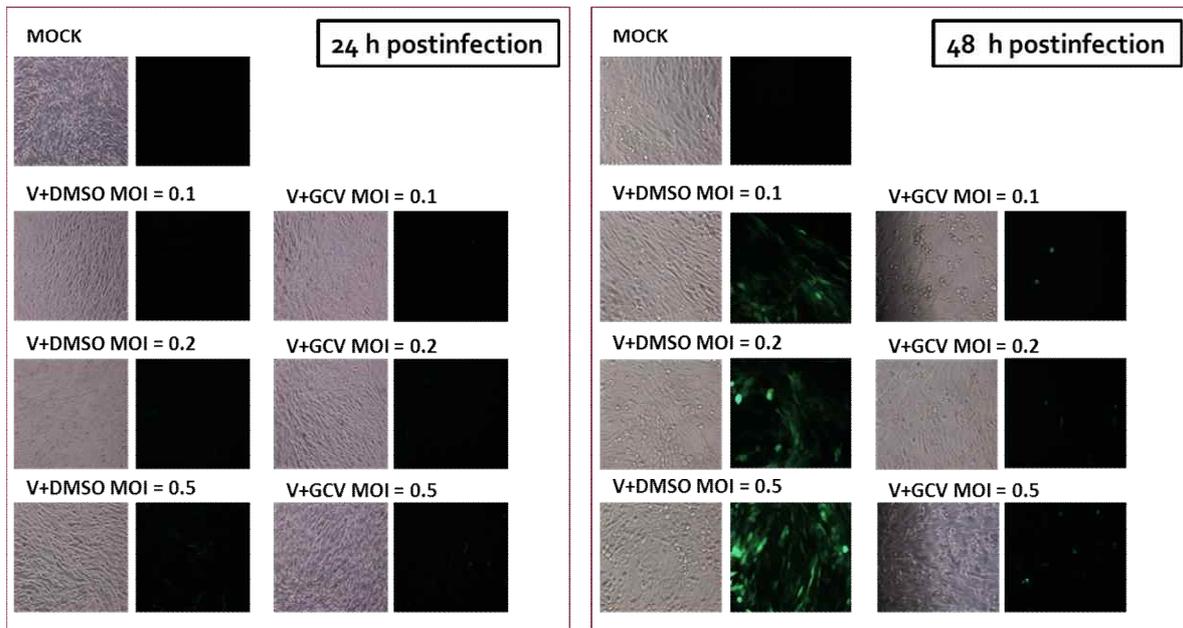
1차 스크리닝 결과 우수한 항 HCMV 효능이 검출된 국내자원식물 추출물

Sample Number	Extracts with anti-HCMV activity		
SMN104	갯버들	<i>Salix gracilistyla</i>	잎+가지
SMN105	등나무층랑		가지+열매
SMN4	황새냉이	<i>Cardamine flexuosa</i> With.	전초
SMN5	꽃다지	<i>Draba nemorosa</i> L. for. <i>Nemorosa</i>	전초
SMN7	싸리	<i>Lespedeza bicolor</i> Turcz.	잎
SMN30	개망초	<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.	전초
SMN32	질경이	<i>Plantago asiatica</i>	전초
SMN33	산쑥	<i>Artemisia montana</i>	전초
SMN38	미역줄나무	<i>Tripterygium regelii</i>	전초
SMN57	익모초	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt.	전초
SMN83	물양지꽃	<i>Potentilla cryptotaeniae</i> Maxim.	전초
JBR487	쪽동백나무	<i>Styrax obassia</i> S. et Z.	잎
JBR560	밤나무	<i>Castanea crenata</i> S. et Z.	잎
JBR598	천선과나무	<i>Ficus erecta</i> Thunb.	잎
SMN106	해바라기	<i>Helianthus annuus</i> L.	전초
SMN107	느티나무	<i>Zelkova serrata</i> (Thunb.) Makino	잎
SMN136	산피불주머니	<i>Corydalis speciosa</i> Maxim.	전초



Real-time PCR을 이용한 항바이러스 효능 검증

- 다) 51종의 국내자원식물 추출물에서 우수한 항 HCMV 효능을 검증하였고, 이들 추출물의 HCMV 복제 억제 기전 분석 및 activity-guided fractionation을 통한 성분 분석을 진행
- 5) 감마허피스 바이러스에서의 형광단백표지 리포터바이러스를 활용한 항바이러스 활성 탐색
- 가) 국내자원식물 추출물의 감마허피스바이러스에 대한 항바이러스 활성 테스트를 진행하고자 스크리닝 조건 확립 연구를 수행함. 인체 허피스바이러스의 경우 de novo 바이러스 복제를 검증할 수 있는 시스템이 매우 제한적이고 복제 역가도 낮기 때문에 이러한 한계를 극복하고자 마우스감마허피스바이러스를 활용하여 항바이러스 활성 스크리닝 연구를 수행
- 나) 본 연구진은 감마허피스바이러스에 대한 항바이러스 활성 연구를 위해 녹색형광단백표지 리포터 바이러스 (murine gammaherpesvirus 68/EGFP, MHV-68/EGFP)을 활용한 항바이러스 활성 스크리닝 시스템을 확보하고 있음
- 다양한 m.o.i. (0.1, 0.2, 0.5)로 HHK21 세포주에 MHV-68/EGFP 감염 후 24시간과 48시간 후에 형광현미경으로 바이러스 감염 상태를 확인함
 - 양성대조군으로 알려진 항바이러스 약물인 gancilovir (GCV)를 처리한 세포를 함께 관찰함으로써 가장 뚜렷하게 항바이러스 활성을 분석할 수 있는 스크리닝 조건을 찾고자 하였음



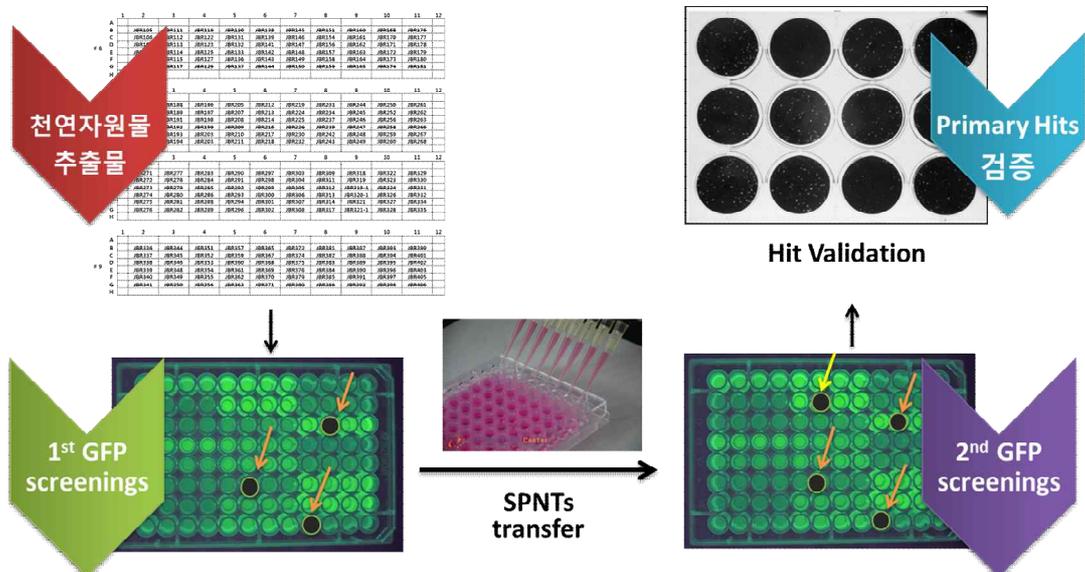
감마허피스바이러스에 대한 항바이러스활성 스크리닝 조건 확립. 다양한 MOI (0.1, 0.2, 0.5)로 MHV-68/EGFP 감염 후 24시간과 48시간 후에 형광현미경으로 바이러스 감염 상태를 확인한 결과

- 연구 결과 m.o.i.=0.5으로 48시간 감염 후 GFP 관찰을 통해 GCV의 항바이러스 활성을 가장 뚜렷하게 확인할 수 있었음. GFP 뿐 아니라 Bright field 상태에서 바이러스 감염에 의한 cytopathic effect (CPE)도 현저하게 감소하였음을 확인할 수 있음

6) 다단계 항바이러스 활성 스크리닝 시스템 확립을 위한 2 step screening 및 HTS의 필요성과 항바이러스 활성 스크리닝

가) 항바이러스 활성은 바이러스 생활 주기의 어느 단계를 억제한다고 하여도 나타날 수 있으나, 항바이러스 활성 중 de novo 감염시 바이러스의 진입과 복제 단계를 억제하는 경우 위와 같은 바이러스 1차 복제를 모니터링하는 스크리닝을 통해 활성 물질을 발굴할 수 있는 반면, 바이러스 입자의 성숙과 release 단계에 관여하는 경우 false negative로 나타날 수 있음

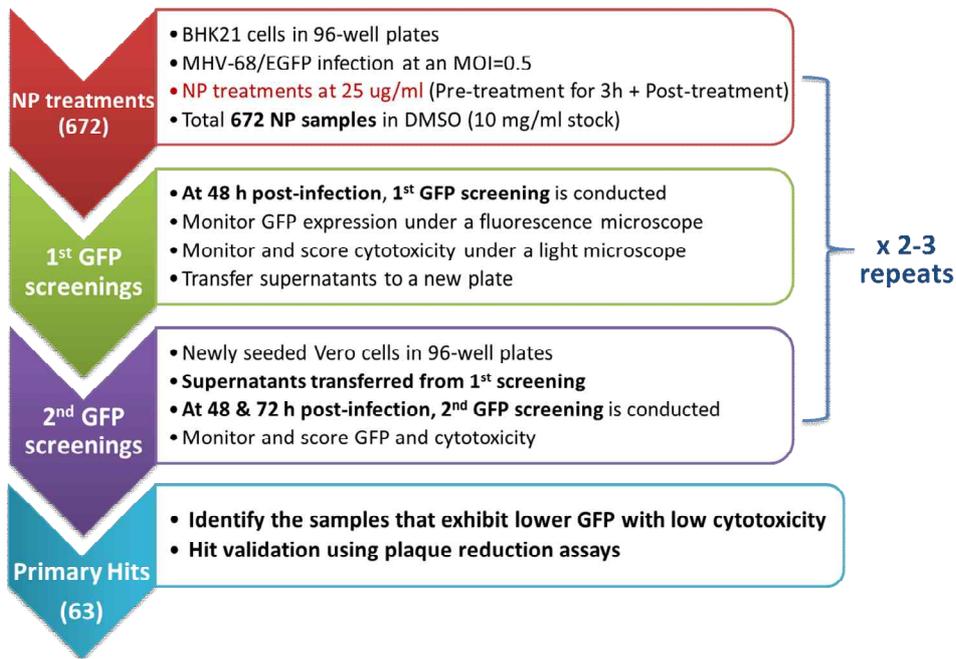
나) 따라서 좀 더 포괄적인 항바이러스 활성 물질을 발굴하기 위하여 1차 검색을 마친 세포배양 상층액을 새로운 세포로 transfer할 때 나타나는 바이러스 복제를 GFP의 발현 정도로 모니터링 하면서 1차 복제 후 생성된 바이러스 역가를 정성적으로 모니터링 할 수 있도록 하였음



감마헤르페스바이러스에 대한 다단계 항바이러스 활성 스크리닝 조건 확립. 다양한 천연자원 추출물을 처리하였을 때 나타나는 MHV-68/GFP 바이러스 복제에 미치는 영향을 1차 스크리닝 후 배양액을 새로운 세포에 transfer하여 2차 GFP 스크리닝을 수행함. 1차 및 2차 스크리닝을 통해 GFP 발현을 억제하는 primary hit를 결정하고 plaque reduction assay를 통해 그 역가 및 활성 기전을 추가로 연구함

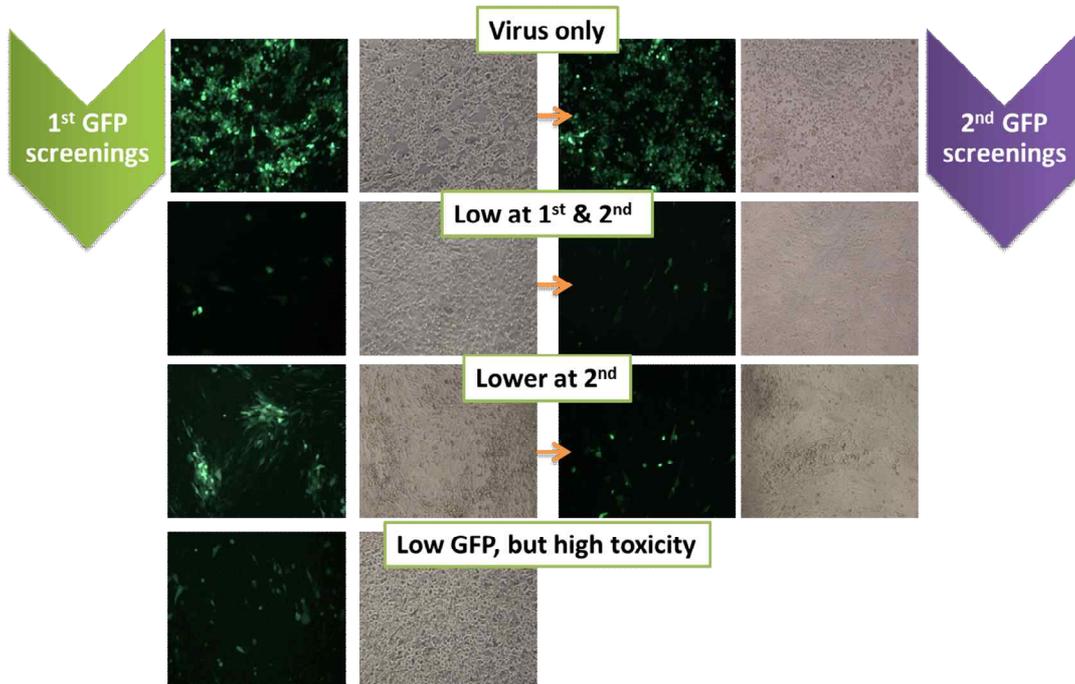
다) 이와 같은 2 step 항바이러스 활성 스크리닝은 스크리닝을 2번 진행하는 효과가 있을 뿐 아니라 바이러스 성숙과 배출에 관여하는 항바이러스 활성 물질을 발굴함으로써 스크리닝 초기부터 활성기전을 예상할 수 있도록 하는 효율적인 스크리닝 시스템일 것으로 기대됨

라) 본 연구진은 항바이러스 활성 연구는 96-well plate에서 진행하는 것으로 조건을 확립하고 이를 통해 수백종의 천연자원물을 단 시간내에 스크리닝 해낼 수 있는 HTS로 활용될 수 있음



국내천연자원의 항바이러스 활성 스크리닝 protocol chart

- 마) 국내천연자원 추출물은 본 과제의 주관연구기관인 경희대학교에서 공급받았으며, 총 761종의 추출물을 추후 임상시험을 고려하여 25 µg/mL 농도에서 항바이러스 활성 스크리닝을 진행하였음
- 96-well plate에 seeding한 BHK21 세포에 MHV-68/EGFP 바이러스를 m.o.i.=0.5로 감염시키고 48시간 후 형광현미경을 이용해 GFP 발현을 scoring하여 항바이러스 활성을 스크리닝 하였음
 - Bright Field를 관찰하여 CPE를 scoring을 동시에 진행하는 1차 스크리닝도 함께 진행하였으며, 천연자원 추출물은 바이러스 처리 전 3시간 동안 바이러스 감염 후 48시간 동안 25 µg/mL로 세포배양액에 처리하였음. 배양액을 세포 seeding한 세포배양액으로 transfer후 2차 GFP 스크리닝에는 천연물을 따로 넣어주지 않았으며 24, 72 시간 후 GFP와 CPE를 관찰하고 scoring하는 다단계 항바이러스 스크리닝을 진행하였음
 - 낮은 GFP score와 낮은 CPE score를 보이는 샘플을 후보물질로 결정. 2회의 스크리닝을 통해 총 63종의 후보물질이 발굴되었으며, 이 중 17개 물질은 GFP 발현을 50% 이하로 줄여주는 탁월한 효과를 보였음
- 바) 1차 GFP에서는 항바이러스 효과가 뚜렷하지 않았으나 배양액 transfer후에 항바이러스 효과는 나타내는 물질도 총 25종으로 본 연구진은 다단계 스크리닝을 통해 후보물질 발굴 효율을 크게 상승시켰음



국내천연자원물의 항바이러스 활성 스크리닝 결과 예시. MHV-68/EGFP 바이러스 감염 샘플과 비교하여 1단계 및 2단계 GFP 스크리닝에서 low GFP을 나타내는 추출물과 2단계에서 더욱 효과적으로 낮은 GFP를 보이는 추출물을 후보물질로 선별함. 낮은 GFP를 보이거나 독성이 강한 추출물은 후보물질 선별에서 제외함

사) 감마허피스바이러스에 대한 항바이러스 활성을 갖는 국내천연자원 소재 선별

- SMN 7-1, 9, 12, 13, 32, 35-1, 40-1, 110, 112, 113, 115, 116, 117, 130, 142 (15 종)
- SMT 73, 80 (2 종)
- JBR 025, 029, 033, 034, 037, 051, 062, 083, 096, 105, 141, 143, 144, 164, 180, 182, 184, 187, 192, 194, 205, 212, 225, 232, 243, 267, 285, 337, 348, 363, 383, 420, 444, 450, 452, 460, 478, 479, 487, 497, 525, 560, 562, 584, 598, 609 (46 종)

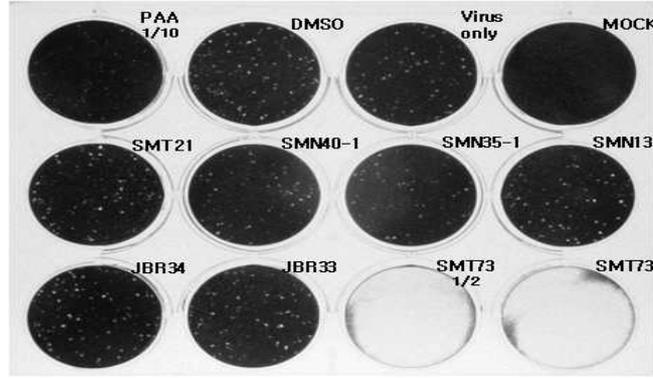
→ 총 63 종

7) 국내 천연자원의 항바이러스 활성 스크리닝 결과 검증 - Plaque reduction assay

가) 세포기반 GFP 활성 항바이러스 활성 스크리닝 방법은 HTS가 가능하고 다양한 기전을 가진 항바이러스 후보물질을 효율적으로 도출해 내는 반면 결과 분석이 정량적이라기보다는 정성적이라는 한계가 있음. 따라서 스크리닝 결과 검증을 위해 사용한 plaque reduction assay는 시간과 비용, 그리고 노동력이 많이 드는 단점이 있는 반면 항바이러스 활성 테스트에서 gold standard로 쓰이는 전통적인 방법으로 EC₅₀ 등의 항바이러스 역가 도출에 매우 유용한 정량적인 분석법임

나) 또한 plaque reduction assay는 추출물을 세포와 5일간 배양하기 때문에 장기간 노출에 의한 세포독성 또한 동시에 확인할 수 있는 장점이 있음

다) 상기 63 종의 화합물에 대해 바이러스 생성을 감소시키는 지 확인하기 위해 plaque reduction assay를 수행하였고, 63종 모두 바이러스 감염 대조군에 비해 plaque 감소시키는 결과를 보임으로 본 연구진의 세포기반 스크리닝의 결과가 일치하였음



후보물질에 대한 plaque reduction assay의 결과 예시

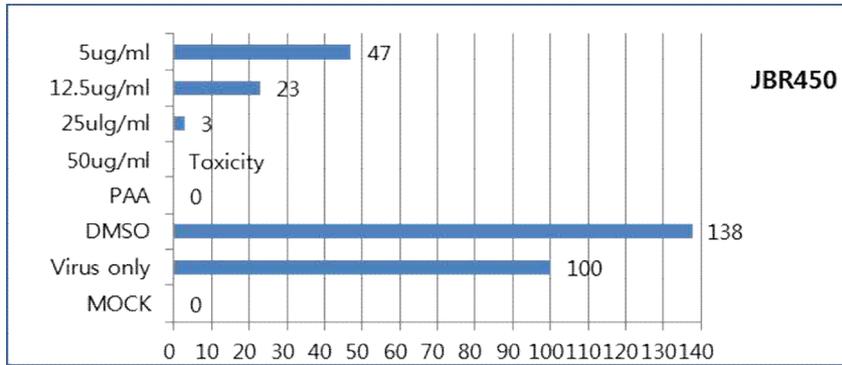
- Cytotoxicity가 강하게 보인 SMT73의 경우 1/2 용량인 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose도 함께 사용하였으나 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군과 동일한 결과를 얻음
- PAA는 phosphanoic acetic acid인 헤피스바이러스 DNA polymerase inhibitor로서 양성대조군으로 사용함. Virus only와 DMSO 처리군에서 나타난 plaque의 수를 감소시켜주는 효과를 검증함

라) 천연물을 처리하지 않은 바이러스 단독감염을 100%로 하였을 때 천연물 처리 시 나타나는 plaque의 개수를 상대적인 %로 정량화 한 뒤, 세포 독성 없이 50% 미만으로 줄여주는 탁월한 항바이러스 효능을 보이는 후보 천연물질을 우선 후보물질로 선별하였음



Plaque reduction assay 결과 정량화 예시. 바이러스 감염에 대해 천연물 후보물질 처리후 plaque reduction을 보여주는 결과. 바이러스 단독감염에서 나타난 plaque의 개수를 100%로 하였을 때 대조군 대비 50 % 미만으로 감소시킨 천연물을 우선 선별 후보물질로 분류함

- 마) Plaque reduction assay을 통해 50% 미만으로 plaque 줄여주는 항바이러스 효과를 최종 검증한 선별후보물질은 총 17 종류로 다음과 같음
 - SMN 115, 130, 142 & JBR 83, 164, 180, 363, 450, 460, 478, 487, 525, 560, 562, 584, 598, 609 → 총 17 종
- 바) 우선 선별 후보물질에 대해 대략적인 IC_{50} 을 도출하고자 dose dependency 연구를 천연자원 추출물을 50, 25, 12.5, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하고 plaque reduction assay 결과를 분석하여 수행하였음 - JBR450의 예시



JBR450 추출물의 용량 의존적 항바이러스 활성. JBR450 추출물을 50, 25, 12.5, 5 µg/ml 농도로 처리하고 plaque reduction assay를 수행하여 나타나는 바이러스 감염 대조군 대비 상대적인 plaque의 개수 (%)로 표시함

사) 1차 스크리닝을 통해 선별된 국내자원식물 추출물 중 채집시기, 유통, 재배단지육성 등을 고려하여 HCMV에 대한 항바이러스 효능을 가진 식물 20종, EBV에 대한 항바이러스 효능을 가진 식물 2종을 각각 선정하였음

최종 소재 선별을 위한 20종 구축 현황

Extracts with antiviral effect	No.	시료명	식물명	학명	부위
Anti-HCMV	1	SMN-30	개망초	<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.	전초
	2	SMN-32	질경이	<i>Plantago asiatica</i>	전초
	3	SMN-81	쑥부쟁이	<i>Aster yomena</i> (Kitam.) Honda	전초
	4	SMN-110	밤나무	<i>Castanea crenata</i> Siebold & Zucc.	잎
	5	SMN-115	가죽나무	<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.)	잎+가지
	6	SMN-130	조팝나무	<i>Spiraea prunifolia</i> var <i>simpliciflora</i>	잎+가지
	7	SMT-21	구절초	<i>Chrysanthemum Zawadskii</i> Hercich var. <i>latilobum</i> (Maxim.) Kitan	전초
	8	SMT-29	낭독	<i>Euphorbia fischeriana</i> Steudel	뿌리
	9	SMT-58	목향	<i>Aucklandia lappa</i> Decne	뿌리
	10	JBR-37	생달나무	<i>Cinnamomum japonicum</i> Sieb.	잎
	11	JBR-78	협죽도	<i>Nerium indicum</i> Mill.	잎
	12	JBR-83	담팔수	<i>Elaeocarpus sylvestris</i> var. <i>ellipticus</i> (Thunb.) Hara	잎
	13	JBR-96	비쭈기나무	<i>Cleyera japonica</i> Thunb.	잎
	14	JBR-112	젓나무	<i>Abies holophylla</i> Max.	잎
	15	JBR-180	당유자	<i>Citrus grandis</i> Osbeck	잎
	16	JBR-324	갯까치수영	<i>Lysimachia mauritiana</i> Lam.	전초
	17	JBR-450	통탈목	<i>Tetrapanax papyrifera</i> K.koch	잎
	18	JBR-525	매죽나무	<i>Styrax japonica</i> S.etZ.	열매
	19	JBR-560	밤나무	<i>Castanea crenata</i> S.etZ.	잎
	20	JBR-598	천선과나무	<i>Ficus erecta</i> Thunb.	잎
Anti-EBV	1	MPRB-KR-04-00034	감국	<i>Chrysanthemum indicum</i> Linne	전초
	2	MPRB-VN	타마린드	<i>Tamarindus indica</i> L.	

연구물질로 선정된 추출물의 IC₅₀

					MHV-68	KSHV	EBV	
1	SMN30	개망초						
2	SMN32	질경이						
3	SMN81	쑥부쟁이						
4	SMN110	밤나무						
5	SMN115	가죽나무	<i>Ailanthus altissima (Mill.) Swingle for. Altissima</i>	잎+가지	★	★	★	
6	SMN130	조팝나무						
7	SMT21	구절초						
8	SMT29	낭독						
9	SMT58	목향	-				★★	
10	JBR037	생달나무						
11	JBR078	협죽도	<i>Nerium indicum Mill</i>	잎		★★	★★	
12	JBR083	담팔수						
13	JBR096	비쭈기나무						
14	JBR112	젖나무						
15	JBR180	당유자						
16	JBR324	갯가지수염			★			
17	JBR450	통탈목	<i>Tetrapanax papyrifera K. Koch</i>	잎	★		★	
18	JBR525	때죽나무			★			
19	JBR560	밤나무						
20	JBR598	천선과나무						
Hit	JBR460	좀잠빛살나무	<i>Euonymus bungeanus Max</i>	잎	★★	★★	★	

IC ₅₀	
★	5~25ug/ml
★★	5ug/ml이하

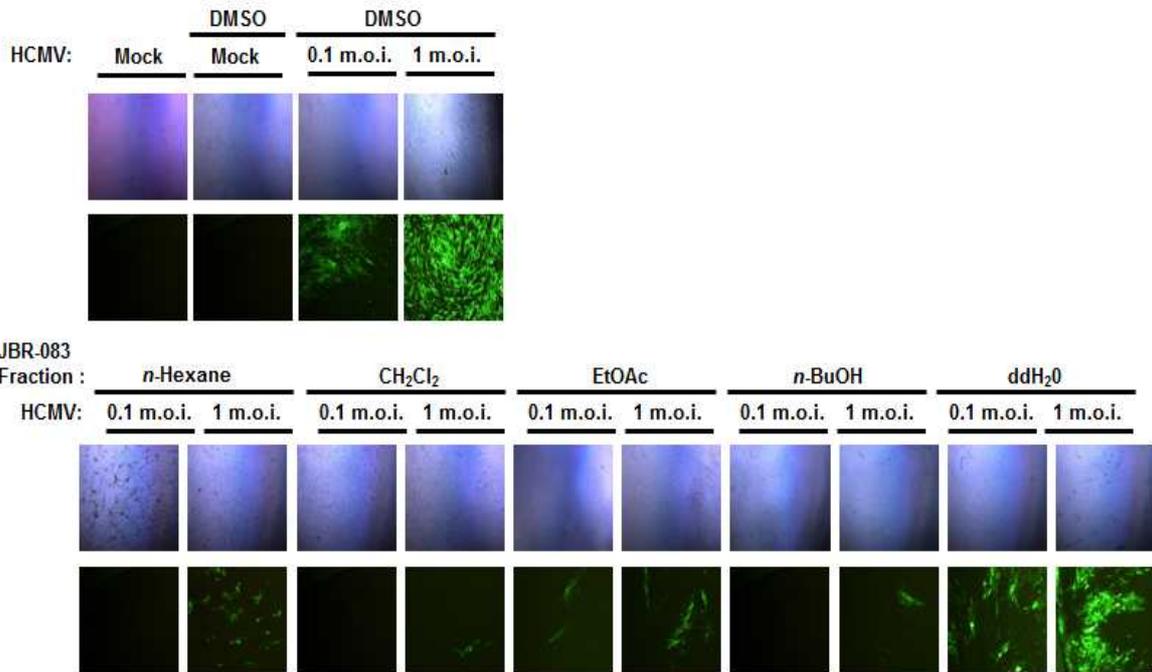
나. HCMV 억제제 발굴연구

1) 선별된 추출물의 분획물을 이용한 2차 스크리닝

- 가) HCMV에 대해 항바이러스 효능을 보이는 국내자원식물 20종의 경우, 효능 재검증하기 위한 반복 실험을 통해 상대적으로 항바이러스 효과가 미미했던 6종을 제외하고 최종적으로 14종을 재선별하였으며, activity-guided fractionation을 통해 *n*-Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, ddH₂O 총 5가지의 분획물을 확보함
- HFF 세포에 HCMV-GFP virus를 0.1, 1 m.o.i.로 감염시키 뒤, 감염된 세포에 DMSO (control) 또는 국내자원식물 추출물 14종의 분획물을 처리한 뒤 7일 후에 형광현미경을 이용하여 추출물 분획물이 바이러스 복제에 미치는 영향을 분석함
 - HCMV-GFP 및 형광현미경을 이용하여 항 HCMV 효능 가진 추출물 분획물을 2차 스크리닝한 결과, 질경이 (SMN-32), 낭독 (SMT-29), 담팔수 (JBR-083), 비쭈기나무 (JBR-096)가 가장 우수한 항 HCMV 효능을 나타냄

HCMV-GFP와 형광현미경을 이용한 항 HCMV 2차 스크리닝 결과

No.	시료명	식물명	Effects of anti-HCMV activity				
			<i>n</i> -Hexane	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	ddH ₂ O
1	SMN-30	개망초	+	+	+	+	-
2	SMN-32	질경이	++	++	+	+++	-
3	SMT-21	구절초	+	+	+	+	-
4	SMT-29	낭독	+	++	+	+++	-
5	SMT-58	목향	+	+	+	++	-
6	JBR-037	생달나무	+	+	+	+	-
7	JBR-078	협죽도	+	++	+	+	-
8	JBR-083	담팔수	+	+++	+	++	-
9	JBR-096	비쭈기나무	++	+++	+	++	-
10	JBR-112	젓나무	+	+	+	+	-
11	JBR-324	갯가치수영	+	+	+	+	-
12	JBR-525	매죽나무	+	+	+	+	-
13	JBR-560	밤나무	+	++	+	+	-
14	JBR-598	천선과나무	+	++	+	+	-

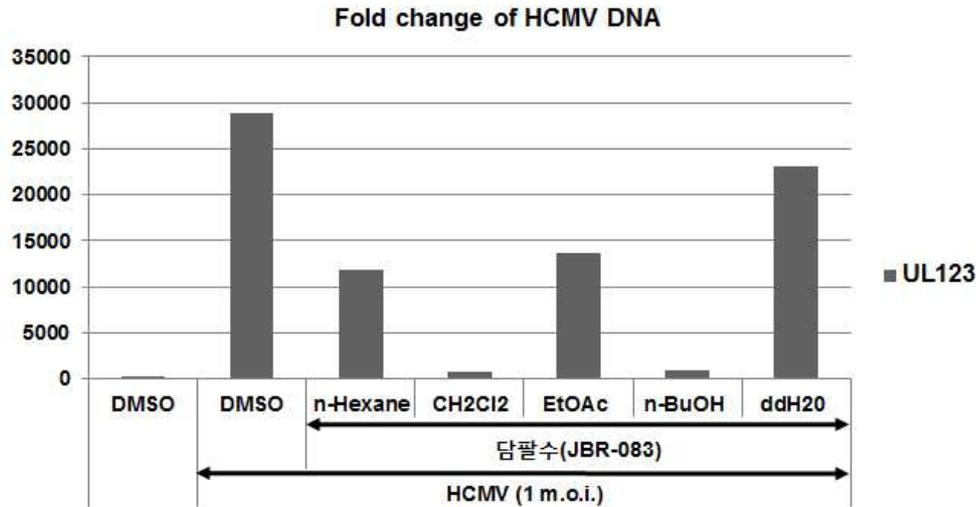


HCMV-GFP를 이용한 담팔수 분획물의 항바이러스 효능

2) 분획물의 항바이러스 효능의 정량적 심화분석

가) 2차 스크리닝을 통해 선별된 4종의 국내자원식물 추출물 분획물에 대하여 real-time PCR을 이용하여 항바이러스 효능을 정량적으로 분석함

- HFF 세포에 HCMV-GFP virus를 1 m.o.i로 감염시킨 후 감염된 세포에 DMSO (control) 또는 국내자원식물 추출물 4종의 분획물을 각각 처리한 뒤 7일 후에 세포를 수확하여 whole genomic DNA를 isolation 함. HCMV immediate-early gene인 UL123와 housekeeping gene인 β -actin primer를 이용한 PCR 및 quantitative PCR을 통해 분획물의 바이러스 복제 억제 효능을 분석하였음



Real-time PCR을 이용한 담팔수 분획물의 항바이러스 효능

- 담팔수의 경우 HCMV-GFP를 이용한 항바이러스 효능 분석 결과와 유사하게 분획물의 CH₂Cl₂와 *n*-BuOH 층에서 효과적으로 바이러스의 복제를 억제 하는 것으로 나타났다

3) 항바이러스 후보물질의 바이러스 작용점 분석 및 표적 분석

가) 1차 스크리닝 및 항 HCMV 효능 분석을 통해 선별된 국내자원식물 추출물 또는 분획물의 항바이러스의 Immediate Early, Early, Late gene 발현 분석 또는 Western blot analysis을 통해 규명함

- Human foreskin fibroblast에 HCMV-GFP virus를 1 m.o.i로 감염 시킨 후 감염된 세포에 DMSO(control) 또는 선별된 국내자원식물 추출물 또는 분획물을 각각 처리한 뒤 7일 후에 세포를 수확하여 total RNA를 extraction 함. HCMV immediate-early gene (UL122), early gene (UL44), late gene (UL83)와 house keeping gene인 beta-actin을 이용한 qRT-PCR을 통해 식물 추출물의 항바이러스 작용기전을 분석함

- Human foreskin fibroblast에 HCMV-GFP virus를 1 m.o.i로 감염 시킨 후 감염된 세포에 DMSO (control) 또는 선별된 국내자원식물 추출물을 각각 처리한 뒤에 시간대 별로 24시간, 48시간, 72시간 후에 세포를 수확하여 whole cell lysate을 얻음. Anti-CMV early antigen IE86 항체를 이용한 Western blot analysis를 통해 식물 추출물의 항바이러스 작용점을 분석함

- 담팔수 추출물 (JBR-083)의 항바이러스 (항 HCMV) 효능 및 작용기전 규명에 관한 연구결과는 국외저널 Molecular Medicine Reports (SCIE)에 게재된 상태임 (논문명: The extract of *Elaeocarpus sylvestris* inhibits human cytomegalovirus immediate-early gene expression and replication *in vitro*, To Kim phuong et al., 2013).

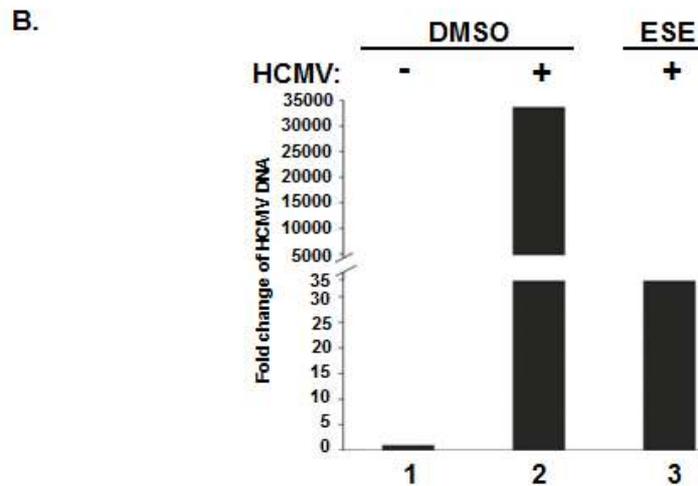
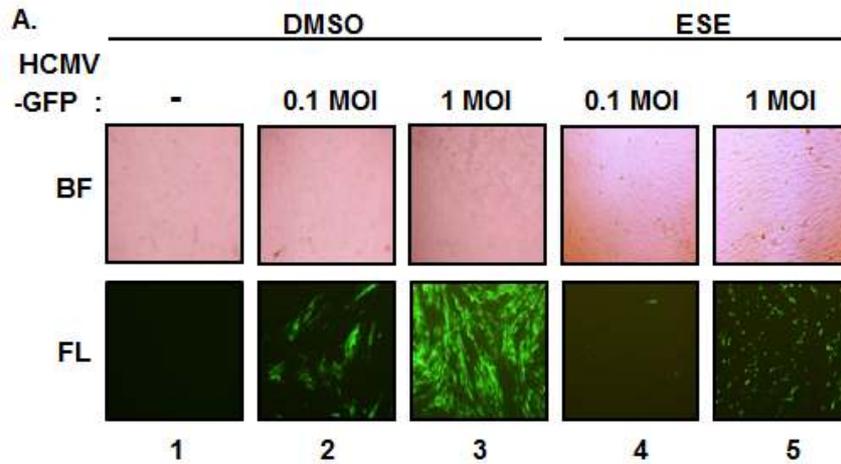
나) 담팔수 추출물 연구내용

○ 담팔수 추출물(ESE)에 의한 HCMV 복제 억제 효과

- HCMV-GFP와 형광현미경을 사용하여 담팔수 추출물의 HCMV 복제 억제 효능을

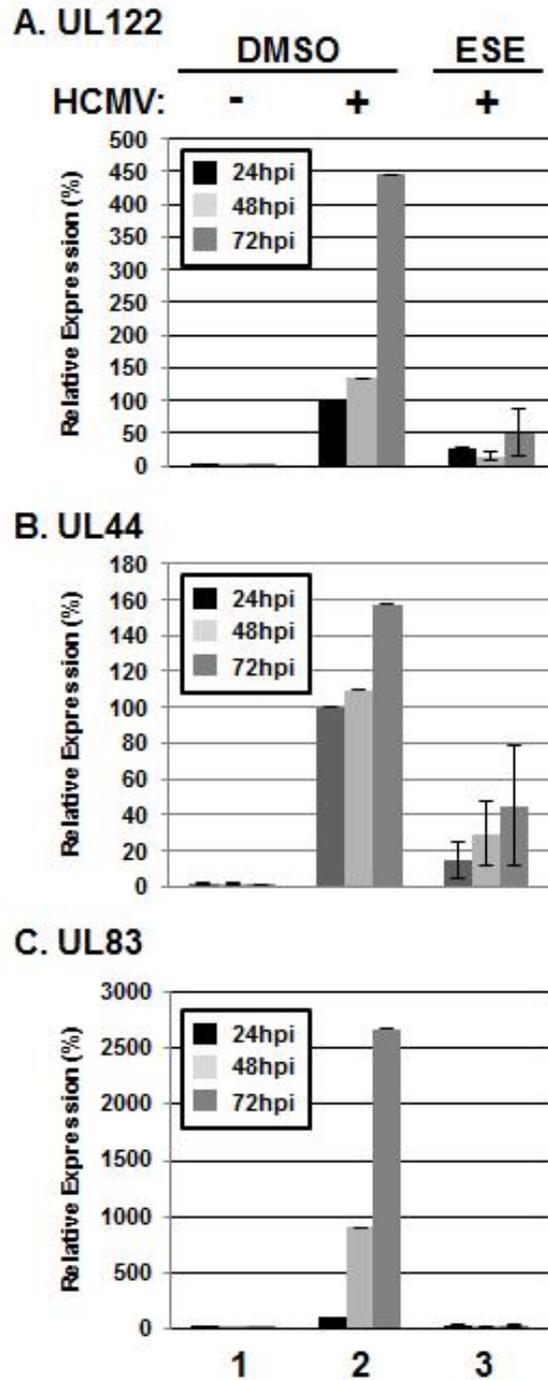
확인한 결과, 담팔수 추출물을 처리함에 따라 HCMV의 복제가 0.1과 1 m.o.i.에서 모두 현저히 감소한 것을 확인하였음

- HCMV 복제 억제 효능의 정량적 분석을 위해 바이러스 유전자 UL123를 이용한 quantitative PCR을 수행한 결과, DMSO를 처리한 세포와 비교하여 담팔수 추출물을 처리한 세포에서 HCMV의 복제가 99.6% 감소한 것을 확인함
- 따라서, 담팔수 추출물이 HCMV 복제 억제 효능을 가짐을 확인하였음



담팔수 추출물에 의한 HCMV 복제 억제 효능

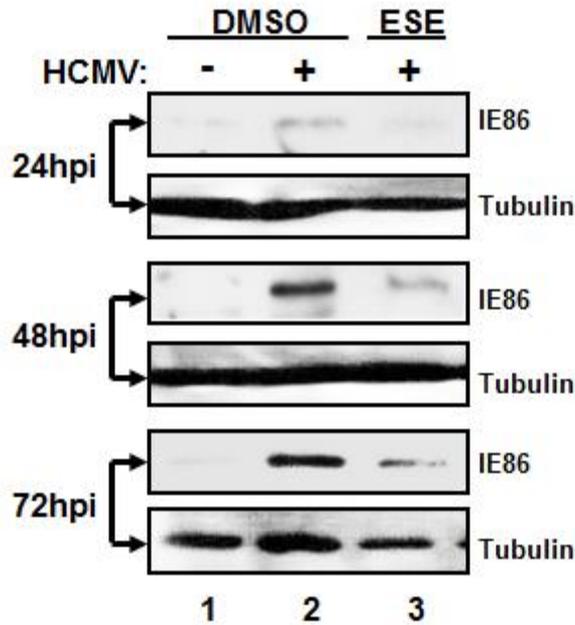
- 담팔수 추출물의 HCMV lytic gene 발현 저해
 - qRT-PCR을 통해서 담팔수 추출물이 HCMV의 Immediate Early (IE, UL122), Early (E, UL44), Late gene (L, UL83) 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, 담팔수 추출물에 의해서 IE, E, L gene 발현이 각각 차이를 나타내며 모두 현저히 감소한 것을 확인하였음
 - 따라서, 담팔수 추출물이 HCMV의 IE gene 발현을 저해함으로써 E, L gene의 발현을 저해 하는 것을 확인함



담팔수 추출물의 HCMV lytic gene 발현 억제

- 담팔수 추출물에 의한 HCMV major IE (MIE) gene 발현의 저해
 - 담팔수 추출물의 HCMV lytic gene 발현 저해 효능을 검증하기 위하여 HCMV MIE gene인 IE2 (UL122)에 의해 발현되는 단백질 IE86의 항체를 사용하여 Western blot analysis를 통해 분석함
 - qRT-PCR 결과와 일치하게 담팔수 추출물을 처리한 세포의 경우 HCMV IE86 단백질의 발현이 감소한 것을 확인함
 - 따라서, 담팔수 추출물이 HCMV의 IE gene의 발현을 down-regulation 함으로써

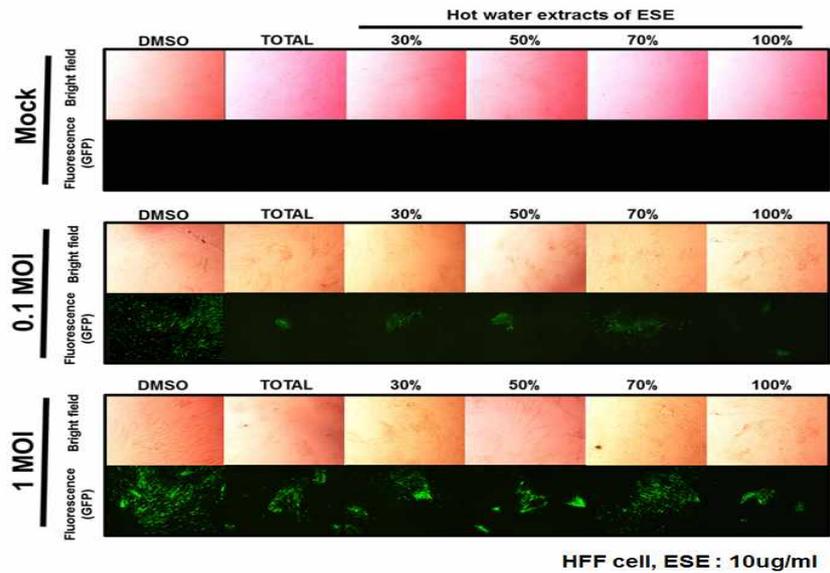
HCMV의 복제를 저해 하는 것으로 분석 됨



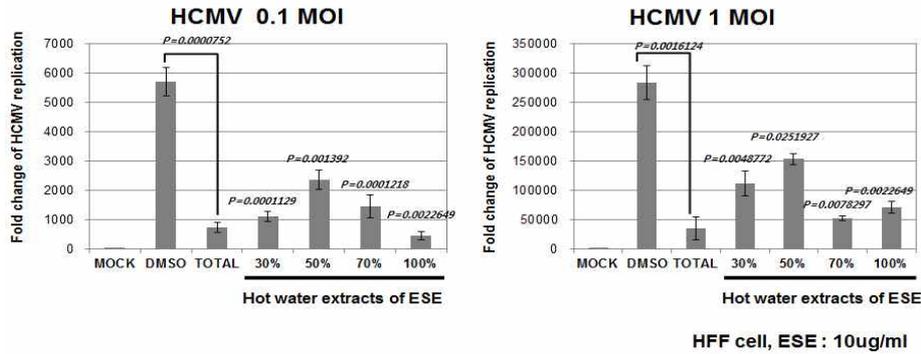
담팔수 추출물의 HCMV MIE gene 발현 억제

○ 담팔수 가열추출물의 HCMV 복제 억제 효능 평가

- HCMV-GFP와 형광현미경을 사용하여 담팔수 ethanol %별 가열추출물의 HCMV 복제 억제 효능을 평가한 결과, 담팔수 ethanol %별 가열추출물을 처리함에 따라 HCMV의 복제가 0.1과 1 m.o.i.에서 모두 현저히 감소한 것을 확인하였음

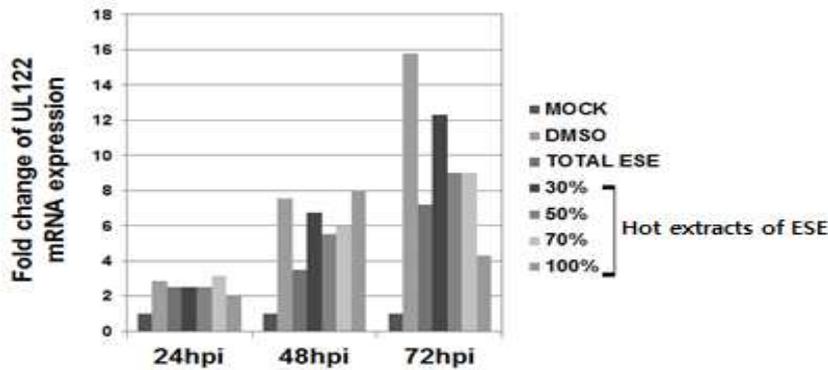


담팔수 EtOH %별 가열추출물의 HCMV 복제 억제 효능



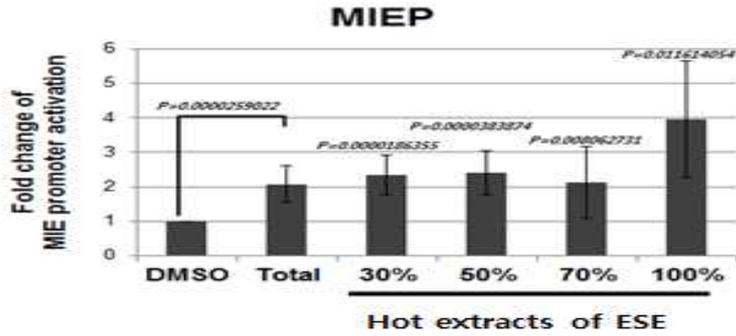
qRT-PCR을 이용한 담팔수 가열추출물의 HCMV 복제 억제 효능

- HCMV 복제 억제 효능의 정량적 분석을 위해 바이러스 유전자 UL123를 이용한 quantitative real-time PCR을 수행한 결과, DMSO를 처리한 세포와 비교하여 담팔수 ethanol %별 가열추출물을 처리한 세포에서 HCMV의 복제가 99.6 % 감소한 것을 확인함
- 따라서, 담팔수 ethanol %별 가열추출물이 HCMV 복제 억제 효능을 가짐을 확인함
- 담팔수 ethanol %별 가열추출물 항바이러스 작용점 확인
 - HCMV를 1 m.o.i로 감염시키고, 24, 48, 72시간 뒤에 세포를 harvest하여 담팔수 가열추출물이 HCMV Immediate early 2 (IE2) mRNA 발현에 미치는 영향을 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)를 통해 확인함으로써 작용점을 분석하였음.
 - 담팔수 가열추출물이 각각 차이를 나타내며 IE2 mRNA 발현을 억제하는 것으로 나타남



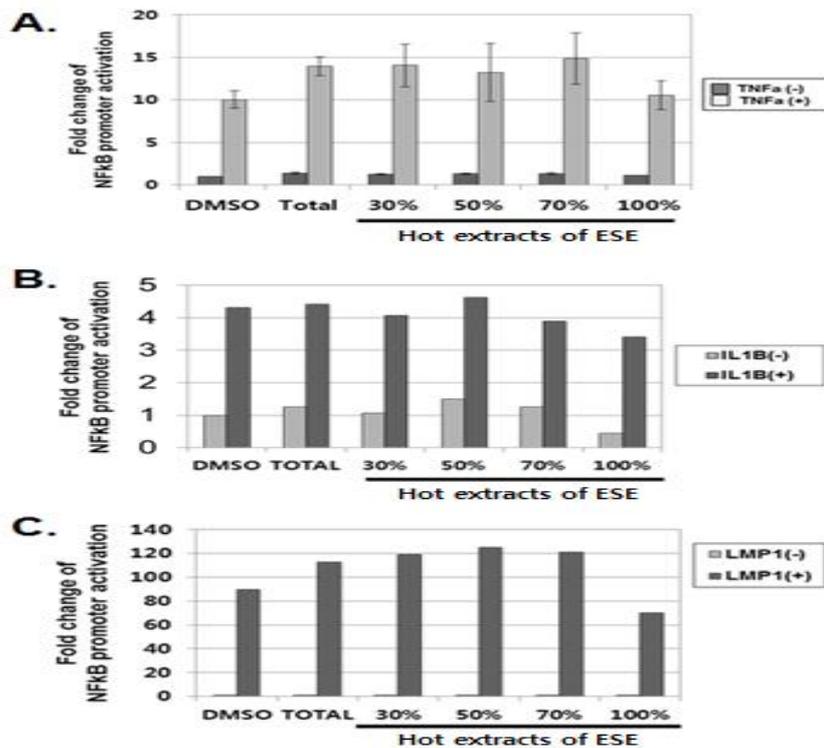
담팔수 추출물의 HCMV gene (IE2) 발현 억제

- 또한, 담팔수가 IE 유전자 발현을 조절하는 보다 명확한 작용기전을 분석하기 위하여 담팔수 가열추출물이 Major immediate early promoter (MIEP) 활성화를 저해 하는 것인지 Dual-luciferase assay (Promega)를 통해 확인하였음.
- HEK293 세포에 MIEP 활성화시 firefly luciferase를 발현하는 luciferase reporter gene과 renilla luciferase reporter gene을 transfection한 뒤, 24시간 뒤에 Dual-luciferase assay로 분석한 결과, 담팔수 가열추출물이 세포 내 MIEP 활성화에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타남.



담팔수 추출물이 MIEP 활성화에 미치는 영향

- 또한, HEK293 세포에 NF-κB promoter 활성화시 firefly luciferase를 발현하는 luciferase reporter gene과 renilla luciferase reporter gene을 transfection하고 24시간 뒤에 NF-κB 활성화를 유도하는 TNF-α 및 IL-1β를 6시간 처리하거나, luciferase gene과 함께 EBV LMP1을 발현 시킨 뒤에 Dual-luciferase assay (Promega)로 분석한 결과, 담팔수 가열추출물이 세포 내 MIEP 또는 NF-κB promoter 활성화에 영향을 미치지 않는 것으로 나타남.
- 따라서 담팔수가 MIEP 활성화를 유도하는 cellular factor들을 조절하기보다는 RNA stability에 영향을 주는 등의 다른 기전을 통해서 IE 유전자 발현을 조절할 것으로 사료되므로 추가 연구를 진행 중에 있음.



담팔수 가열추출물이 TNF-α에 의한 NF-κB 활성화에 미치는 영향

다) 낭독 및 비쭈기나무 연구내용

- 낭독 (SMT-29) 및 비쭈기나무 (JBR096) 추출물의 HCMV lytic gene 발현 저해
 - qRT-PCR을 통해서 낭독 및 비쭈기나무 추출물이 HCMV의 Immediate Early (IE,

UL122), Early (E, UL44), Late gene (L, UL83) 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, 낭독과 비쭈기나무 추출물에 의해 IE, E, L gene 발현이 각각 차이를 나타내며 감소하는 것을 확인하였음

- 따라서, 낭독 및 비쭈기나무 추출물이 HCMV의 IE gene 발현을 저해함으로써 E, L gene의 발현을 저해 할 것으로 사료 됨

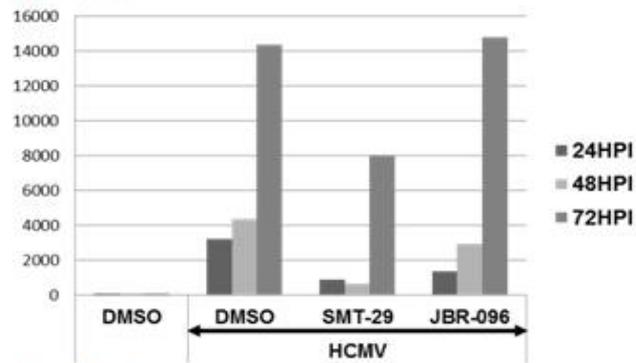
○ 낭독 및 비쭈기나무 추출물에 의한 HCMV major IE (MIE) gene 발현의 저해

- 낭독 및 비쭈기나무 추출물의 HCMV lytic gene 발현 저해 효능을 검증하기 위하여 HCMV MIE gene인 IE2 (UL122)에 의해 발현되는 단백질 IE86의 항체를 사용하여 Western blot analysis를 통해 분석함

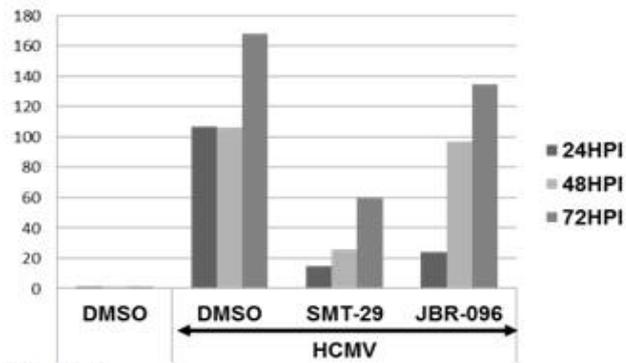
- qRT-PCR 결과와 일치하게 낭독 및 비쭈기나무 추출물을 처리한 세포의 경우 HCMV IE86 단백질의 발현이 감소한 것을 확인함

- 따라서, 낭독 및 비쭈기나무 추출물이 HCMV의 IE gene의 발현을 down-regulation 함으로써 HCMV의 복제를 저해 하는 것으로 사료 됨

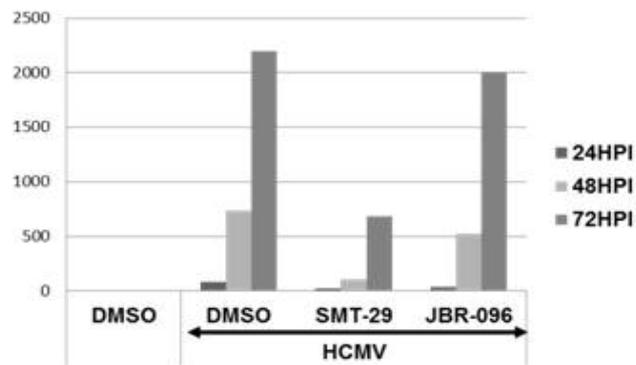
A. UL122



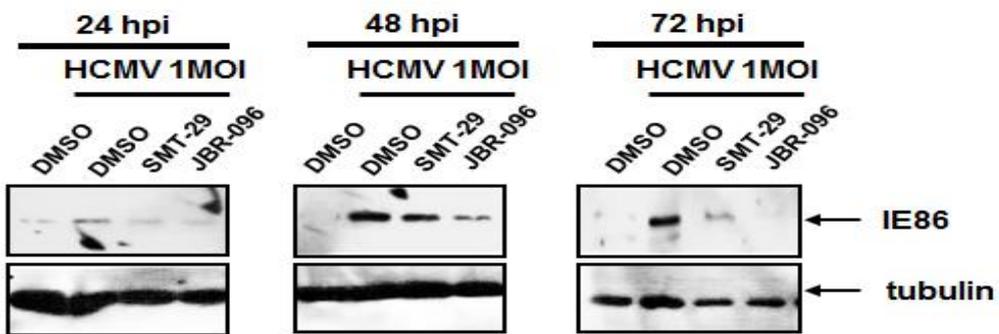
B. UL44



C. UL83



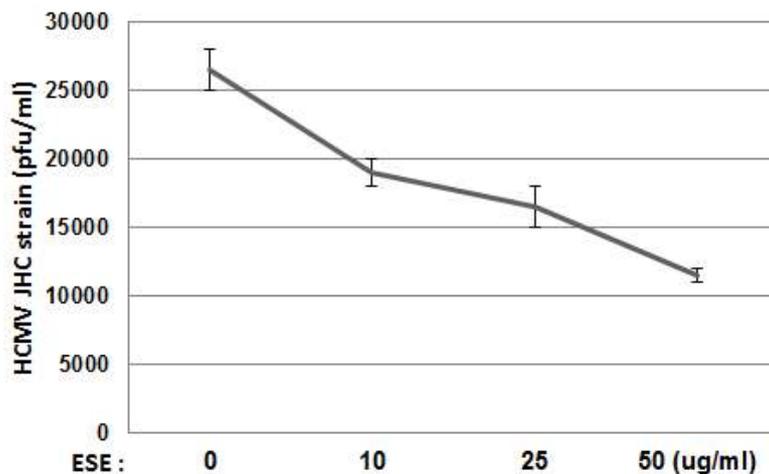
낭독 및 비쭈기나무 추출물에 의한 HCMV lytic gene 발현 억제



낭독 및 비쭈기나무 추출물에 의한 HCMV MIE gene 발현 억제

라) 항바이러스 천연물의 효능 및 독성 검증을 위한 동물모델 또는 Clinical isolates 연구 시스템 구축

- HCMV는 매우 엄격한 species specificity를 가지기 때문에 HCMV를 연구 할 수 있는 동물 모델 연구 시스템은 없음
- 동물 모델 연구 시스템으로서 Murine cytomegalovirus (MCMV)를 사용하는 연구를 이용할 수 있으나 유전체 정보의 차이로 인해 HCMV의 in vivo 모델로 사용하기에는 적절하지 않으며, 최근에는 실제 환자샘플로부터 분리해 낸 clinical isolates을 이용한 연구가 확대되는 추세임
- Clinical isolates을 이용한 연구 결과와 실험실에서 배양 가능한 바이러스 laboratory strains을 이용한 연구 결과도 현저한 차이를 나타낼 수 있다는 보고가 있으므로 본 연구과제의 항바이러스 후보물질의 효능을 clinical isolates 연구를 통해 검증 해보고자함
 - Clinical isolates JHC strain이 감염된 세포에 항바이러스 후보물질을 처리하고 항바이러스 효능을 확인함
 - JHC strain의 titer를 plaque forming unit 측정법을 통해 분석하여 실험에 사용함
 - HFF에 HCMV clinical isolate JHC를 다양한 m.o.i.로 감염 시킨 후 담팔수 추출물 (*Elaeocarpus sylvestris* extract, ESE, 50 µg/mL) 및 DMSO를 처리한 뒤 plaque reduction assay를 통해 담팔수가 바이러스 증식에 미치는 영향을 확인함
 - 담팔수 추출물 농도가 증가할수록 바이러스 plaque titer가 감소하는 것을 확인함



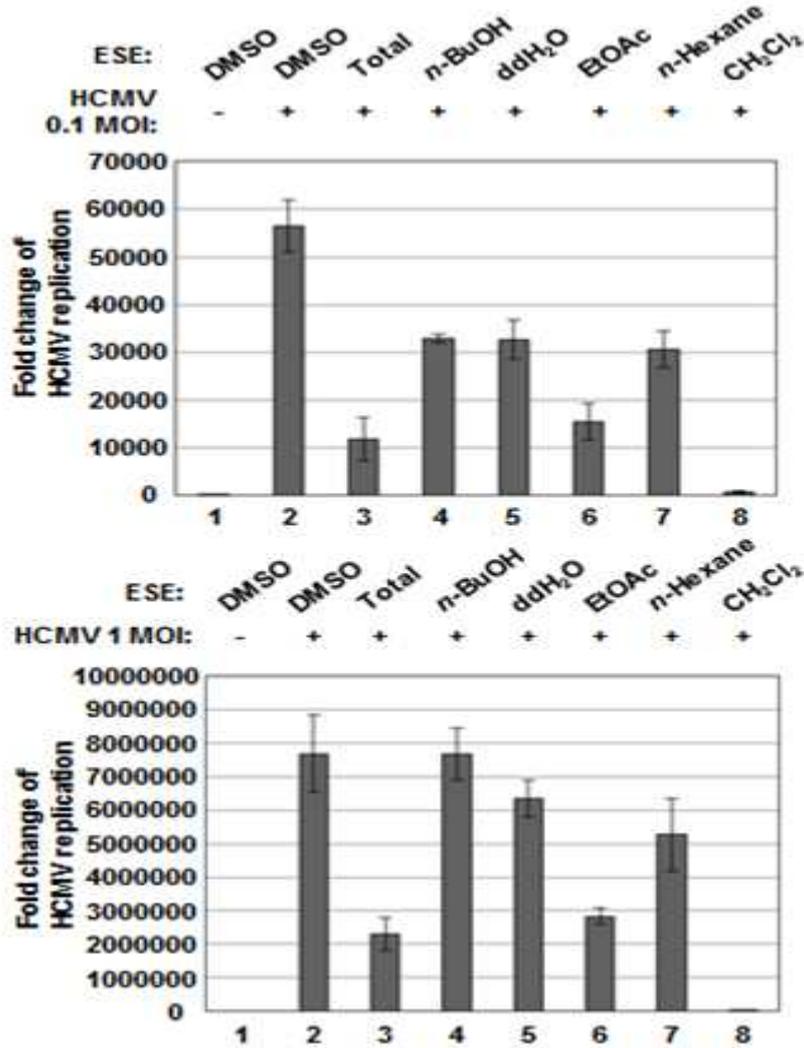
담팔수에 의한 바이러스 plaque reduction 확인

4) 항바이러스 천연물의 항바이러스 효능 검증 및 생체독성의 일차적 분석

가) 분획물의 항바이러스 효능의 정량적 심화분석

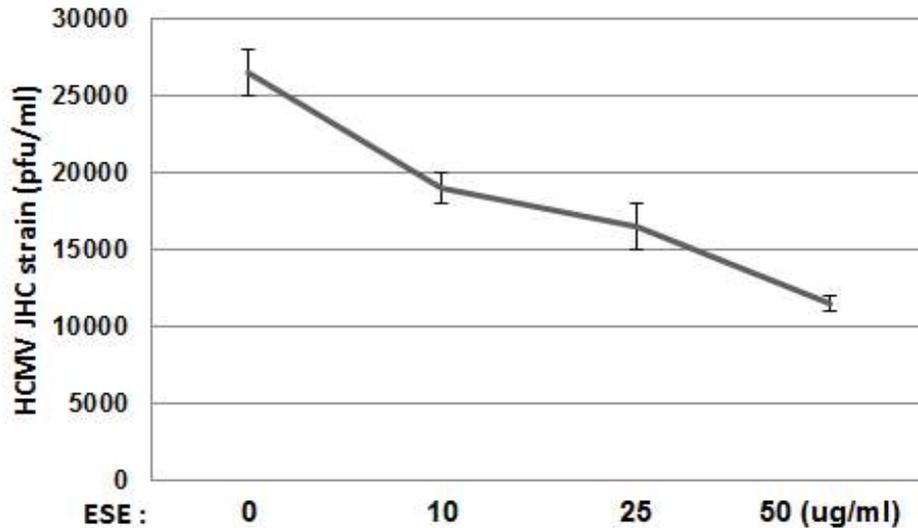
- HFF에 HCMV-GFP virus를 0.1과 1 m.o.i.로 감염 시킨 후 감염된 세포에 담팔수 분획물 (50 µg/mL)을 각각 처리한 뒤 3일 후에 세포를 수확하여 whole genomic DNA를 isolation 함. HCMV immediate-early gene인 UL123와 house keeping gene인 GAPDH primer를 이용한 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 통해 분획물의 바이러스 복제 억제 효능을 분석하였음
- HCMV 복제 억제 효능의 정량적 분석을 위해 바이러스 유전자 UL123을 이용한 qPCR을 수행한 결과, DMSO를 처리한 세포와 비교하여 담팔수 EtOAc층의 분획물을 처리한 세포에서 HCMV의 복제가 감소한 것을 확인함. CH₂Cl₂층의 경우, 육안으

로 관찰시 세포사멸을 동반하였으므로 바이러스 복제에 특이적인 감소로 보이지 않으며 세포독성 실험이 필요하다고 판단하였음



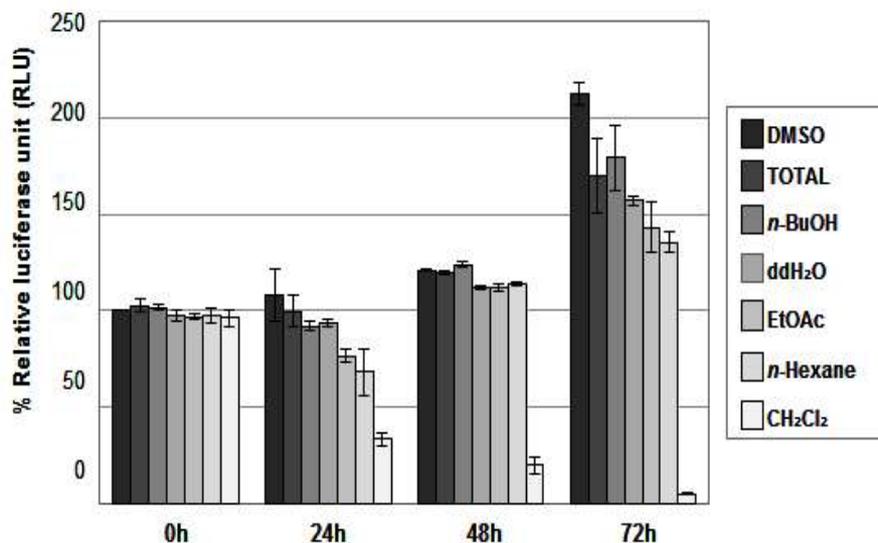
qPCR을 이용한 담팔수 분획물의 HCMV 복제 억제 효능 검정

- 또한, Plaque reduction assay를 통해 담팔수 EtOAc층의 분획물의 농도가 증가함에 따라 HCMV 억제 효과가 증가하는 것을 확인하였고 IC₅₀ (50% inhibitory concentration) 를 구해 적정 저해 농도를 구한 결과, 담팔수 EtOAc층의 분획물 26.09 µg/mL의 농도에서 HCMV의 활성이 50% 억제되는 것을 확인함

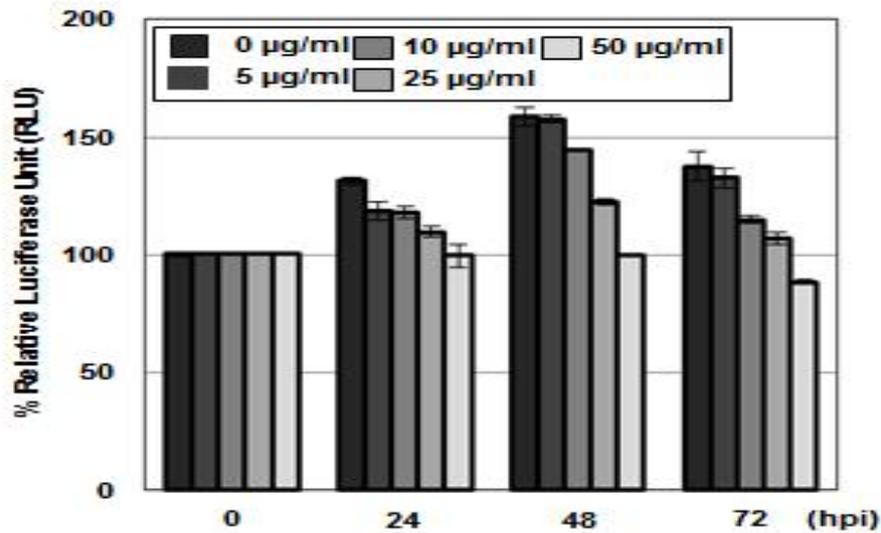


Plaque reduction assay를 이용한 담팔수 EtOAc층의 분획물의 HCMV 복제 억제 효능 검증

- 따라서 담팔수 분획물의 EtOAc층이 HCMV의 복제 억제 효능을 가짐을 확인함
- 나) 후보물질의 기타 세포 생리에 미치는 영향 분석
 - HCMV gene의 발현과 복제에 대한 담팔수 분획물의 저해 효능이 세포독성에 의한 것인지를 CellTiter-Glo assay를 통해 분석한 결과, HFF 세포에서 담팔수 total extract, 분획물 *n*-BuOH, ddH₂O, EtOAc, *n*-Hexane을 처리한 경우에는 DMSO를 처리한 세포와 유사한 세포 생존률을 나타내었으나, 분획물 CH₂Cl₂층을 처리한 경우 세포 사멸이 유도되었음
 - 또한, HCMV gene의 발현과 복제에 대한 담팔수 EtOAc층 분획물의 저해 효능이 세포독성에 의한 것인지를 확인하기 위해 담팔수 EtOAc층을 농도별로 처리하고 시간 별로 CellTiter-Glo assay를 통해 분석한 결과, 담팔수 EtOAc층 분획물 처리 농도 50 µg/mL, 처리 시간 72시간까지는 DMSO를 처리한 세포와 유사한 세포 생존률을 나타내어 세포독성에 큰 영향을 미치지 않은 것을 확인함



HFF 세포에서의 담팔수 분획물의 세포 독성 분석

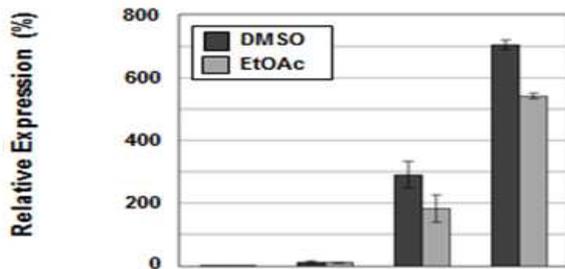


HFF 세포에서 담팔수 EtOAc 층의 세포 독성 분석

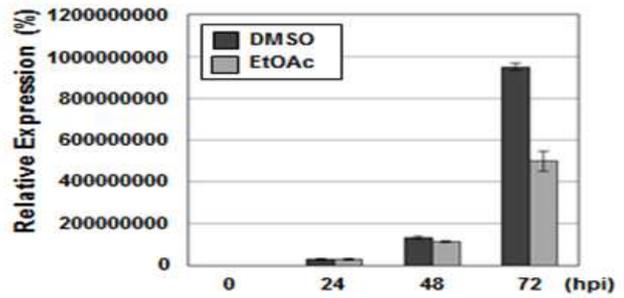
다) 항바이러스 후보물질의 작용점 분석

- 담팔수 각 분획물 중 항바이러스 효능을 나타낸 EtOAc층의 분획물이 HCMV의 lytic gene (IE, E, L) 발현에 미치는 영향을 qRT-PCR 또는 Western blot analysis 을 통해 규명함
- HFF 세포에 HCMV를 1 m.o.i.로 감염 시킨 후 분획물 EtOAc층을 50 µg/mL 농도로 처리하고 시간대 별로 0시간, 24시간, 48시간, 72시간 후에 세포를 수확하여 total RNA를 분리함. HCMV immediate-early gene (UL122), early gene (UL44), late gene (UL83)과 house keeping gene인 GAPDH의 primer를 이용한 qRT-PCR을 통해 EtOAc 분획물의 항바이러스 작용기전을 분석함
- qRT-PCR을 통해서 EtOAc층의 분획물이 HCMV의 IE (UL122), E (UL44), L (UL83) gene의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, 분획물 EtOAc층에 의해 IE, E, L gene의 mRNA 발현이 모두 감소한 것을 확인하였음

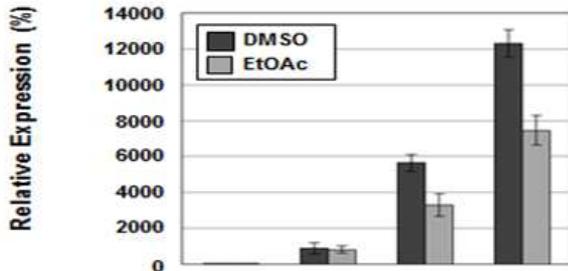
UL122



UL83

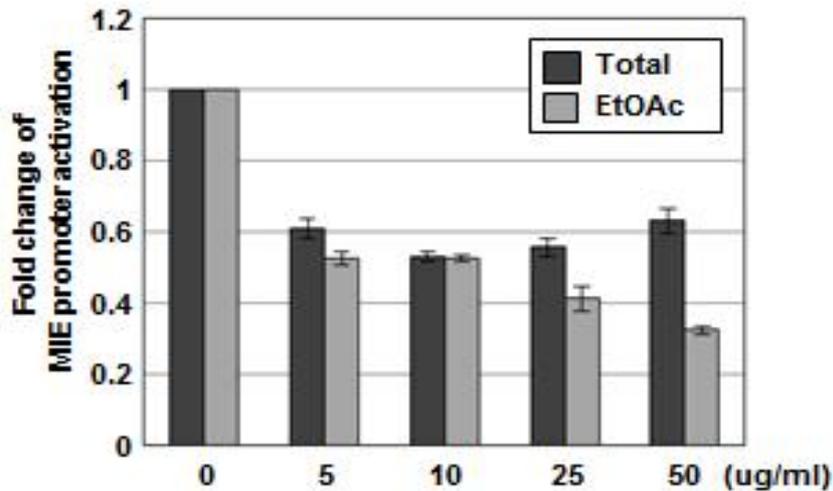


UL44



담팔수 EtOAc층의 분획물의 HCMV lytic gene 발현 억제 효과

- 따라서, 담팔수 EtOAc층의 분획물이 HCMV의 IE gene 발현을 저해함으로써 E, L gene의 발현을 저해 하는 것으로 사료됨
- 담팔수 EtOAc층이 IE 유전자 발현을 조절하는 작용기전을 분석하기 위하여 담팔수 EtOAc층이 Major immediate early promoter (MIEP) 활성화를 저해 하는 것인지 Dual-luciferase assay (Promega)를 통해 확인하였음
- HEK293 세포에 MIEP 활성화시 firefly luciferase를 발현하는 luciferase reporter gene과 internal control인 renilla luciferase reporter gene을 co-transfection한 뒤 6시간 후에 담팔수 total 추출물과 분획물 EtOAc층을 처리하고 24시간 뒤에 Dual-luciferase assay로 분석한 결과, 담팔수 total 추출물과 분획물 EtOAc층의 농도가 증가함에 따라, 세포 내 MIEP 활성이 감소하는 것을 확인함



담팔수 EtOAc층의 분획물이 MIEP 활성화에 미치는 영향

다. Epstein-Barr virus (EBV) 억제제 발굴 연구

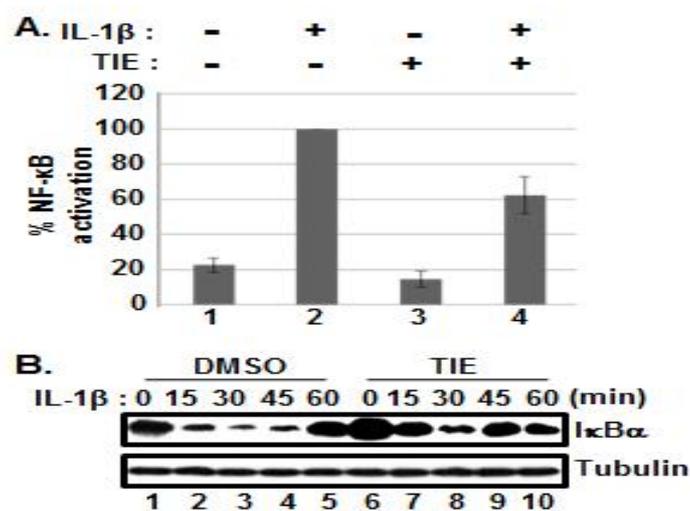
1) EBV에 대한 항바이러스 효능을 보이는 식물의 경우, 국내자원식물 추출물 188종의 스크리닝을 통해 선정된 식물 추출물 중 EBV에 의한 형질전환 된 세포인 lymphoblastoid cell line (LCLs)의 사멸 유도에 높은 효능을 보인 식물 추출물 2종 감국 (*Chrysanthemum indicum* Linne extract, CIE)과 타마린드 (*Tamarindus indica* L. extract, TIE)를 선정하여 항바이러스 효능 및 기전 분석 실험을 수행하였음

- 타마린드 (TIE)의 항바이러스 (항 EBV) 효능 및 작용기전 규명에 관한 연구 결과는 국내저널 Molecular and Cellular Toxicology (SCIE)에 게재하였음 (논문명: The extract of *Tamarindus indica* L. suppresses IKK β activity and NF- κ B-dependent lymphoblastoid cell line survival, 임수연 et al., 2013).

가) 타마린드 추출물 연구내용

○ 타마린드 추출물(TIE)의 IL-1 β 에 의한 NF- κ B 활성화 억제

- IL-1 β 에 의한 NF- κ B 활성화에 대한 TIE의 억제 효능을 NF- κ B dependent luciferase reporter assay를 통해 분석한 결과, DMSO를 처리한 세포와 비교하여 TIE를 처리한 세포에서 IL-1 β 에 의한 NF- κ B 활성화가 약 37% 감소하였음
- TIE의 작용점을 분석하기 위하여 TIE에 의한 IL-1 β 에 의한 IKK β 의 활성화를 항 I κ B α 항체를 사용하여 분석한 결과, TIE를 처리한 세포에서 IL-1 β 에 의한 I κ B α 의 degradation이 현저히 감소하는 것을 확인하였음
- 따라서, TIE가 IKK β 의 활성화를 저해함으로써 IL-1 β 에 의한 NF- κ B 활성화를 저해를 확인함



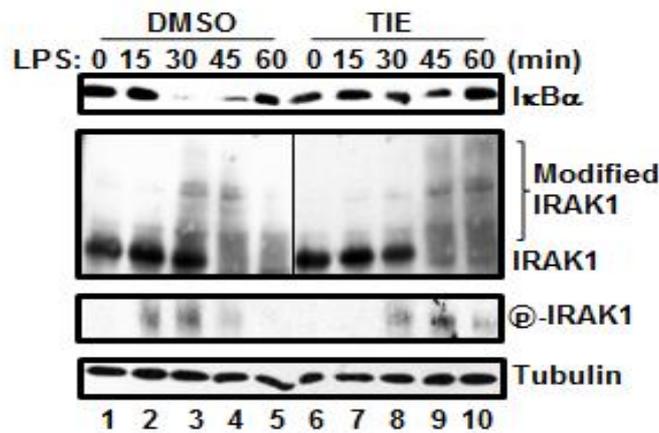
타마린드 추출물의 IL-1 β 에 의한 NF- κ B 활성 저해 효능

○ TIE의 LPS에 의한 NF- κ B 활성화 저해

- IL-1 β 와 유사하게 NF- κ B 활성화 경로를 활성화 시키는 사이토카인인 LPS에 의한 NF- κ B 활성화 경로에 TIE가 미치는 영향을 분석한 결과, IL-1 β 와 유사한 결과로 TIE에 의해서 LPS에 의한 I κ B α 의 degradation이 저해 된 것을 확인함
- NF- κ B 활성화 경로에서 TIE의 작용점 또는 표적 단백질이 IKK β 또는 IKK β 의 상

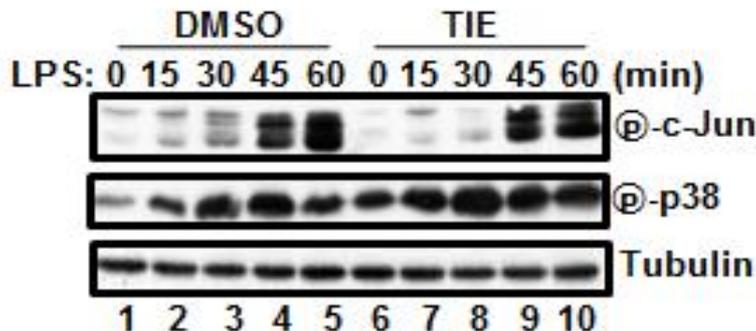
위단계 (upstream)에 존재하는 신호전달 단백질인지 분석하기 위해서 IL-1 β 및 LPS에 의한 IKK β 활성화에 필수적인 역할을 하는 IRAK1 단백질의 post-translational modification (인산화, 유비퀴틴화)에 TIE가 미치는 영향을 분석함

- DMSO를 처리한 세포와 비교하였을 때, TIE가 LPS에 의한 IRAK1의 인산화와 modification, degradation에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인함
- 따라서, TIE가 IKK β 또는 IKK β 의 upstream 및 IRAK1의 하위단계 (downstream)에 위치하는 신호전달단백질을 저해함으로써 IL-1 또는 LPS에 의한 NF- κ B 활성화를 억제 할 것으로 분석됨



타마린드 추출물의 LPS에 의한 IKK β 활성화 저해 효능

- TIE가 LPS에 의한 JNK 및 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향
 - LPS에 의한 JNK 및 p38 MAPK의 활성화 경로에 TIE가 미치는 영향을 항 phospho-c-Jun 또는 항 phospho-p38 MAPK 항체로 분석한 결과, DMSO를 처리한 세포와 TIE를 처리한 세포에서 모두 LPS에 의한 JNK 및 p38 MAPK의 활성화가 유도 된 것을 확인하였음

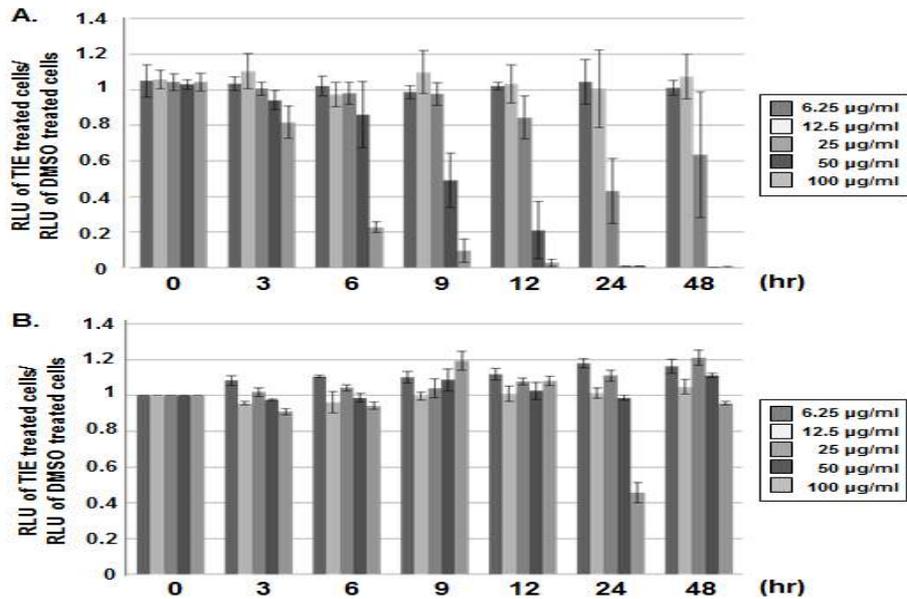


TIE가 LPS에 의한 JNK 및 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향

- 따라서, TIE는 LPS에 의한 JNK 및 p38 MAPK의 활성화에 저해 효능을 갖지 않음을 확인함
- TIE에 의한 NF- κ B 의존적 LCL 세포의 사멸
 - NF- κ B의 활성화는 EBV에 의해 형질전환 된 세포인 LCL의 생존에 필수적인 신호이므로 TIE가 NF- κ B 의존적인 세포 LCL과 비의존적 세포인 HeLa cell의 사멸을

유도하는지 CellTiter-Glo assay를 통해 분석하였음

- NF- κ B 비의존적 세포 HeLa에서는 TIE에 의한 세포사멸이 거의 나타나지 않은 반면에 NF- κ B 의존적 세포인 LCL에서는 dose-dependent, time-dependent하게 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였음



NF- κ B dependent, independent 세포에서 TIE가 세포 생존에 미치는 영향

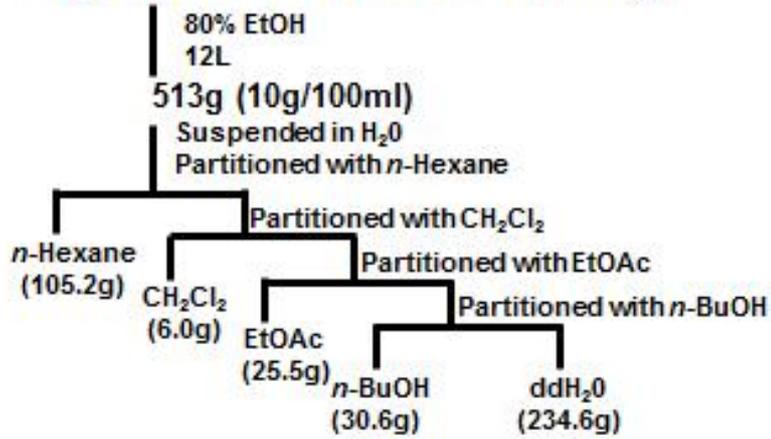
나) 감국 추출물 및 분획물의 연구내용

- 감국(CIE)의 분획물의 항바이러스(항 HCMV) 효능 및 작용기전 규명에 관한 연구 결과는 현재 국제저널 PLOS ONE (SCIE)에 제출하여 revision 단계임 (논문명: Lupeol Is One of Active Components in the Extract of Chrysanthemum indicum Linne That Inhibits LMP1-Induced NF- κ B Activation, 강세찬 et al., 2013)

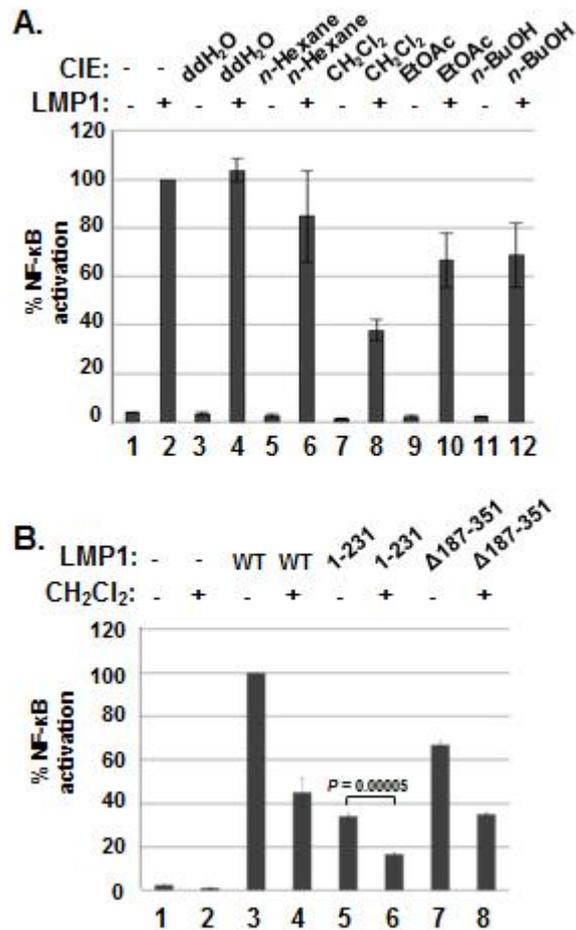
○ 감국추출물 (CIE)의 분획물이 LMP1에 의한 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

- LMP1에 의한 NF- κ B 활성화를 효과적으로 억제 시키는 활성을 가진 구성성분을 선별하기 위하여, activity-guided fractionation을 통해 얻은 CIE의 5가지 분획물 *n*-Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, ddH₂O (경희대, 강세찬 교수 제공)의 NF- κ B 활성화 억제 효능을 NF- κ B dependent luciferase reporter assay를 통해 분석하였음
- LMP1에 의한 NF- κ B 활성화에서 5가지 분획물 중 CH₂Cl₂ 분획물이 약 62%의 현저한 감소를 나타내었으며, *n*-Hexane, EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 각각 18%, 35%, 31%의 감소를 나타내었음
- LMP1에 의한 NF- κ B 활성화에 가장 효과적인 억제 효능을 보인 CIE의 CH₂Cl₂ 분획물의 작용기전 분석을 위하여 LMP1 WT 및 CTAR1 (1-231) 또는 CTAR2 (Δ 187-351)에 의한 NF- κ B 활성화를 NF- κ B dependent luciferase reporter assay를 통해 분석하였음
- CIE의 CH₂Cl₂ 분획물에 의해 LMP1 CTAR1 또는 CTAR2에 의한 NF- κ B 활성화가 각각 51%, 54% 감소하는 것으로 나타났음

Chrysanthemum indicum L.(1.2kg)



감국추출물의 Fractionation scheme

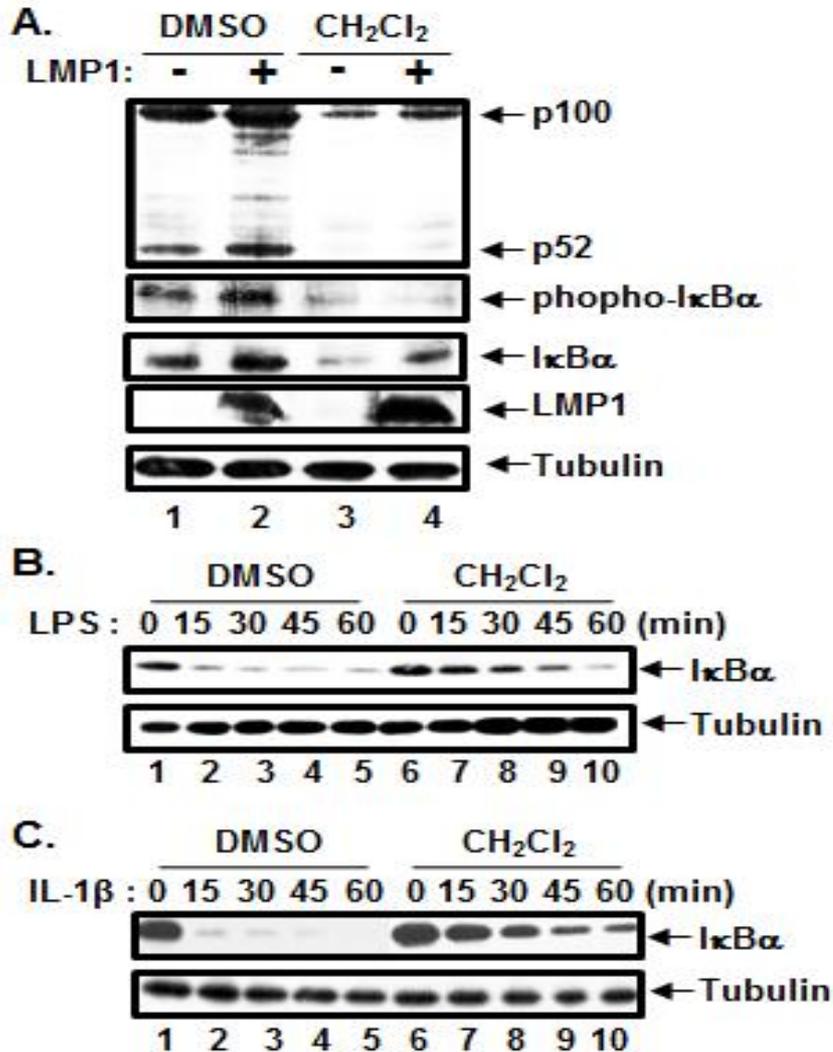


CIE CH₂Cl₂ 분획물의 LMP1에 의한 NF-κB 활성화 저해 효능

- CIE의 CH₂Cl₂ 분획물이 LMP1에 의한 IKK 활성화에 미치는 영향
 - LMP1 CTAR1 및 CTAR2에 의해서 활성화 되는 NF-κB의 non-canonical 및

canonical 경로에서 CIE CH₂Cl₂ 분획물의 작용점을 분석하기 위하여 IKK α 및 IKK β 의 활성화를 각각 p100 processing과 I κ B α 의 인산화를 통해 확인하였음

- DMSO를 처리한 경우 LMP1에 의하여 p100으로부터 p52로의 processing과 I κ B α 의 인산화가 증가 한 반면에 CIE CH₂Cl₂ 분획물을 처리한 경우 p100 processing과 I κ B α 의 인산화가 현저히 감소한 것을 확인함
- 추가적으로, CIE CH₂Cl₂ 분획물이 LPS 및 IL-1 β 에 의한 IKK β 활성화에도 저해 효능을 가진 것을 확인하였음

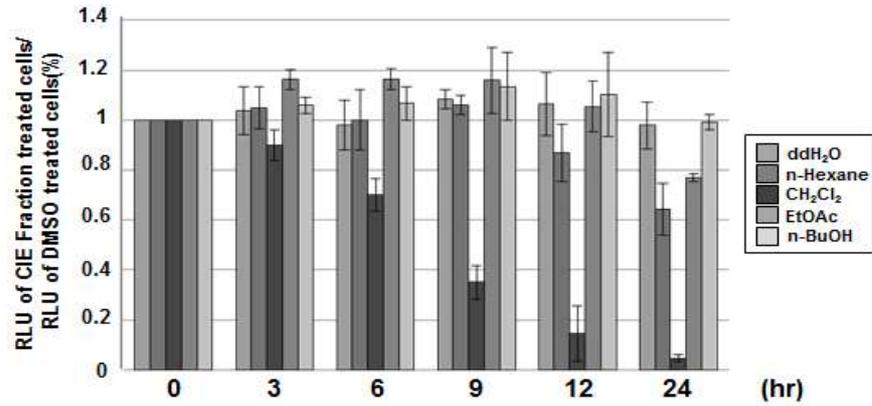


CIE CH₂Cl₂ 분획물의 LMP1에 의한 IKK 활성화 저해 효능

○ CIE CH₂Cl₂ 분획물에 의한 EBV-transformed LCL의 세포사멸 효능

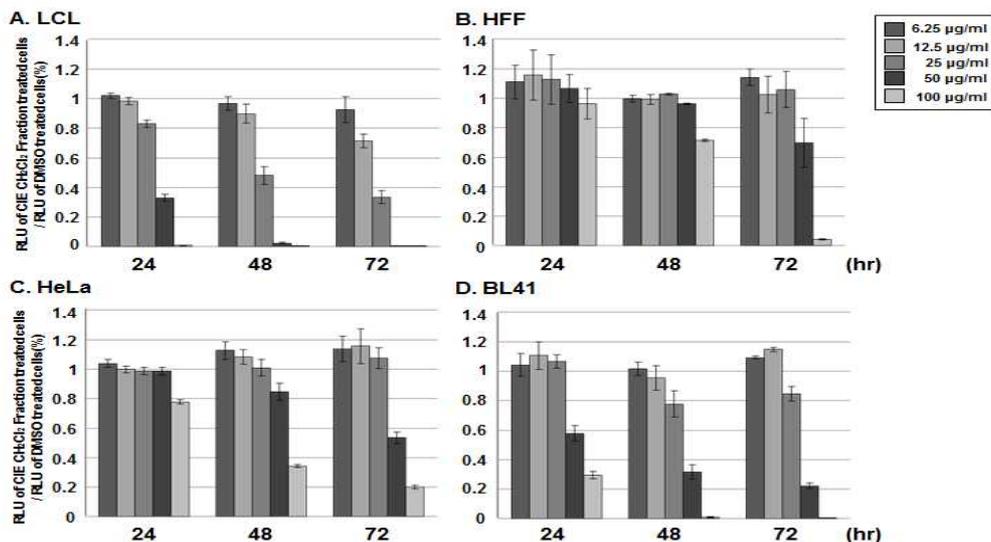
- LMP1에 의한 NF- κ B 활성화는 EBV에 의해 형질전환된 세포인 LCL의 생존에 필수적이므로, CIE의 5가지 분획물이 LCL 세포의 생존에 미치는 영향을 CellTiter-Glo assay를 통해 분석하였음
- 앞선 NF- κ B luciferase assay 결과와 일치하게, CIE CH₂Cl₂ 분획물을 처리한 LCL 세포에서 생존률이 현저히 감소되었으며, 나머지 분획물에서는 세포사멸 효능이 미미하거나 없는 것으로 나타남

- CIE CH₂Cl₂ 분획물의 세포사멸 효능을 분석하기 위하여 NF-κB 활성화에 의존적인 LCL과 NF-κB 활성화에 비의존적 세포주인 HFFs, HeLa, BL41 세포에 CH₂Cl₂ 분획물을 농도별, 시간별로 처리한 후 CellTiter-Glo assay를 통해 분석함
- CIE CH₂Cl₂ 분획물 처리 농도 및 시간이 증가함에 따라 LCL 세포의 사멸이 증가한 것을 확인하였음



CIE 분획물에 의한 LCL의 세포사멸 효과

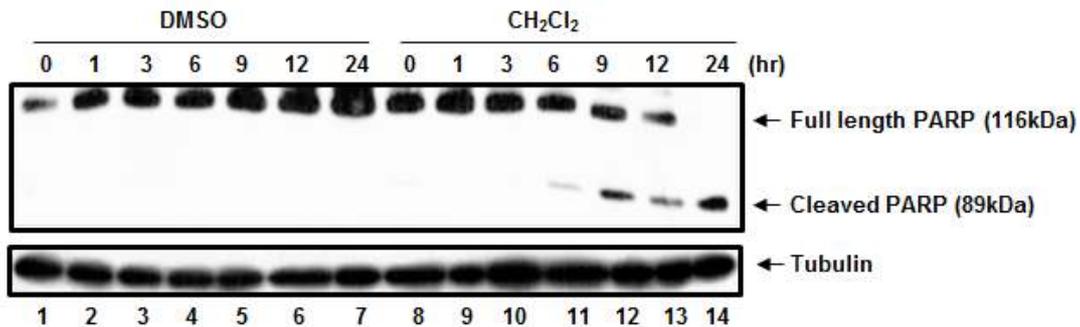
- HFF와 HeLa 세포에서는 CH₂Cl₂ 분획물을 처리 후 24시간까지 세포사멸을 나타내지 않았으며, 72시간 후에는 100 μg/mL의 농도에서 각각 91%, 80%의 세포사멸을 나타내었으며, BL41 세포에서는 CH₂Cl₂ 분획물을 처리 후 24시간에 100 μg/ml 농도에서 72%, 48시간에 98%의 생존률 감소를 나타내었음
- NF-κB 활성화의 억제는 LCL 세포의 apoptosis를 유도하므로, CIE CH₂Cl₂ 분획물에 의한 LCL의 세포사멸이 Apoptosis를 통해 유도되는 것인지를 Apoptosis indicator 단백질인 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 cleavage를 통해 확인하였음



다양한 세포주에서 CIE CH₂Cl₂ 분획물의 세포사멸 효과

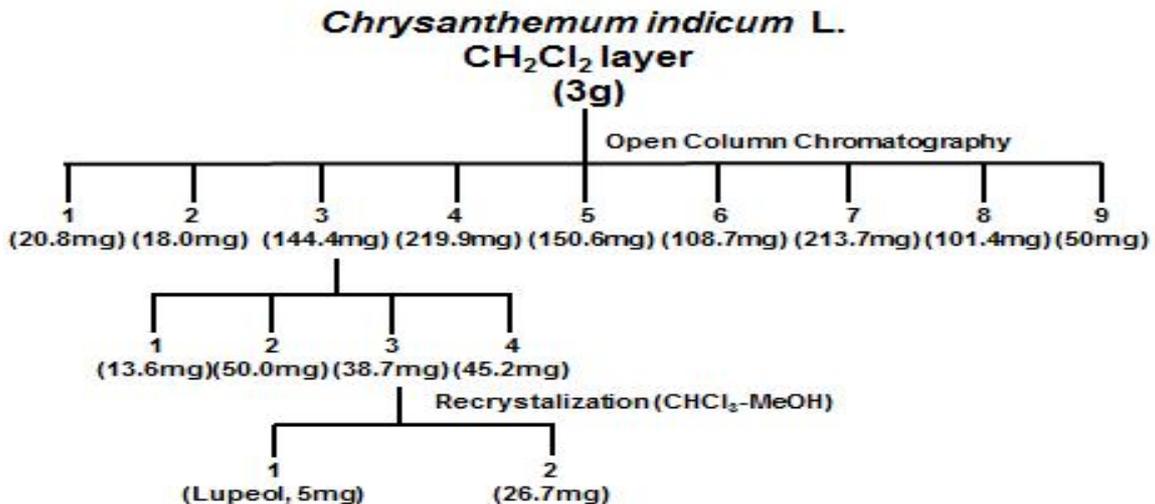
- CH₂Cl₂ 분획물의 처리시간이 증가함에 따라 LCL세포에서 Cleavage가 일어난 PARP의 양이 증가하는 것을 확인하였음. CH₂Cl₂ 분획물 (100 μg/mL)을 처리하고 6시간 후부터 PARP cleavage가 유도됨

- 따라서, CIE의 CH₂Cl₂ 분획물은 Apoptosis를 통해 LCL의 사멸을 유도하며, HFF, HeLa, BL41 세포보다 LCL 세포에서 효과적인 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였음



CIE CH₂Cl₂ 분획물에 의한 LCL의 Apoptosis 유도

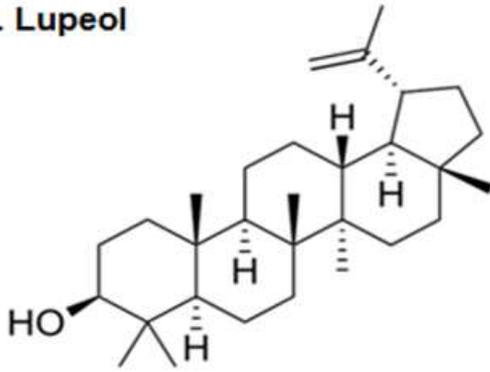
- CIE의 CH₂Cl₂ 분획물로부터 분리한 Lupeol이 LMP1에 의한 NF-κB 활성화에 미치는 영향
 - CIE의 CH₂Cl₂ 분획물의 active compound를 분리하기 위하여 추가적인 분획 (Sub-fraction)을 수행하였음 (경희대, 제1세부에서 제공)



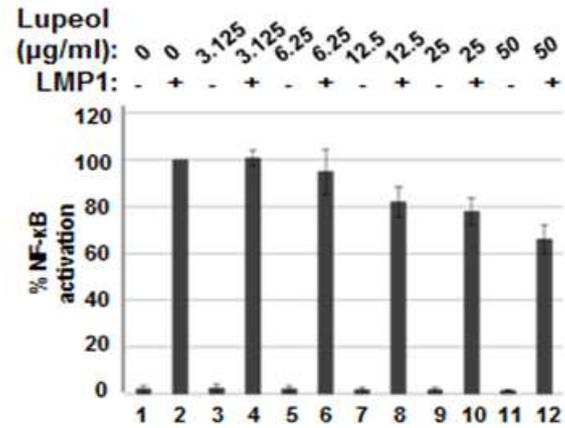
CIE의 CH₂Cl₂ 분획물로부터 분리한 Lupeol의 sub-fraction 및 isolation scheme

- NF-κB 억제 효능을 가진 성분으로 Lupeol (a pentacyclic diterpene)을 선별하였음
- NF-κB luciferase assay를 통해서 Lupeol의 LMP1에 의한 NF-κB 활성화의 억제 효능을 분석한 결과, Lupeol의 처리 농도가 증가함에 따라 LMP1에 의한 NF-κB 활성화가 감소하였음
- CIE CH₂Cl₂ 분획물의 억제 효능과 비교하여 Lupeol이 보다 효과적으로 LMP1에 의한 NF-κB 활성화를 억제 하는 것을 확인하였음

A. Lupeol



B.

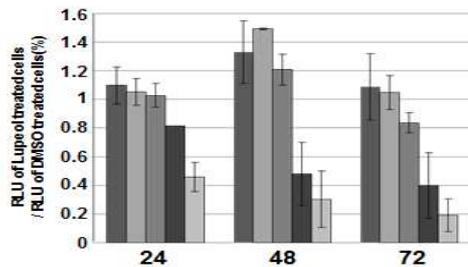


Lupeol의 LMP1에 의한 NF-κB 활성화 억제 효능

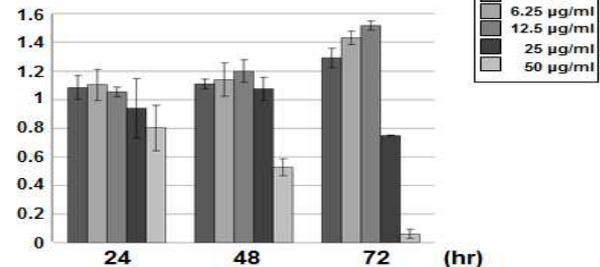
○ Lupeol에 의한 EBV-transformed LCL의 세포사멸 효능

- Lupeol의 세포사멸을 분석하기 위하여 NF-κB 활성화에 의존적인 LCL과 NF-κB 활성화에 비의존적 세포주인 HFFs, HeLa, BL41 세포에 Lupeol을 농도별, 시간별로 처리한 후 CellTiter-Glo assay를 통해 분석함
- Lupeol의 처리 농도 및 시간이 증가함에 따라 LCL 세포의 사멸이 증가 한 것을 확인하였으며, HFF와 HeLa, BL41 세포와 비교하여 효과적인 세포사멸을 나타내었음
- 앞선 CIE CH₂Cl₂ 분획물의 결과와 유사하게, HFF와 HeLa 세포에서는 lupeol 처리 24시간까지 세포사멸을 거의 나타내지 않았으며, 48시간과 72시간 후에는 50 μg/mL의 농도에서 각각 48%, 93%의 세포사멸을 나타내었음. BL41 세포에서는 lupeol 처리 24시간 후에 50 μg/mL 농도에서 48%, 48시간, 72시간 후에 각각 61%, 92%의 생존률 감소를 나타내었음

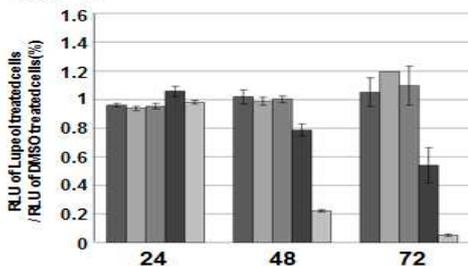
A. LCL



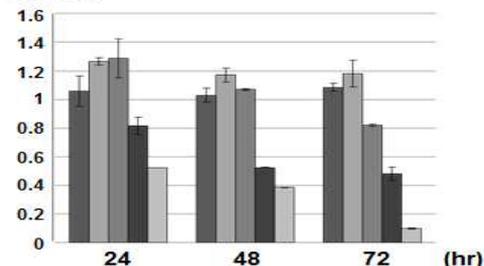
B. HFF



C. HeLa



D. BL41

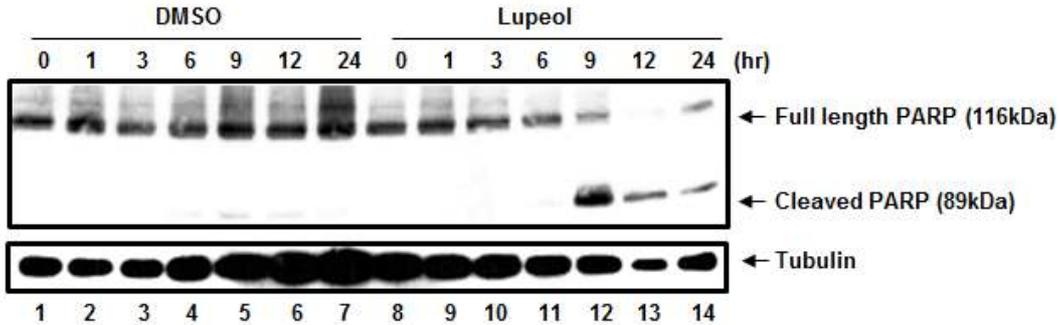


다양한 세포주에서 Lupeol의 세포사멸 효능

- Lupeol에 의한 LCL의 세포사멸이 apoptosis를 통해 유도되는 것인지를 PARP

cleavage를 통해 확인한 결과, LCL 세포에서 Lupeol의 처리시간이 증가함에 따라 PARP Cleavage가 증가하는 것을 확인하였음. Lupeol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리하고 9시간 후부터 PARP cleavage가 유도됨

- 따라서, Lupeol은 Apoptosis를 통해 LCL의 사멸을 유도하며, HFF, HeLa, BL41 세포보다 LCL 세포에서 효과적인 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였음

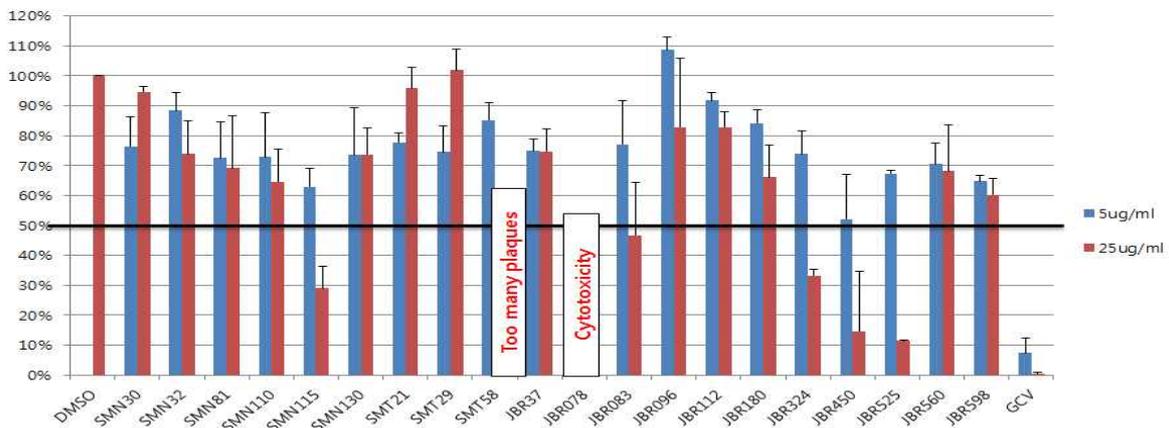


Lupeol에 의한 LCL의 apoptosis 유도

2) 선정된 20종의 마우스감마헤피스바이러스에 대한 항바이러스 활성 검증

가) EBV 억제제 발굴 및 기전 연구대상범위를 20종으로 한정함. 선정물질 20종의 항바이러스 활성 수치 IC_{50} , 세포에 미치는 독성 수치 CC_{50} (생존율을 50%로 감소시키는 cytotoxicity concentration) 및 바이러스 증식 억제하는 기전을 밝힘

- 항바이러스 screening 기법인 plaque reduction assay를 통해 선정된 추출물의 IC_{50} 을 구함
- SMN115, JBR324, 450, 525는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리했을 때 마우스감마헤피스바이러스의 증식이 50%이하로 줄어들었음. 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 50%이상의 억제 효과가 없으므로 4종 물질의 마우스감마헤피스바이러스에 대한 IC_{50} 은 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이로 예상됨
- JBR078의 경우, 5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 모두 독성이 강해서 plaque의 수를 확인하기 어려웠음



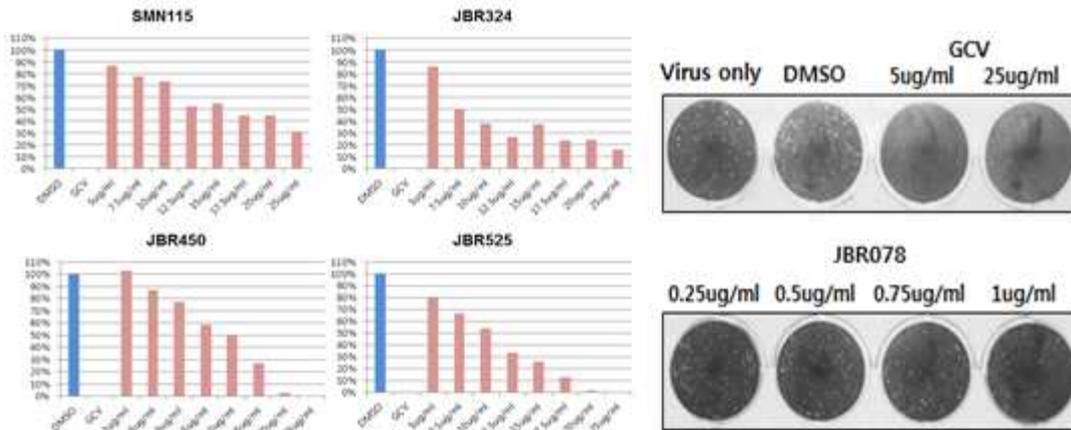
선정된 20종의 마우스감마헤피스바이러스에 대한 항바이러스 효능

- 각 추출물을 5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 plaque 수를 측정함. 용매인 DMSO만 처리한 경우의 plaque의 수를 100%로 정량화 하였을 때, 다른 실험군의 plaque수를 %로 수치화함

3) 일부 추출물의 마우스감마헤피스바이러스에 대한 항바이러스 활성 - dose dependency

가) 마우스감마헤피스바이러스에 대한 screening을 통해 25 µg/mL에서 50% 미만으로 바이러스의 증식을 줄여 준 SMN115, JBR324, 450, 525에 대하여 농도범위를 다양하게 하여 plaque reduction assay를 수행함

- 각 물질의 IC₅₀값은 SMN115는 15 µg/mL, JBR324는 7.5 µg/mL, JBR450은 10 µg/mL, JBR525는 10 µg/mL임



5종의 식물 추출물의 마우스감마헤피스바이러스에 대한 항바이러스 활성

- JBR078의 경우, 강한 독성 때문에 plaque를 확인하기 어려워 농도를 낮춰 0.25, 0.5, 0.75, 1 µg/mL로 처리한 결과 독성은 없어보였으나 마우스 감마헤피스바이러스의 증식을 억제하는 효과는 없음
- SMN115, JBR324, 450, 525는 5-25 µg/mL 사이의 농도를 세분화 하여 처리함. JBR078은 5 µg/mL 이하의 농도에서의 독성 및 항바이러스 효능을 확인하기 위하여 0.25-1 µg/mL로 처리함

4) EBV 억제제 발굴 및 기전해명을 위한 추출물의 항바이러스 활성 검증

가) EBV 잠복감염 세포주인 Raji 세포에서 추출물을 처리하였을 때, 재활성시 발현되는 EBV단백질의 발현량을 western blot으로 확인하였음

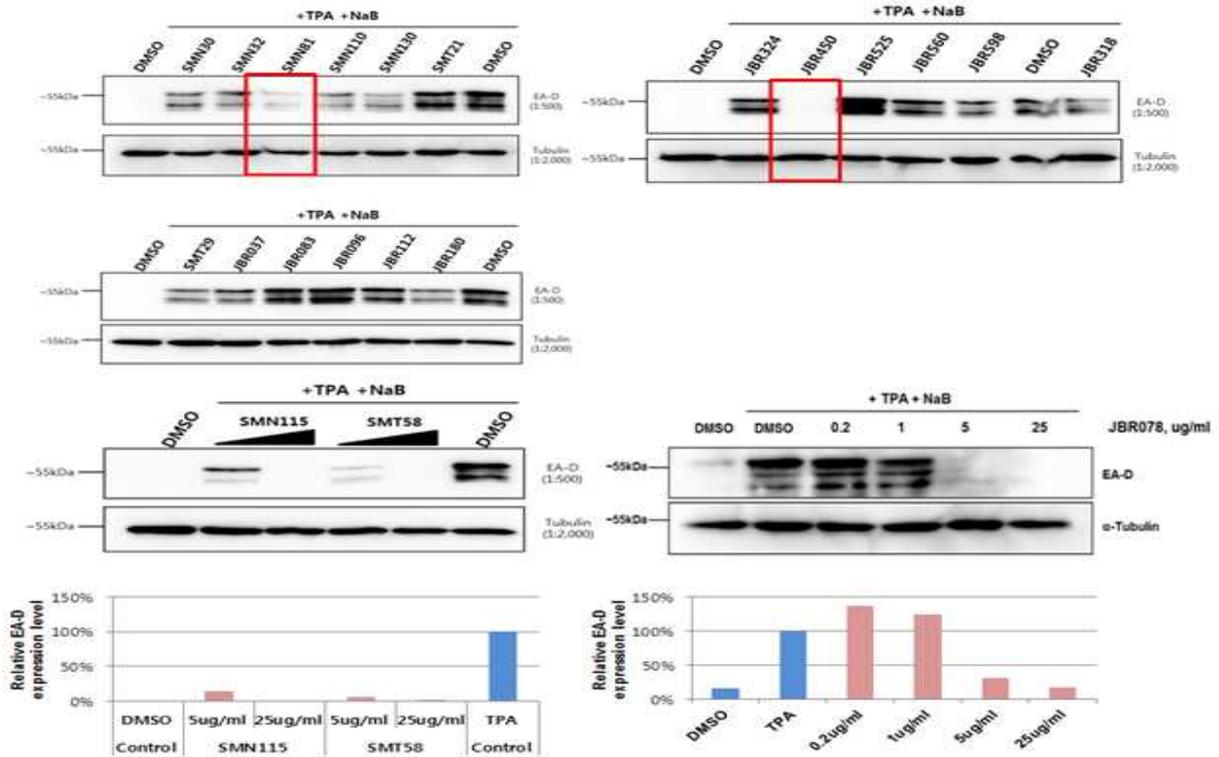
- KSHV에서 항바이러스 효능을 보이지 않았던 17종의 천연물의 경우, 25 µg/mL로 처리함. SMN81과 JBR450을 처리한 경우에 EBV의 lytic replication 억제효과가 뚜렷함
- KSHV에서 항바이러스 효능을 보였던, SMN115, SMT58 경우 5, 25 µg/mL로 처리하여 저농도인 5 µg/ml에서도 EA-D 발현이 강하게 억제됨을 확인하였음
- JBR078를 처리한 경우, EBV에 대하여 용량의존적인 항바이러스 효능을 보이며, 특히 5 µg/mL부터 확연히 강해짐. 이는 KSHV에서 IC₅₀값이 2.32 µg/mL인 것을 고려했을 때, JBR078이 인체 감마헤피스바이러스에 대하여 항바이러스 효능을 가지는 유효범위는 유사하다고 판단됨

나) 17종에 대하여 25 µg/mL의 농도로 처리한 후 24시간 뒤 수거하여 세포 lysate으로 western blot을 진행함. KSHV에서 효과가 있었던 3종 SMN115, SMT58, JBR078의 경우 저농도를 포함하여 진행함. 재활성시 발현되는 EBV 단백질, EA-D발현을 확인

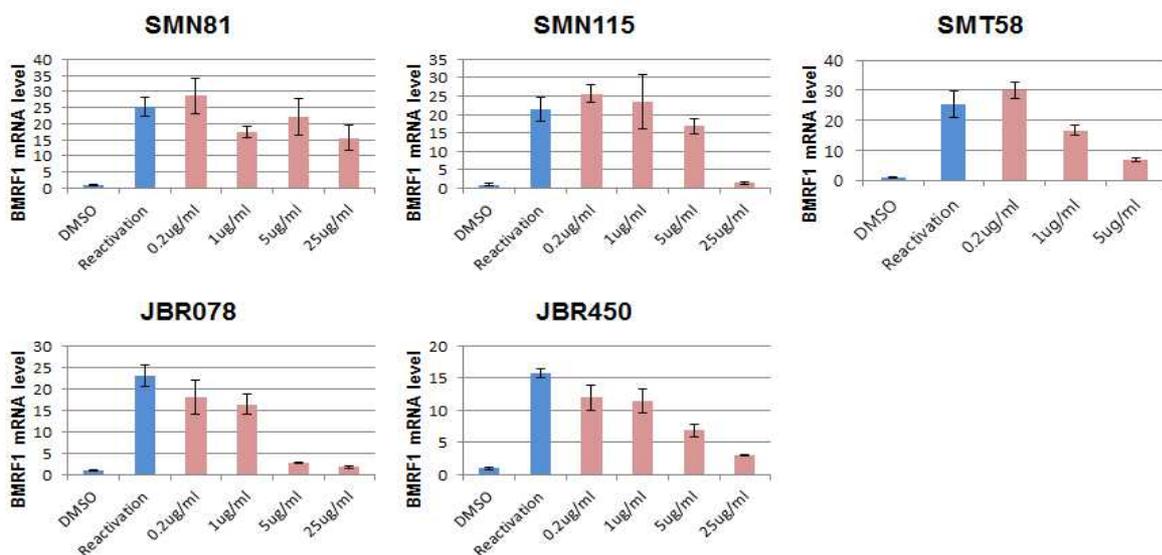
하고, 이를 tubulin양으로 보정함

다) EBV lytic replication을 효율적으로 억제하는 추출물 SMN81, 115, SMT58, JBR078, 450가 작용하는 항바이러스기전을 해명하기 위한 연구를 진행함

- EA-D를 발현하는 BMRF1 mRNA level을 측정함으로써, 추출물을 처리하지 않은 실험군에 비해 각 5종의 추출물을 처리한 경우 viral mRNA level이 감소하였음. 이는 추출물이 바이러스의 전사단계에 관여한다는 것을 의미함



선정된 20종의 인체감마헤르페스바이러스인 EBV에 대한 항바이러스 활성



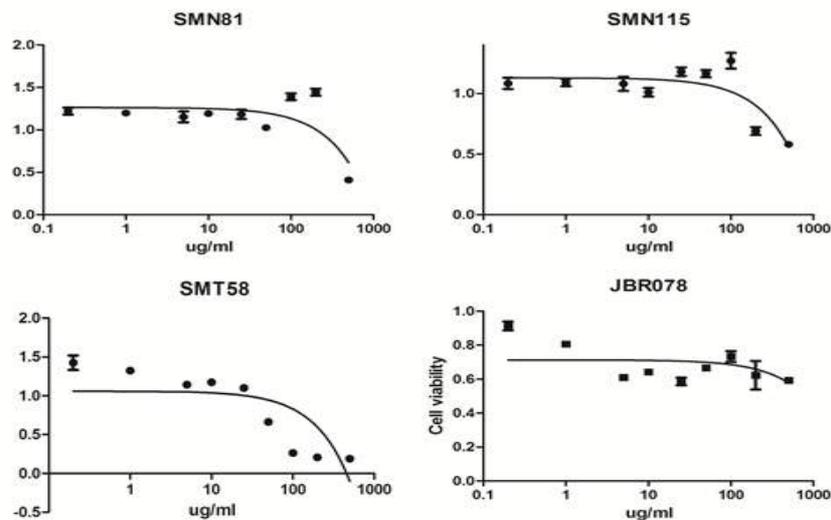
EBV 억제제 후보 추출물 5종의 의한 virus mRNA 양 측정

- SMT58, JBR078은 1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 viral mRNA level을 반으로 줄였으며, SMN115, JBR450은 5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 반으로 줄였음. 4종 모두 용량의존적으로 viral mRNA level을 줄였음. SMN81은 다른 추출물에 비하여 mRNA 감소량이 적기는 하지만, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때 40%정도의 감소량을 보였음
- 각 추출물을 0.2, 1, 5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 후 24시간 후 trizol로 수거하여, RNA extraction, cDNA합성 단계를 거쳐 qRT-PCR을 진행함. 추출물을 처리하지 않은 대조군의 mRNA 양을 1로 정상화하고 이에 대한 다른 실험군들의 mRNA 양을 상대적으로 수치화함

5) EBV 재활성에 효능이 있는 천연물 5종의 세포독성을 검증하여 억제제 활용 가능성 검토

가) Screening을 통해 SMN81, 115, SMT58, JBR078, 450이 EBV의 lytic replication을 바이러스의 전사단계부터 농도의존적으로 억제함을 확인하였음. 위의 5종의 천연물이 세포에 미치는 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 진행하여 IC_{50} 를 측정함

- 각 추출물을 다양한 농도의 범위에서 triplicates로 처리함. 24시간 후 MTT assay를 진행하여 살아있는 세포의 상대적인 수치를 흡광도로 측정함



EBV에 대해 항바이러스 활성을 보이는 추출물의 세포독성

- IC_{50} 측정값은 각각 SMN81의 경우 563.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SMN115는 187.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SMT58은 45.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$, JBR450은 이들보다 높은 수치를 보임. 약성물질의 최고농도(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 넘지 않음. 다만, JBR078의 경우 1.055 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 강한 세포독성을 보였음

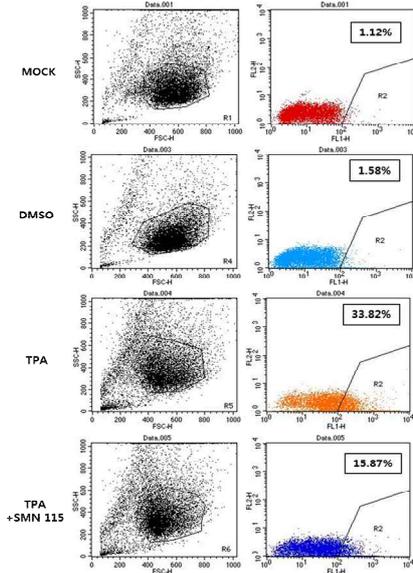
라. 인체감마헤르페스바이러스에 대한 항바이러스 활성 검증

1) 선별 후보물질의 인체감마헤르페스바이러스 항바이러스 활성 분석

가) 선별 후보물질 17종이 인체감마헤르페스바이러스 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV))에 대해 갖는 항바이러스 활성을 인체감마헤르페스바이러스인 KSHV 감염 리포터 세포주 BC-3G을 이용하여 분석하였음

- SMN 115, 130, 142, JBR 83, 164, 180, 363, 450, 460, 478, 487, 525, 560, 562, 584,

나) BC-3G 세포주는 바이러스가 잠복감염에서 재활성화 될 때 발현되는 RTA에 의한 lytic replication의 정도를 확인할 수 있는 destabilized GFP를 발현 리포터 세포주로서 항바이러스 활성에 대한 지표를 제시하는 세포주임. TPA 처리시 GFP (+) 세포가 증가함을 FACS 분석을 통해 정량적으로 활용할 수 있음

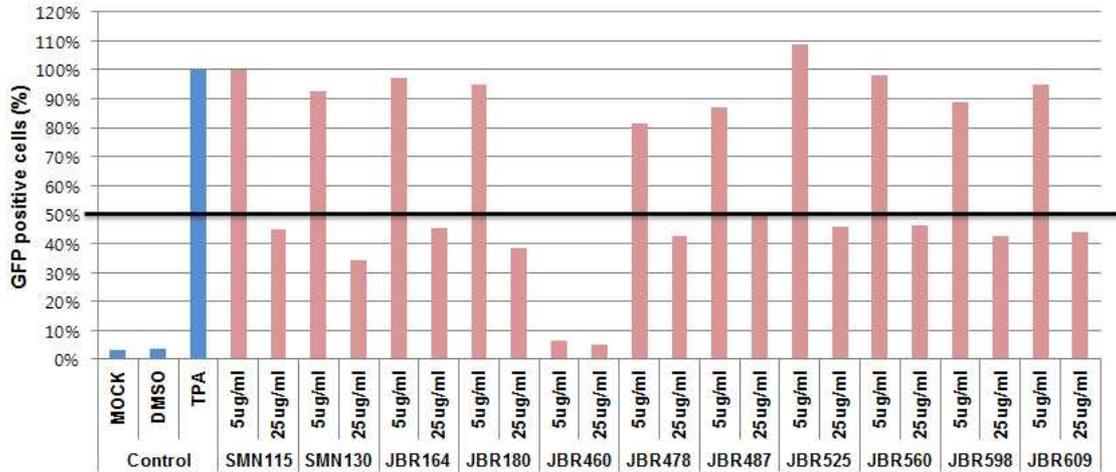


BC-3G세포주를 활용한 인체감마헤르페스바이러스 KSHV재활성 및 lytic replication 분석. TPA 처리시 GFP (+) 세포비율이 DMSO 처리군에서의 1.58 %에서 33.82 %로 증가하였으며, 후보물질인 SMN115의 처리에 의해 15.87%로 감소함을 FACS로 분석하였음. GFP (+)세포주의 감소는 바이러스 lytic replication을 감소시키는 항바이러스효과를 나타냄.

- 테스트한 17 종의 국내자원식물 후보물질들은 TPA 단독처리시 BC-3G 잠복감염 세포주를 재활성시킨 대조군과 비교하여 모두 뛰어난 항바이러스 활성을 보였으며, 대부분 50% 미만으로 바이러스의 lytic replication을 억제하였음
- 이는 세포기반 GFP 활용 HTS와 plaque reduction assay를 통한 항바이러스 스크리닝 결과와 일치하는 결과임

다) 17종의 국내자원식물 추출물의 인체 감마헤르페스바이러스인 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)에 대한 항바이러스 활성

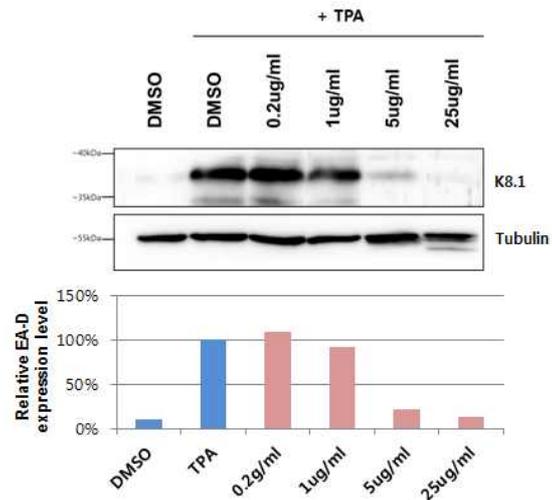
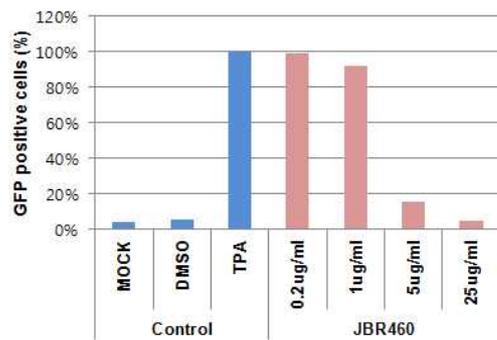
- 17종의 국내자원식물 추출물의 마우스 감마헤르페스바이러스에 대한 항바이러스 활성을 보였으며, 이 중에 11종이 인체 감마헤르페스바이러스인 KSHV 감염 리포터 세포주 BC-3G의 lytic replication을 억제함을 확인하였음 (SMN 115, 130, JBR 164, 180, 460, 478, 487, 525, 560, 598, 609 총 11종)
- BC-3G 세포는 바이러스가 잠복 감염에서 재활성화 될 때 destabilized GFP를 발현하는 리포터 세포주로서 항바이러스 활성에 대한 지표로 활용할 수 있는 세포임
- 11종의 국내자원식물 추출물들은 TPA 단독처리시 BC-3G 잠복 감염 세포주를 재활성시킨 대조군과 비교하여 25 µg/mL로 처리시에는 모두 50% 미만으로 바이러스의 lytic replication을 억제하였음
- 5 µg/mL 처리시에는 JBR460을 처리한 경우에만 뛰어난 항바이러스 활성을 보였음
- BC-3G 세포에 11종의 후보물질을 5, 25 µg/mL의 농도로 처리하고 24시간 후 세포를 수거하여 FACS로 GFP(+)세포의 %를 정량적으로 측정하였음. TPA 처리군을 100%로 정상화하였을 때, 천연물 처리 후 GFP(+)세포의 %로 상대적인 바이러스 재활성 정도를 수치화함



11종의 국내자원식물 추출물의 인체감마헤피스바이러스에 대한 항바이러스 활성

마) JBR460의 인체 감마헤피스바이러스인 KSHV에 대한 항바이러스 활성 검증

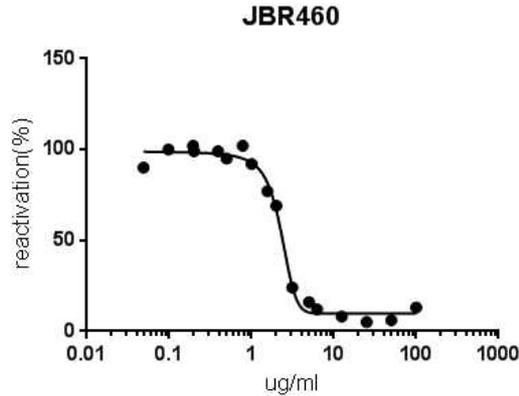
- 인체감마헤피스바이러스인 KSHV를 잠복감염하고 있는 세포주인 BC-3G세포와 BC-3세포에서 JBR-460의 재활성 억제효과를 확인함
- BC-3G세포의 GFP(+)세포의 %가 농도 의존적으로 줄어들었음. BC-3세포에서는 KSHV lytic 단백질인 K8.1의 발현량이 줄어들었음
- JBR-460은 KSHV에 대하여 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 용량의존적인 항바이러스 효과를 가지며, 이 효과는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 확연하게 강해짐



JBR460의 인체 감마헤피스바이러스인 KSHV에 대한 항바이러스 활성

- JBR-460을 0.2, 1, 5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 4가지 다른 농도로 처리함. BC-3G 세포주에서 JBR-460에 의한 GFP(+)세포의 % 변화를 확인하고, BC-3세포에서 천연물을 처리한 후 24시간 뒤의 세포 lysate으로 western blot을 진행하여, 재활성시 발현되는 KSHV 단백질인 K8.1의 발현을 확인함. 단백질의 발현량은 tubulin의 양을 이용해 보정함
- JBR-460이 KSHV에 대해 가지는 재활성 억제능력을 분석하기 위해, 억제 효과를 반으로 줄여주는 농도인 IC_{50} (half maximal inhibitory concentration)를 구함. BC-3G 세포에 JBR-460의 처리농도별 GFP(+)세포 %값을 분석하였음
- KSHV 재활성을 억제하는 JBR460의 IC_{50} 은 2.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 임. 이는 약물의 처리농도가

2.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 경우에도 항바이러스 효능의 50%를 유지함으로써 저농도에서도 재활성 억제능력을 가짐을 의미함



JBR460의 KSHV에 대한 항바이러스 활성

- 세포에 JBR460을 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 다양한 농도로 처리한 후, BC-3G 세포의 GFP(+)세포의 %를 FACS로 통해 측정함. 측정된 수치를 분석프로그램 Prism을 통해 분석하여 IC_{50} 값을 예상함

바) JBR460의 인체감마헤르페스바이러스인 EBV에 대한 항바이러스 활성을 검증

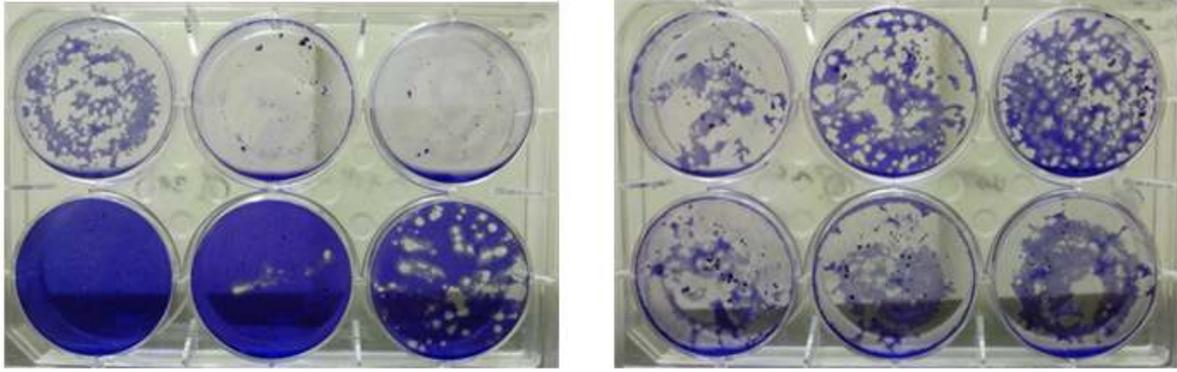
- EBV 잠복감염 세포주인 B95.8세포에 JBR460을 처리한 후 TPA에 의해 재활성을 유도함. 이후 발현되는 EA-D의 단백질 양을 western blot을 통해 확인하였음
- EA-D의 발현량을 Tubulin을 통해 보정한 결과, JBR460은 처리농도의 농도 의존적으로 EBV의 lytic replication을 억제함
- 특히 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 확연하게 EBV 단백질의 발현량이 약해짐을 확인할 수 있었음. 이는 JBR460이 EBV에 대해 가지는 항바이러스 효능의 유효범위가 KSHV의 경우와 유사함 (KSHV의 재활성을 억제하는 IC_{50} 값은 2.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었음)

마. HSV 검출 시스템 구축 및 국내 자원식물 소재를 이용한 항바이러스 활성 스크리닝

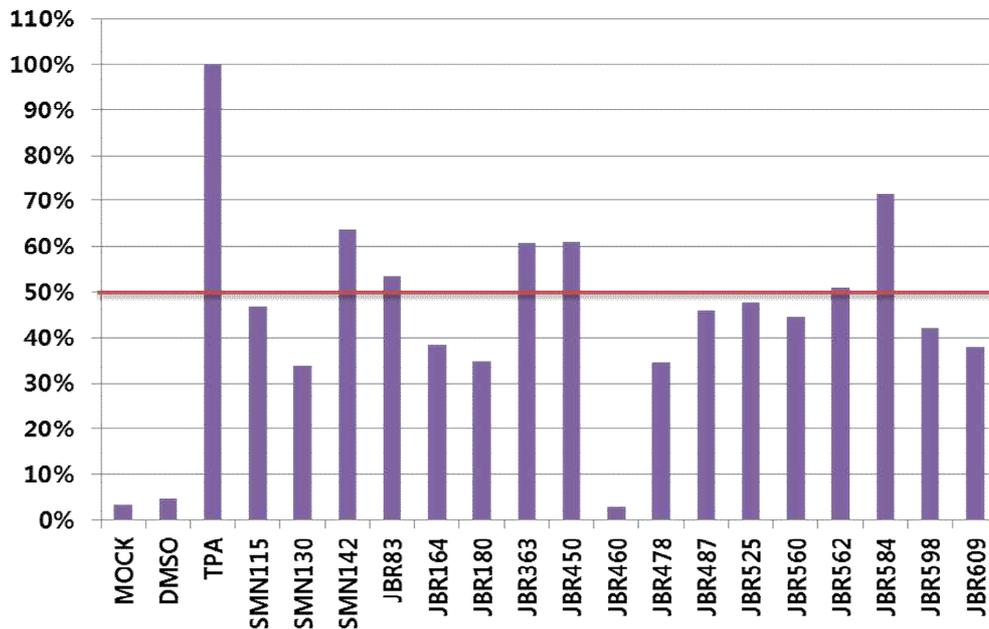
1) 세계적으로 수 천여종의 식물자원으로부터 새로운 항바이러스 소재를 탐색하기 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있음

가) 본 연구진은 스크리닝을 통한 항바이러스 활성을 가진 천연자원을 선별하고자 하였음

- 총 700여종의 국내자원식물 추출물을 이용하여 HSV-1, HSV-1-luciferase를 이용하여 바이러스 증식을 plaque 분석법으로 확인하였음



HSV-1 및 HSV-1-luciferase를 이용한 plaque 분석



우선 선별 후보 추출물의 인체감마헤르페스바이러스에 대한 항바이러스 활성

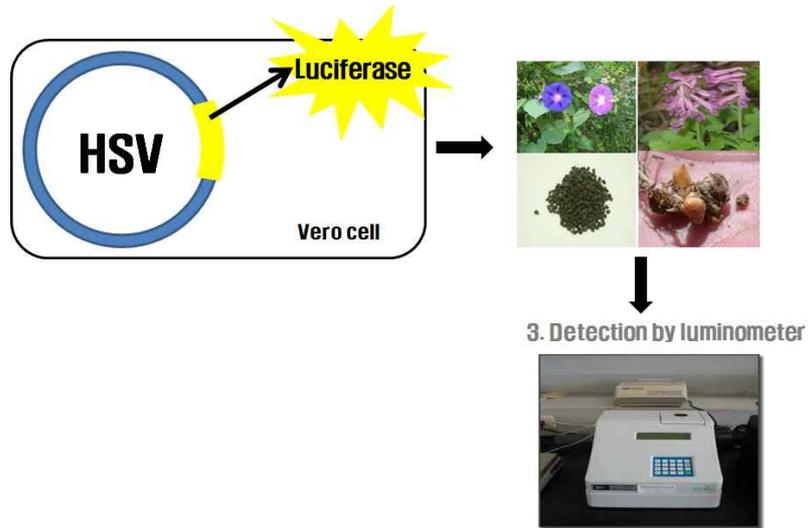
2) HSV-1의 감염 조건을 확립하기 위해 Vero 세포에 바이러스 감염 후, 이를 plaque 분석법으로 확인

가) 적절한 감염 농도를 확립하기 위해 1/10씩 연속희석법으로 5번 희석하여, 각각 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵으로 감염시키고 4일 뒤 세포를 crystal violet으로 염색하여 plaque 분석법으로 바이러스 증식 정도를 확인함

- Plaque 분석법은 plaque의 유효 갯수가 10-100 개이므로 신뢰도 높은 well을 선택하여 pfu를 계산하였음. 적정 바이러스 농도를 다시 확인하기 위해 희석 농도를 달리하여 반복 실험 결과 적절한 수의 plaque를 확인할 수 있었음

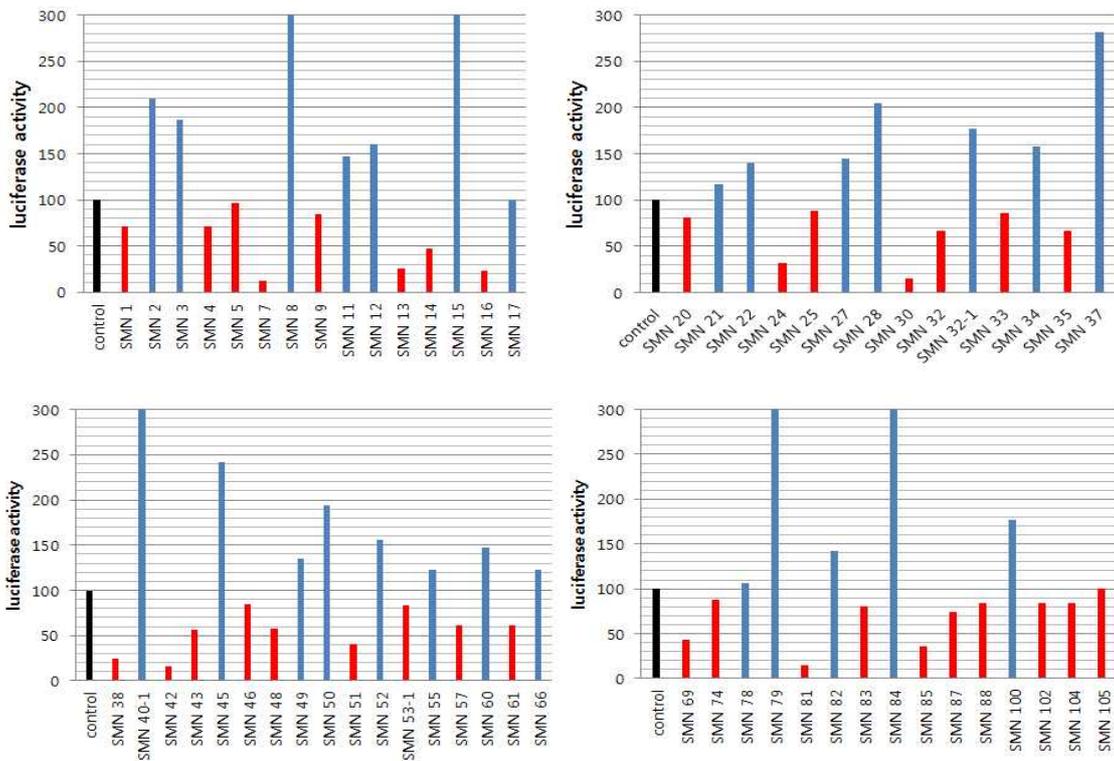
- Plaque분석법에 사용한 Vero세포는 4×10⁵cells/mL이었으며, 확인 된 plaque는 8×10⁴ pfu/mL이므로 바이러스의 감염 조건은 m.o.i.=0.2로 확립함

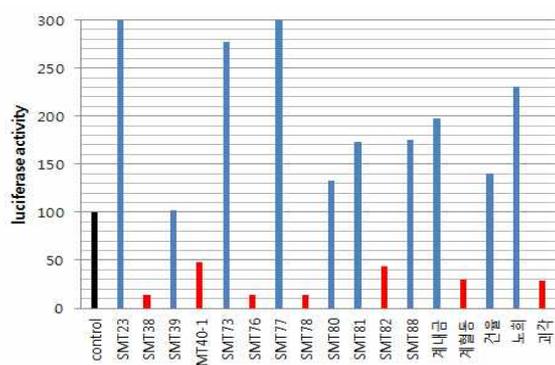
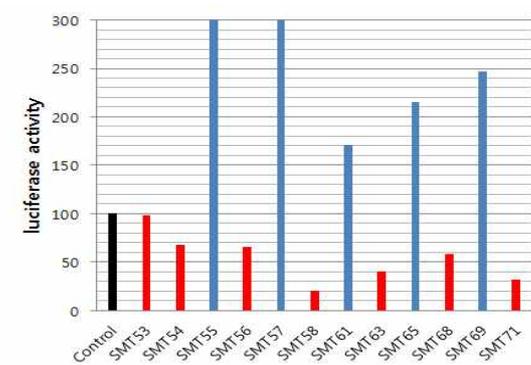
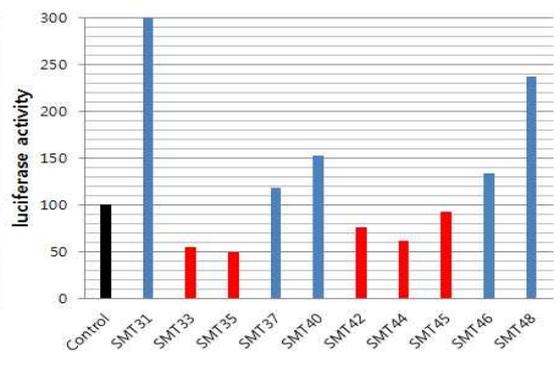
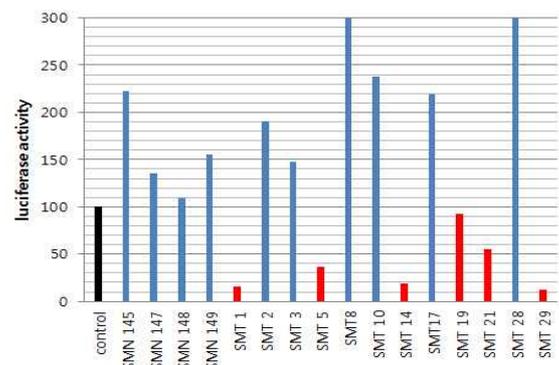
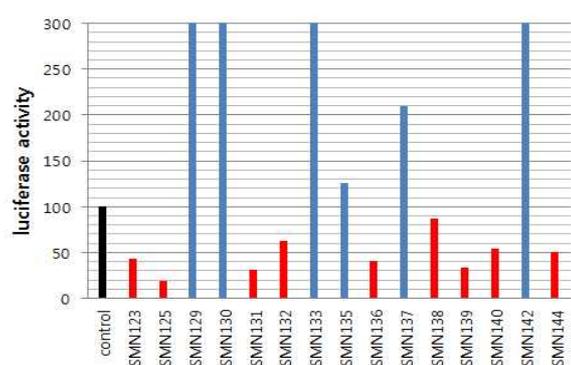
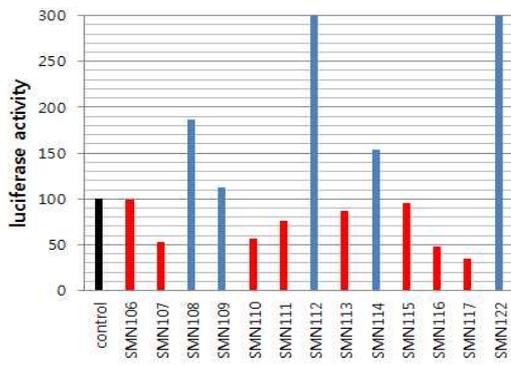
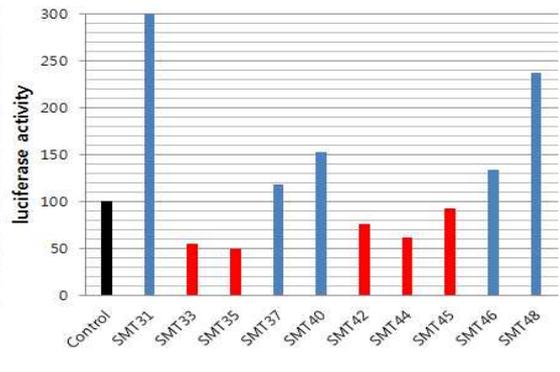
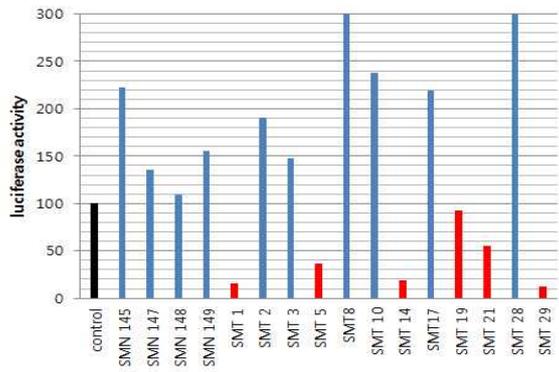
3) 감염 조건이 확립 된 HSV-1-luciferase와 761 가지의 국내 자원식물 추출물 처리에 따른 바이러스 증식을 plaque 및 luciferase 분석법으로 스크리닝

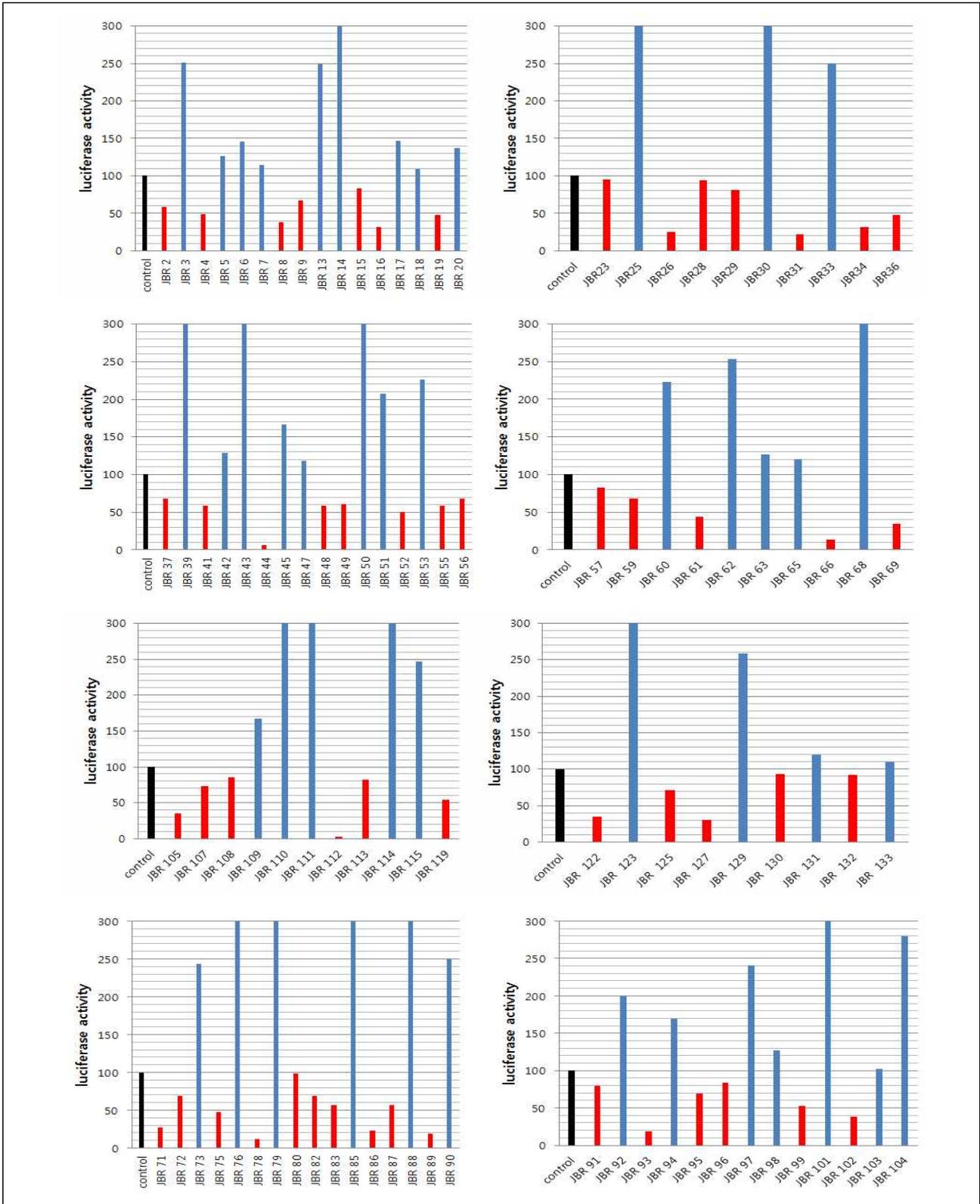


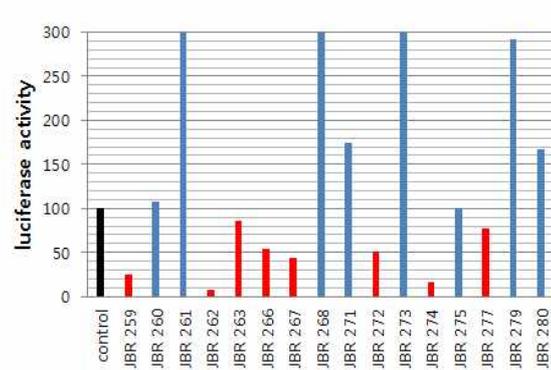
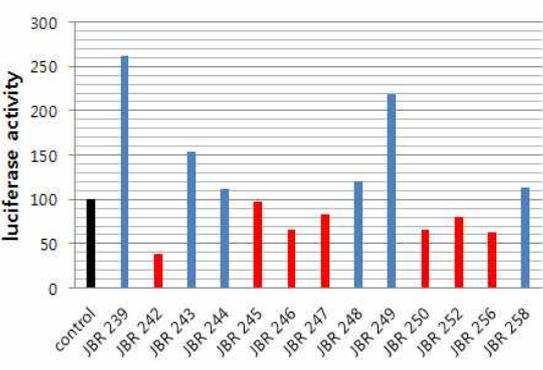
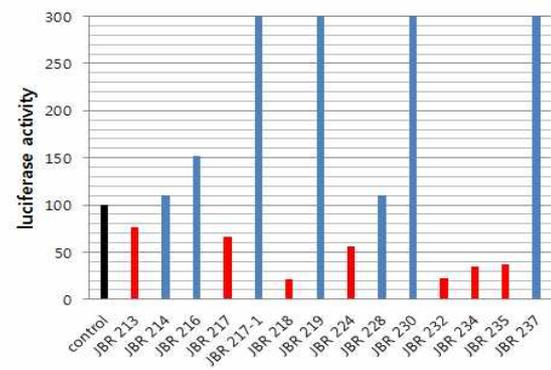
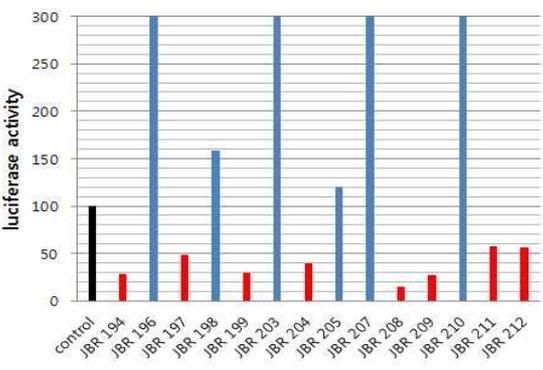
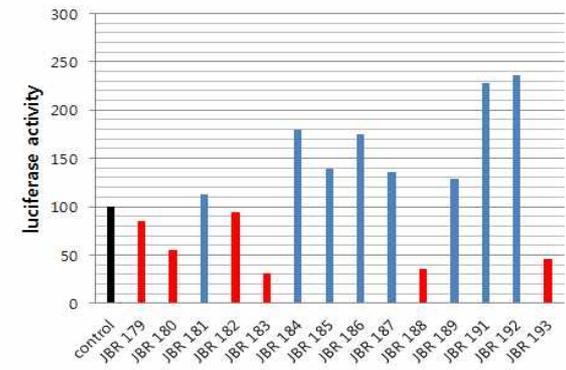
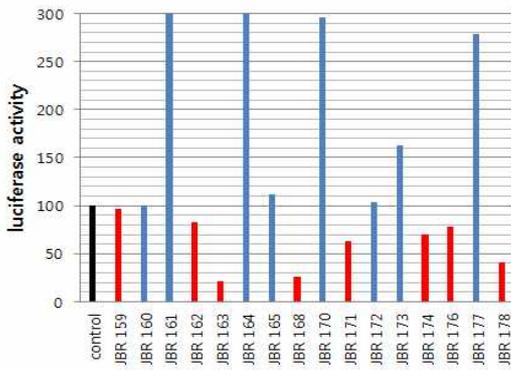
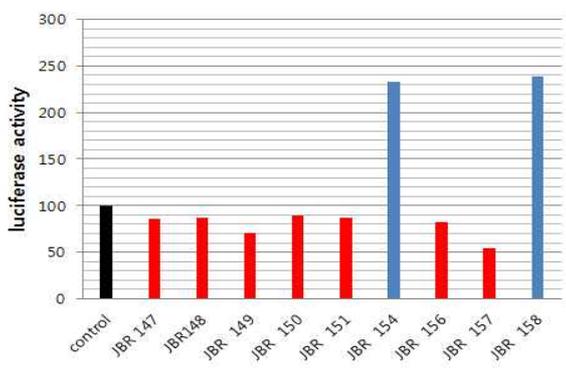
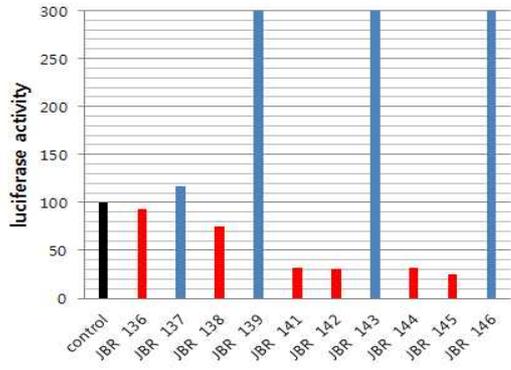
HSV-1-luciferase와 국내자원식물 이용한 항바이러스제
스크리닝 방법

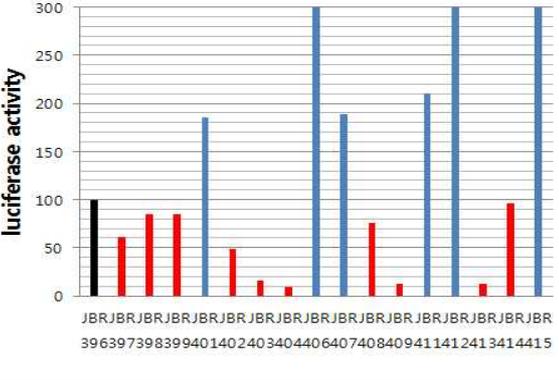
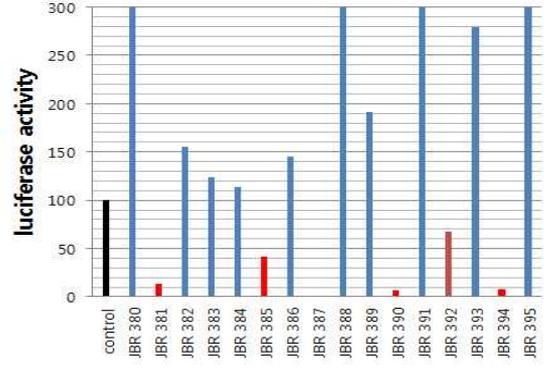
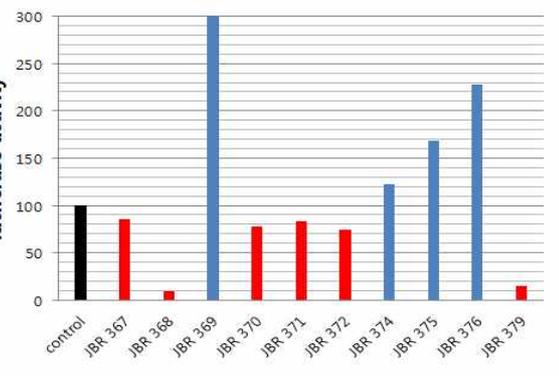
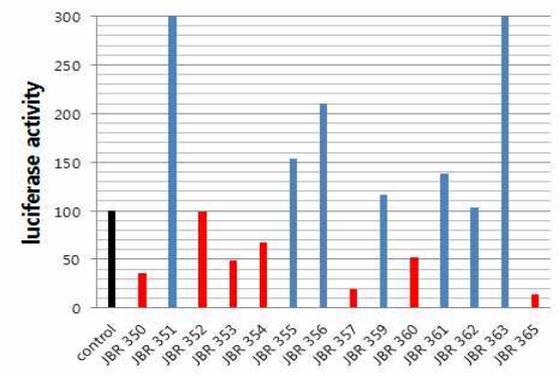
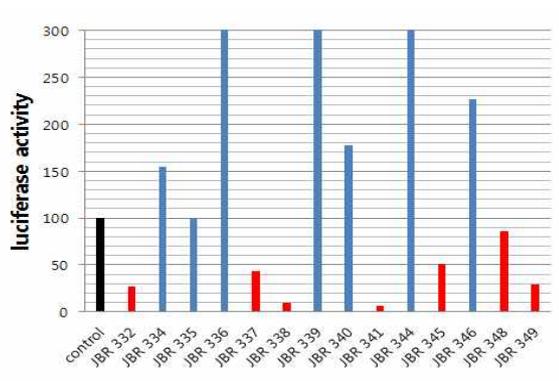
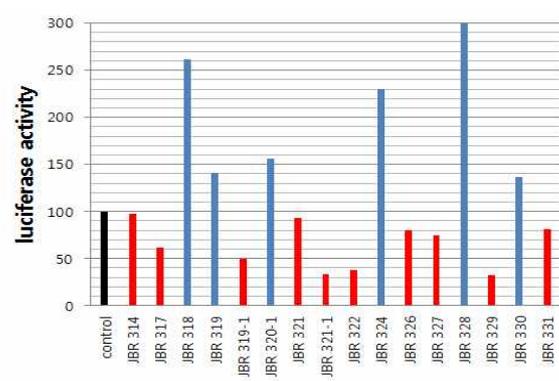
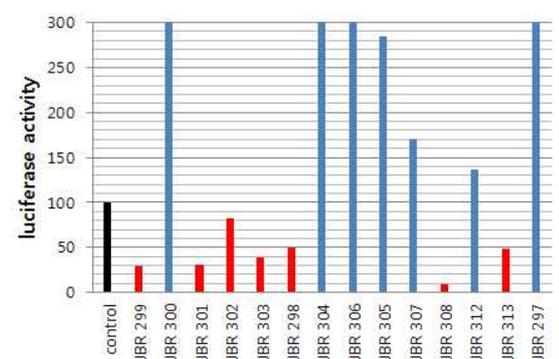
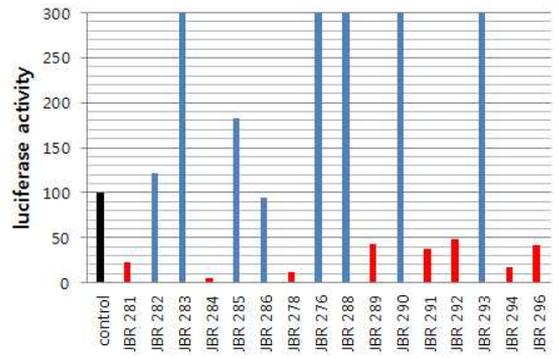
가) m.o.i.=0.2 농도의 HSV-1-luciferase를 Vero 세포에 감염시켜 37°C에서 1시간 배양 후, 761 가지의 국내 자원식물 추출물을 DMSO로 녹이고, 농도 25 µg/mL로 처리하였음. 24시간 후에 luciferase 분석법으로 바이러스 증식에 미치는 영향을 연구하였음

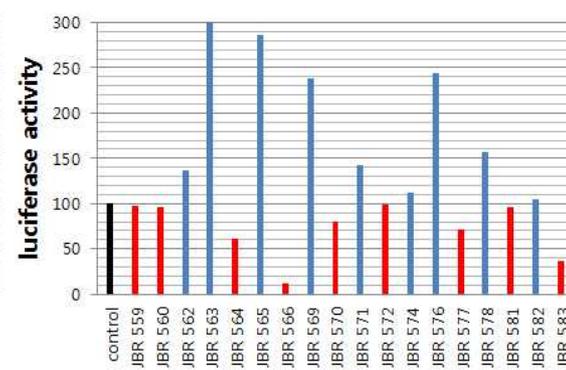
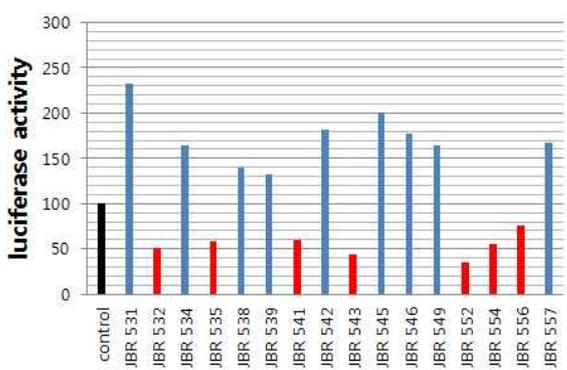
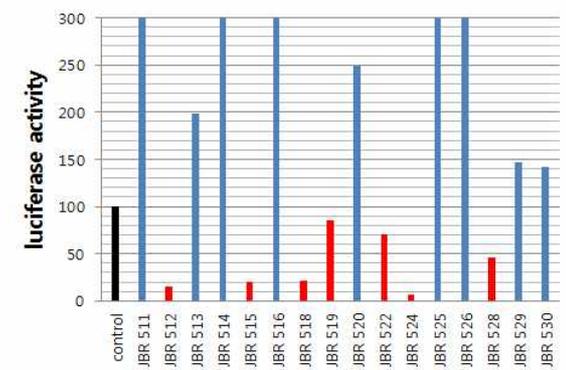
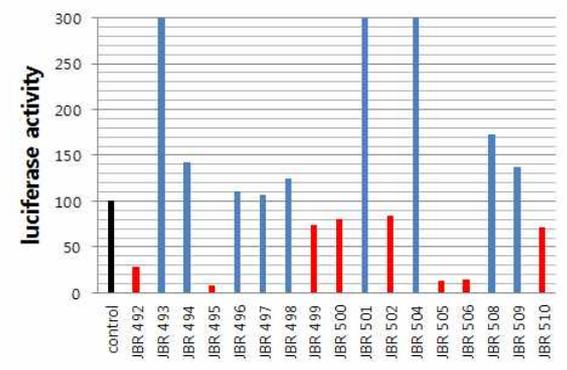
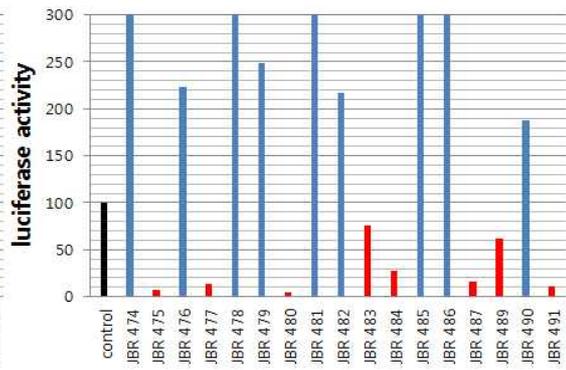
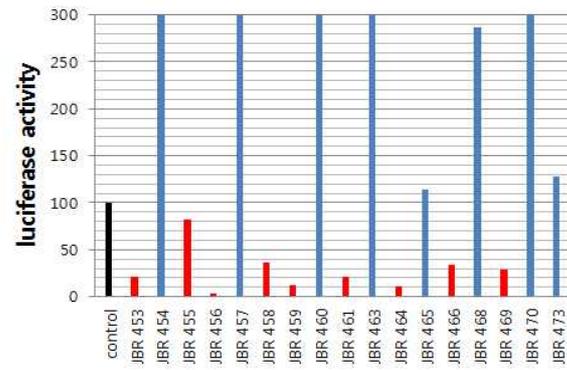
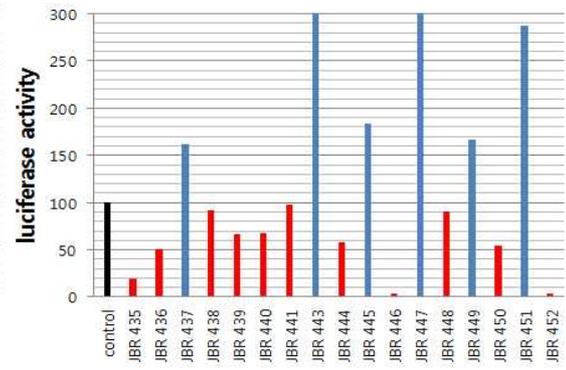
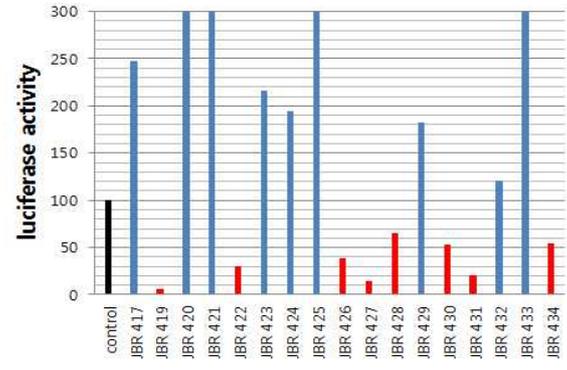


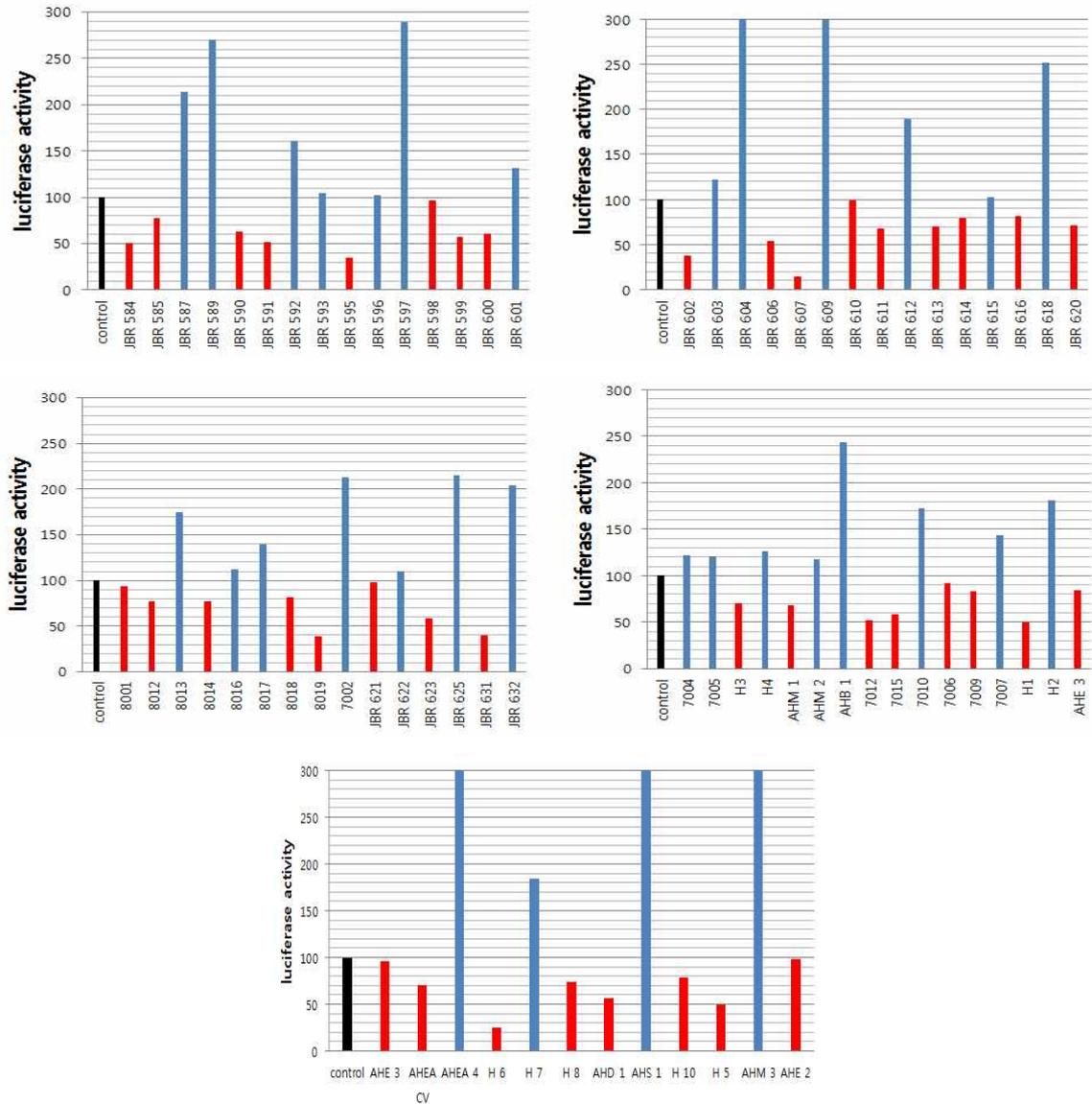












Luciferase 분석법을 이용한 761종의 국내 자원식물 추출물의 바이러스 증식에 미치는 영향

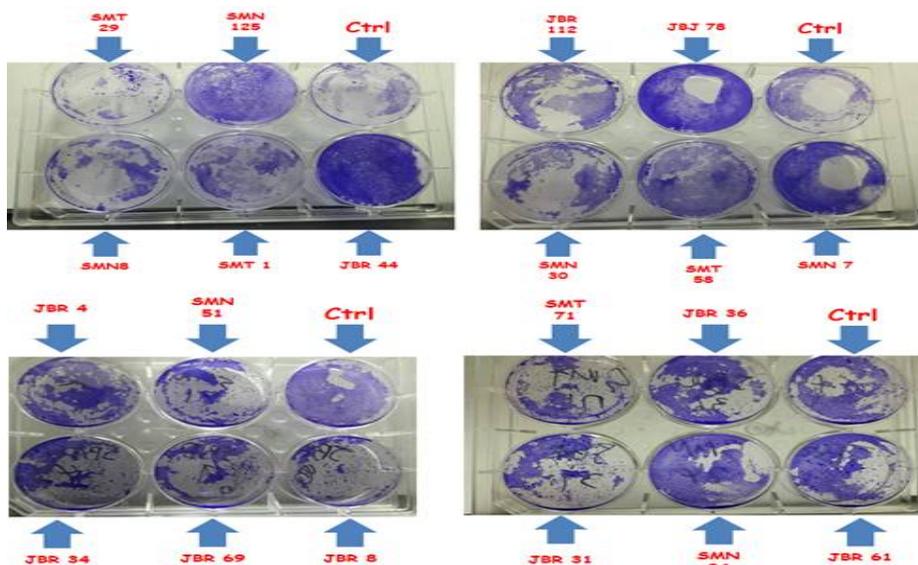
- 4) 다양한 국내 자원식물 추출물을 처리한 결과 각각의 추출물에 따른 바이러스 증식에 미치는 영향이 다름을 확인하였음
 - 공통적으로 나타내는 검은색 막대는 control, 빨간색 막대는 control을 100%로 하였을 시 각각의 추출물이 100%이하를 나타내며, 파란색 막대는 그 반대로 100% 이상을 의미함
- 가) 그 결과 10%이하 20종, 10~50%이하 138종, 50~100% 이하 193종, 100~200%이하 156종, 200~300%이하 74종, 300%이상 107종으로 각각의 국내 자원식물 추출물에서 바이러스 증식에 다른 영향이 있음을 확인함
- 5) 국내 자원식물 추출물을 이용한 Herpes Simplex Virus (HSV) 억제제 스크리닝

바이러스 억제 스크리닝에 사용된 자원식물 리스트

No.	sample	No.	sample	No.	sample
1	개망초	21	JBR 431	41	AHH-2
2	질경이	22	JBR 432	42	AHM-3
3	쑥부쟁이	23	JBR 480	43	AHEA-4
4	밤나무	24	JBR 338	44	AHB-2
5	가죽나무	25	JBR 267	45	AHD-1
6	조팝나무	26	JBR 278	46	AHH-3
7	구절초	27	JBR 368	47	AHM-4
8	낭독	28	JBR 341	48	AHEA-5
9	목향	29	SMN 32-1	49	AHB-3
10	밤나무	30	SMN 33	50	AHD-2
11	생달나무	31	SMN 35		
12	협죽도	32	SMN125		
13	담팔수	33	JBR 72		
14	비쭈기나무	34	JBR 266		
15	젖나무	35	JBR 268		
16	당유자	36	JBR 296		
17	갯가치수영	37	JBR 272		
18	통달목	38	JBR 404		
19	매죽나무	39	JBR 524		
20	천선과나무	40	AHE-1		

가) Luciferase 분석법 통해 얻은 결과물 중 10%이하의 몇 가지 자원식물 추출물 이용하여, plaque 분석법으로 재차 확인하는 연구를 진행하였음

- Control에 비해 국내 자원식물 추출물을 처리하였을 때 plaque 형성이 감소하는 경향을 보이는 것도 있었지만 추출물의 독성 또는 어떠한 문제점이 발생하여서인지 세포가 사멸하는 경우가 발생하였음. luciferase 분석법 통해 얻은 결과와 유사한 바이러스 증식을 보였으나, plaque 분석법으로 재차 확인 시 추출물 독성연구 및 추가 연구가 필요함



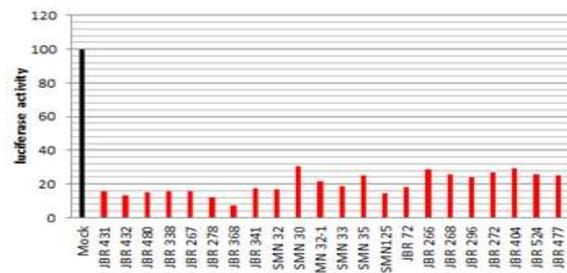
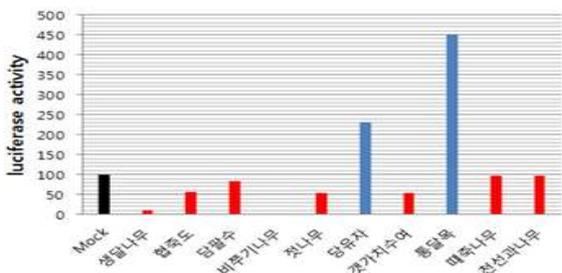
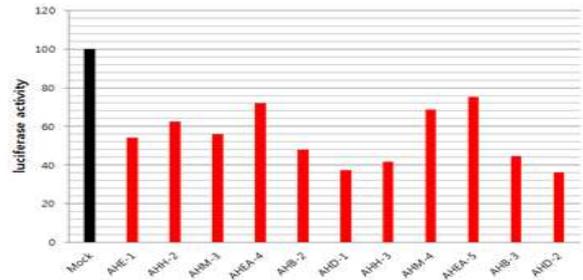
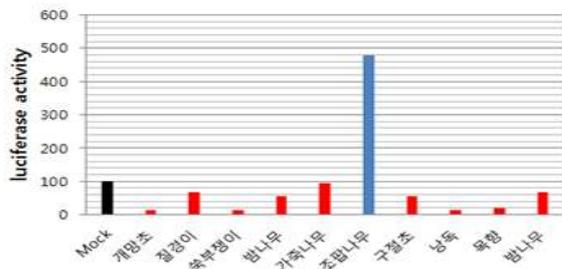
국내자원식물 추출물을 이용한 plaque 분석

나) HSV-1-luciferase를 이용하여, 1차 스크리닝을 한 자원식물 중 50가지의 자원식물을 추가적으로 luciferase 방법으로 스크리닝 하였음

- Vero 세포에 HSV-1-luciferase 바이러스와 자원식물을 함께 처리하여, 24시간 배양 후, luminometer를 사용하여 자원식물에 바이러스 증식 억제능을 확인해 결과를 수치화하여 나타낼 수 있음

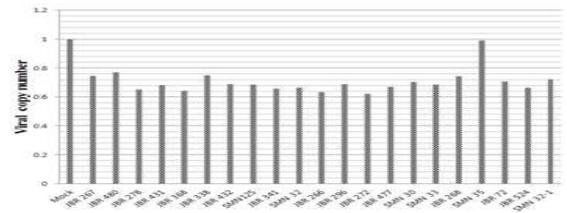
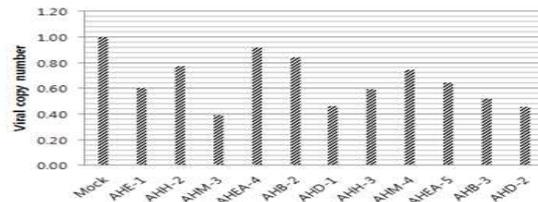
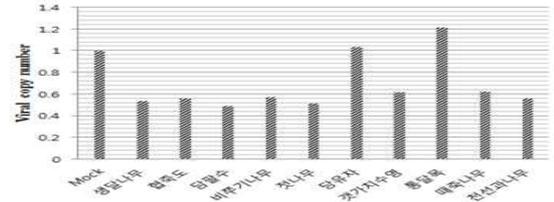
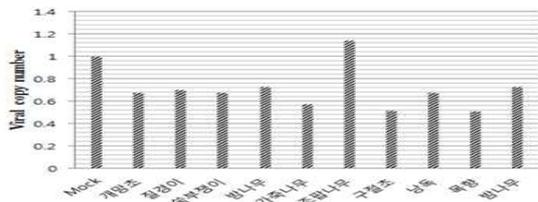
다) 본 연구진은 두 가지 실험기법을 사용하여 자원식물을 스크리닝 하였음

- Luciferase 분석에는 12 well plate에 Vero 세포를 배양하였고, HSV-1-luciferase를 바이러스 정량으로 얻어진 m.o.i.(=0.167) 값으로 1시간 감염 후, 총 50가지 자원식물을 25 µg/mL로 각각 처리하였으며, 24시간 배양 과정을 진행하고, luciferase 분석법으로 자원식물이 바이러스 증식 억제에 미치는 영향을 연구하였음



50가지의 자원식물의 바이러스 증식 억제에 미치는 영향을 luciferase 분석법으로 확인

- 본 연구진은 다양한 국내 자원식물을 처리한 결과 각각의 샘플에 따른 바이러스 증식억제에 미치는 영향을 그래프로 나타내었음. 그림에서 공통적으로 나타내는 검은색 막대는 세포에 바이러스만 감염한 control이고, 빨간색 막대는 control을 100%로 기준 하였을 시 바이러스 증식억제가 100%이하를 나타내며, 반대로 파란색 막대는 바이러스 증식억제가 100% 이상을 의미함
- 그 결과, 50가지의 자원식물 중 3가지 (조팝나무, 당유자, 통달목)를 제외한 47가지의 자원식물이 바이러스 증식 억제능이 있음을 확인하였음
- Real-time PCR로 바이러스 유전체양을 검출하여 자원식물의 바이러스 증식 억제 스크리닝을 진행하였음. 본 연구진은 바이러스 증식 억제능이 luciferase 결과로 도출된 자원식물을 확인 한바 다른 분석법인 Real-time PCR기법을 이용하여 자원식물에 처리에 따른 바이러스의 copy수를 스크리닝하였으며, 바이러스 감염과 자원식물 처리 방법은 luciferase 기법과 동일하게 진행하였음

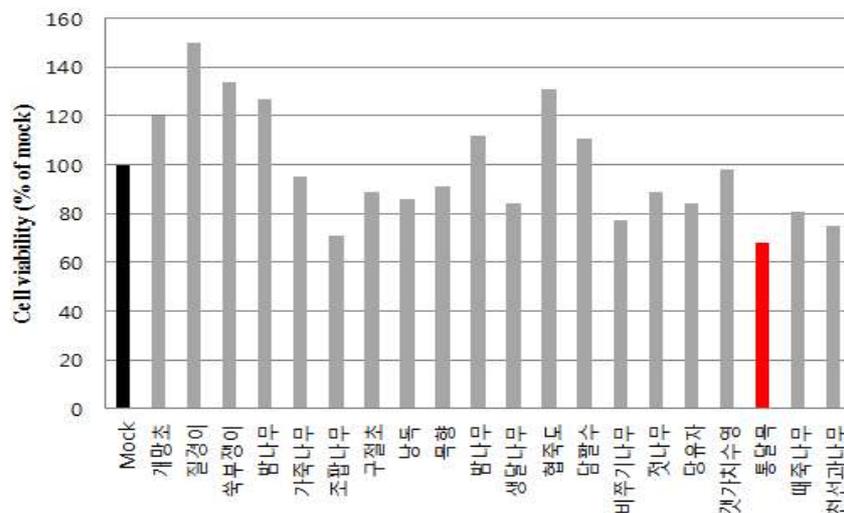


Real-time PCR을 이용한 자원식물의 바이러스 증식 억제능

- 본 연구진은 50가지의 자원식물이 바이러스 증식 억제에 따른 바이러스 copy 수를 Real time PCR로 확인 해본 결과, luciferase 분석법과 비슷한 결과가 도출되었으며, 50가지의 자원식물 중 3가지 (조팝나무, 당유자, 통달목)에서 증식억제가 다른 47가지의 자원식물에 비해 억제능이 다소 없었으나, 그 외의 자원식물에서 억제가 진행되었고, 큰 폭으로 억제가 진행 되는 자원식물도 확인되었음. 위의 도출된 결과로 자원식물 처리로 인한 바이러스의 copy 수에 영향이 발생하였다고 사료됨

라) 항바이러스제 후보 자원식물에 대한 세포 독성 평가

- 항바이러스제는 특이성이 있어야하며, 물에 잘 녹아야하고, 화학적-대사적으로 안정한 화합물이어야하며 흡수가 잘 되어야 좋음. 또한 독성. 발암성. 종양성, 돌연변이 유발성이 낮아야 함. 본 연구진은 후보 자원식물을 항바이러스로제 좀 더 극대화하기 위해 선별 된 각각의 자원식물에 독성을 확인하는 연구를 진행하였음



자원식물 추출물의 세포독성 평가

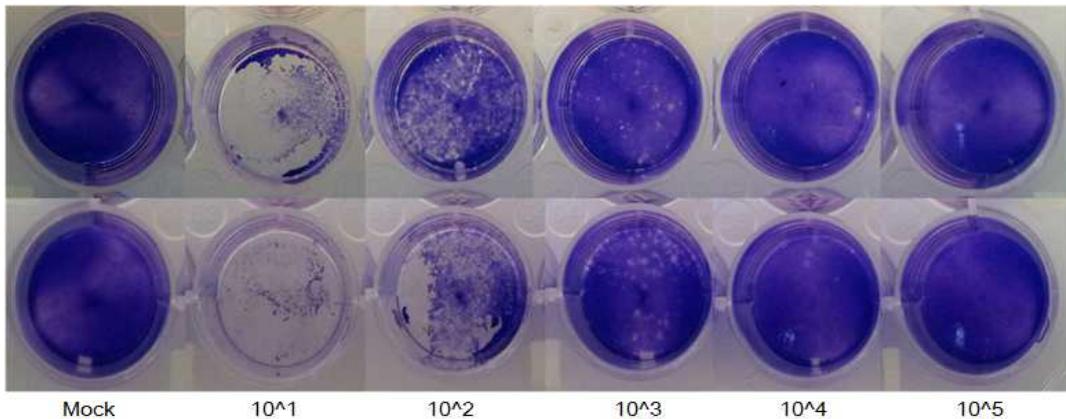
- 위의 독성 확인 실험은 MTT assay 실험 기법을 이용하여, 자원식물의 독성을 확인 하였음 (빨간색 막대는 검은색 mock에 비해 다소 독성이 있음을 의미함)
- MTT assay는 cell proliferation kit (Roche, Cat.11465007001)를 사용하였으며,

96well에 Vero cell을 1×10^5 cell/mL로 배양하고, 37°C CO₂ incubator 배양 16시간 후, 각각의 자원식물을 25 µg/mL로 처리하고 24시간 배양함. 24시간 배양이 끝나고 MTT assay buffer1을 각각의 자원식물에 10 µl씩 넣고, 4시간 37°C CO₂ incubator에서 배양함. 4시간 배양 후, MTT assay buffer를 각각의 자원식물에 100 µL씩 넣고, 24시간 배양함. 배양 후에, ELISA를 이용하여 595 nm에서 측정함

- 자원식물의 독성을 확인 한 결과, 총 50가지의 자원식물 중 6가지 (AHH-3, JBR431, JBR267, JBR278, JBR72, 통달목)에서 독성이 다소 있음이 확인 되었으며, 그 중 JBR431은 다른 샘플에 비해 독성이 비교적 높게 나타났음. 독성으로 인한 세포의 성장이 그 외에 44가지의 자원식물에서는 독성이 상대적으로 낮음이 도출되었으므로 항바이러스제로서 좋은 결과를 가져올 수 있다고 사료됨

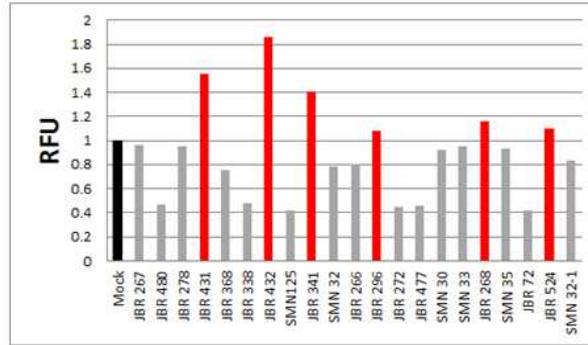
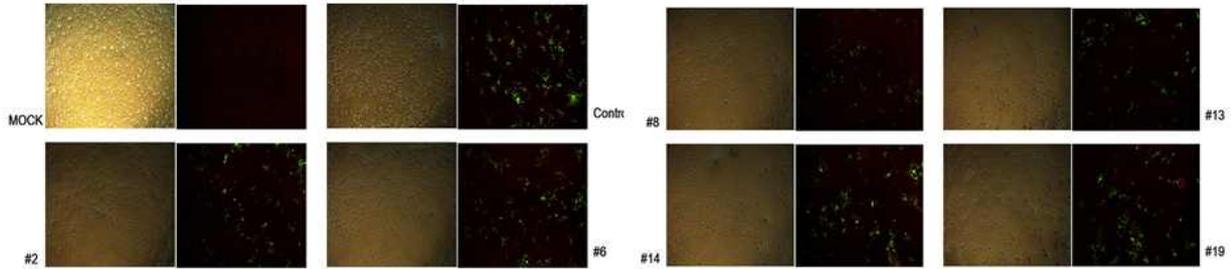
마) 형광현미경 및 Plaque assay를 이용한 항바이러스제 스크리닝

- 본 연구진은 형광현미경을 이용하여 자원식물의 바이러스 증식 억제능을 확인하고자 함. HSV-GFP 바이러스를 사용하므로써 형광현미경으로 관찰이 용이 할 것으로 사료 됨
- 바이러스 감염조건 확립은 HSV-GFP를 이용하여, 바이러스 감염농도에 따른 정량을 시행하였음. 정량에 따른 결과는 plaque 분석법으로 확인하였음
- 적절한 바이러스 감염 농도를 확립하기 위해 바이러스를 1/10 연속희석법으로 5번 희석하여, 각각 $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ 으로 6well plate에 배양 된 Vero 세포에 감염하였음



HSV-GFP를 이용한 바이러스 정량 plaque 분석

- 감염 3일 후, 바이러스에 감염 된 세포를 crystal violet으로 염색하여 plaque 분석한 결과 HSV-GFP 바이러스의 감염 조건은 m.o.i. (multiplicity of infection)= 0.001로 확립 됨
- 또한, 본 연구진은 형광현미경으로 바이러스 증식 억제를 관찰하기 위하여, 바이러스 정량으로 감염 농도가 확립 된 HSV-GFP를 이용하여 관찰하였음



자원식물 추출물 처리에 따른 HSV-GFP 발현 억제

- 형광 현미경 사진을 보면, Vero 세포에 아무 처리하지 않은 것 (Mock)과 바이러스만 처리한 것(control) 그리고 21가지 자원식물과 HSV-GFP (녹색 형광)를 함께 처리한 결과를 보여주고 있음. Mock의 경우 GFP 발현이 되지 않았으며, Vero 세포 (virus alone)에서 보이는 바이러스만 처리한 GFP 발현보다 자원식물을 함께 처리한 세포에서 GFP 발현이 비교적 적게 발현 되는 경향을 보임
- 또한 GFP 발현정도를 보면, 반대로 몇몇 자원식물에서 GFP 발현이 증가 되었으며, 이는 바이러스를 억제가 다소 약하게 발생한 것으로 사료 됨
- 결과로 도출된 바 자원식물에 처리로 인하여 바이러스 증식과 관련이 있을 것으로 사료됨

6) 담팔수 50% 가열추출물의 HSV 감염 마우스 모델에서 항바이러스 효능 평가

가) Herpes Simplex Virus (HSV) 및 HCMV에 대한 항바이러스 억제 효능 스크리닝 결과 담팔수 추출물에서 우수한 항바이러스 효능을 나타내어, 흰쥐에 HSV를 감염시킨 마우스 모델에서 마우스 생존율 및 바이러스 증식 억제에 우수한 효능을 나타낼 것을 사료됨

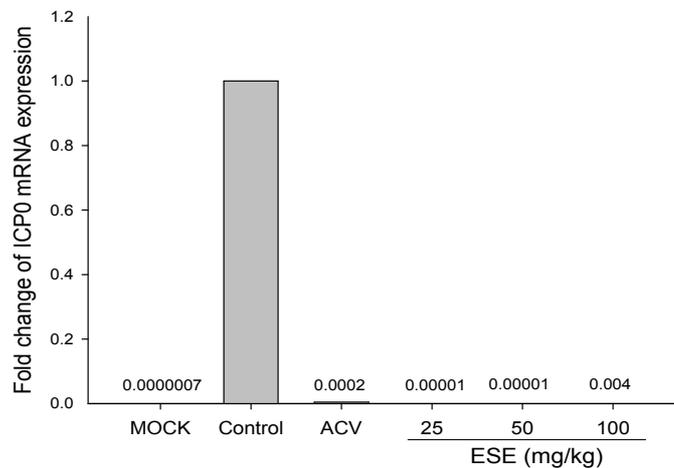
- BALB/c nude mouse는 전형적인 athymic 동물로, 흉선이라는 림프면역기관이 결손되어 있어 종양 연구와 면역유전학 분야에서 많이 사용되고 있는 동물. 단일클론항체 생성을 함으로 바이러스와 관련된 질환모델에 적합하여, HSV 감염 마우스 모델에서의 마우스 생존율 및 바이러스 증식 억제를 측정하고자 함
- HSV type 1은 Herpesviridae에 속하는 DNA virus로 3가지 유전자 (Immediate early, early, late gene)를 발현하며, 이 중 immediate early 유전자는 조절 단백질로 바이러스의 여러 유전자의 전사 조절을 담당함
- ICP0는 immediate early 유전자로, 많은 세포내 antiviral 유전자를 degradation 촉진하여 바이러스가 증식할 수 있도록 하는 유전자. 따라서 ICP0의 억제는 바이러스의 증식을 억제할 수 있는 기작임

- 실험군 설정

No.	군	투여약물 (p.o.)
1	정상군	Saline
2	대조군	Saline
3	양성대조군	Acyclovir(ACV) 25 mg/kg (i.p.)
4	담팔수 추출물 저농도 투여군	담팔수 추출물 25 mg/kg
5	담팔수 추출물 중농도 투여군	담팔수 추출물 50 mg/kg
6	담팔수 추출물 고농도 투여군	담팔수 추출물 100 mg/kg

- 항바이러스 평가 방법

- ① 군 분리 후 1주 순화
- ② HSV infection (5.75×10^7 PEU)
- ③ 하루 1회 10일간 담팔수 50% 가열추출물 경구투여
- ④ 매일 증세 관찰
- ⑤ 바이러스 감염 30일 후 생존한 마우스 해부
- ⑥ 폐 조직에서 ICP0 mRNA level 측정

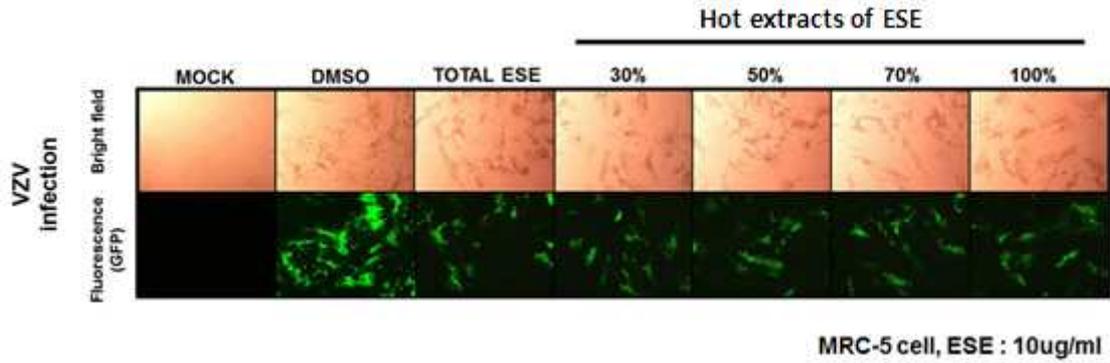


담팔수 EtOH 50% 가열추출물의 HSV 증식 억제 효능

- BALB/c nude mouse에 HSV 감염시 ICP0 mRNA의 발현이 확연하게 증가하였으며, 담팔수 EtOH 50% 가열추출물 및 양성대조군인 acyclovir 투여시 ICP0 발현이 정상군과 같은 수준으로 떨어짐을 확인. 따라서, 담팔수 EtOH 50% 가열추출물 투여는 HSV의 증식을 억제함

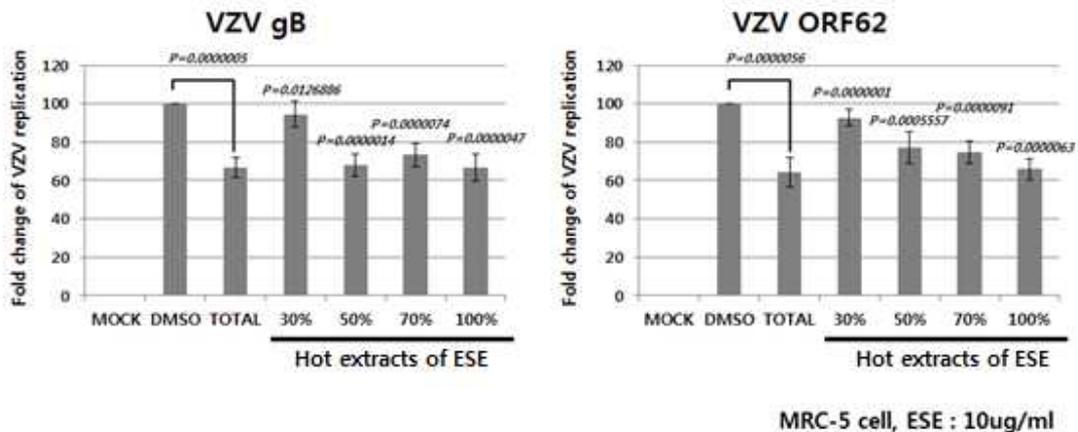
7) 담팔수 추출물을 이용한 Varicella zoster virus (VZV) 억제 효능 평가

- 가) 담팔수 50 % EtOH 추출물로 HCMV 및 HSV에 대한 연구가 진행되어 왔으며, 추가적으로 알파 헤르페스바이러스에 속하는 수두대상포진바이러스인 Varicella zoster virus (VZV)에 대한 항바이러스 효능을 현재 구축되어 있는 항바이러스 효능 검증 방법을 이용하여 분석하였음
- VZV 감염 가능 세포인 Human fetal lung fibroblast인 MRC-5 세포를 VZV pOk strain으로 감염된 세포와 함께 cell-to-cell 비율을 1: 8로 맞추어 배양하여 감염시키고 담팔수 total extract (80 % EtOH) 및 EtOH %별 가열추출물을 10 µg/mL의 농도로 처리한 뒤, 감염 3일 후 세포를 harvest하여 GFP 발현 및 바이러스 복제 분석을 통해 VZV 억제 효능을 검증하였음



담팔수 가열추출물의 VZV-GFP 복제 억제 효능

- 담팔수 total 및 EtOH %별 가열추출물에서 모두 GFP 발현이 저해되었음
- 바이러스 복제 억제 효능을 VZV glycoprotein B (gB) 및 open reading frame 62 (ORF62) DNA를 이용하여 qPCR을 통해 분석한 결과, 30 %를 제외한 모든 열수추출물에서 VZV 복제 억제 효능이 나타남



qRT-PCR을 이용한 담팔수 가열추출물의 VZV 복제 억제 효능

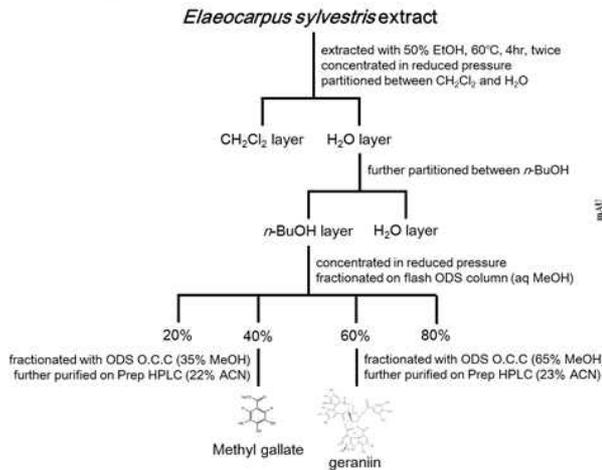
8) 담팔수 추출물의 추출공정 개발

가) 담팔수 %별 주정추출물 제조에 따른 항바이러스 효과

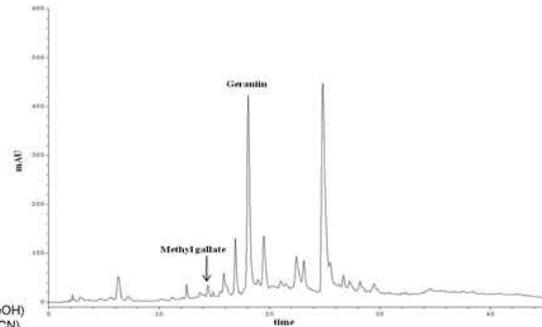
EtOH (%)	0	30	50	70	100
EC50	143.78 ± 2.51	42.6 ± 0.85	23.2 ± 0.22	28.5 ± 0.37	63.8 ± 1.82
IC50	> 500	358.5 ± 2.37	342.8 ± 2.59	209.4 ± 3.61	184.3 ± 1.68

- 해당 결과를 바탕으로 담팔수를 50% 주정으로 추출
- 나) 유효성분 분리 및 규명
 - Activity guided fractionation을 통한 유효성분 분리 및 규명

✓ Scheme



✓ 성분분석



Methyl gallate. White amorphous powder; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 3.73(3H, s, OCH₃), 6.97(2H, s, H-2,6); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 8536(OCH₃), 110.0(C-2,6), 121.4(C-1), 139.5(C-4), 146.4(C-3,5), 169.1(C=O); ESIMS *m/z* 207 [M+Na]⁺.

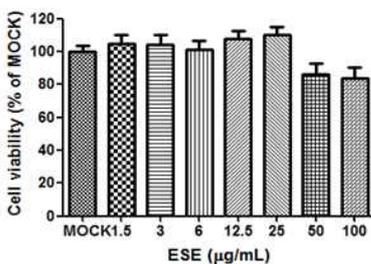
Geraniin. Brownish amorphous powder; A form: ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.30~5.56(6H, m, H-Glc H), 5.45(1H, s, H-1''), 6.57(1H, br s, H-Glc 1), 6.58(1H, s, H-3''), 6.93(1H, s, H-3'), 7.10(1H, s, H-3), 7.12(2H, s, H-G 2,6), 7.23(1H, s, H-3'''); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 42.1(C-1''), 63.9(C-Glc 3), 64.4(C-Glc 6), 66.4(C-Glc 4), 70.2(C-Glc 2), 73.3(C-Glc 5), 91.7(C-Glc 1), 95.9(C-6''), 96.5(C-5''), 110.9(C-3'), 110.0(C-3), 111.2(C-G 2,6), 114.1(C-3'''), 115.4(C-1''), 116.1(C-1'), 117.6(C-1), 119.2(C-2'''), 120.1(C-G 1), 124.2(C-2), 125.7(C-2), 130.2(C-3''), 137.5(C-5'), 138.9(C-5), 139.8(C-5'''), 140.9(C-G 4), 143.3(C-6'''), 145.3(C-4), 145.5(C-6'), 145.6(C-6), 146.2(C-4'), 146.4(C-4'''), 146.4(C-G 3,5), 166.1(C-G 7), 166.2(C-7'''), 166.4(C-7''), 167.6(C-7), 170.1(C-7'), 192.4(C-4''); B form: ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.39~5.47(6H, m, H-Glc H), 4.95(1H, s, H-1''), 6.24(1H, s, H-3''), 6.63(1H, br s, H-Glc 1), 6.89(1H, s, H-3'), 7.10(1H, s, H-3), 7.12(2H, s, H-G 2,6), 7.25(1H, s, H-3'''); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 52.6(C-1''), 62.9(C-Glc 3), 64.6(C-Glc 6), 67.2(C-Glc 4), 70.6(C-Glc 2), 73.5(C-Glc 5), 92.7(C-Glc 1), 96.4(C-5''), 108.7(C-6''), 110.7(C-3'), 110.0(C-3), 111.2(C-G 2,6), 114.5(C-3'''), 116.1(C-1'), 117.1(C-1), 117.7(C-2'''), 120.0(C-1'''), 120.0(C-G 1), 124.2(C-2), 125.1(C-3''), 125.5(C-2'), 137.5(C-5'), 138.2(C-5'''), 138.8(C-5), 140.9(C-G 4), 145.3(C-4), 145.5(C-6'), 145.6(C-6), 146.1(C-4'), 146.5(C-G 3,5), 147.2(C-5'''), 148.3(C-4'''), 165.7(C-7'''), 166.1(C-G 7), 166.5(C-7''), 167.6(C-7), 170.1(C-7'), 195.3(C-4''); ESIMS *m/z* 975 [M+Na]⁺.

- 최종 유효성분이자 지표성분으로 Methyl gallate와 geraniin 선정

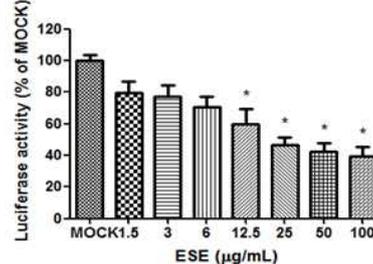
9) 담팔수 50% 주정추출물의 항바이러스 효능 검증 및 작용점 분석

가) 항바이러스 효능 검증

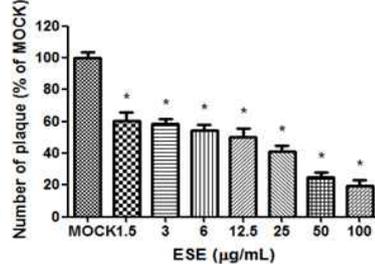
✓ 세포독성 확인



✓ Luciferase assay



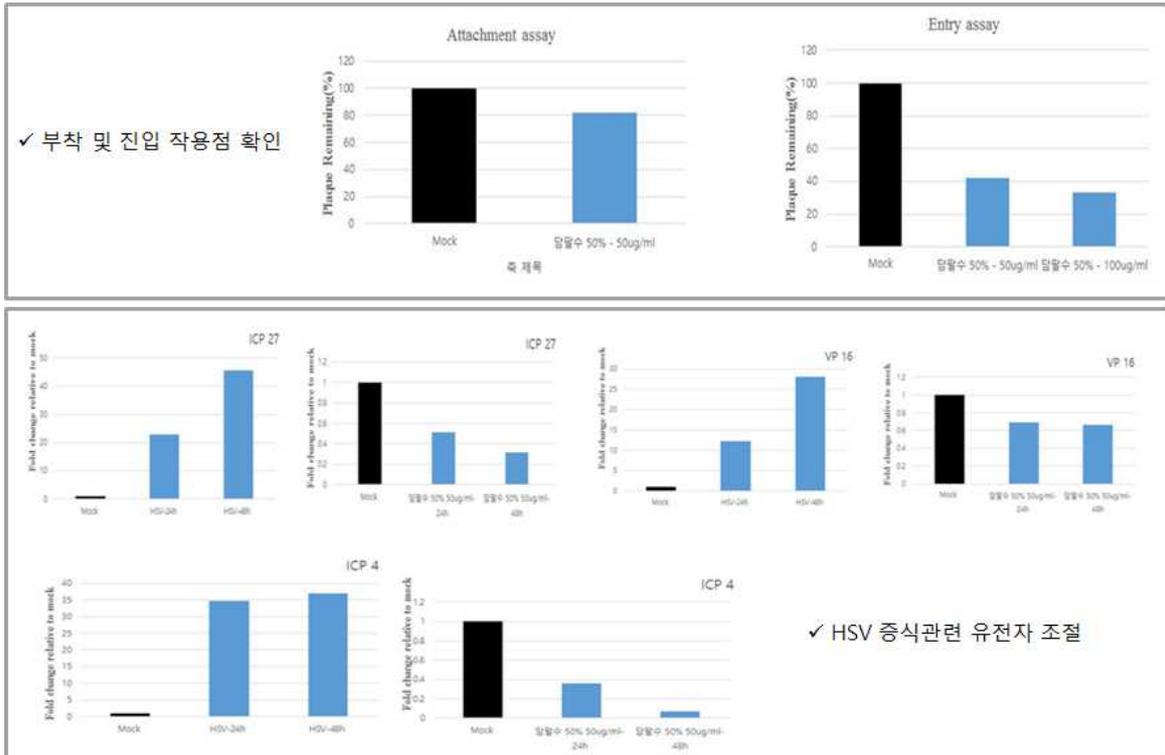
✓ Plaque 분석



- 담팔수 50% 주정 추출물의 항바이러스 효능을 확인

나) 항바이러스 작용기전 분석

- 바이러스 부착과 진입 과정에 발현되는 유전자 분석을 통해 담팔수 50% 주정 추출물의 작용점 확인

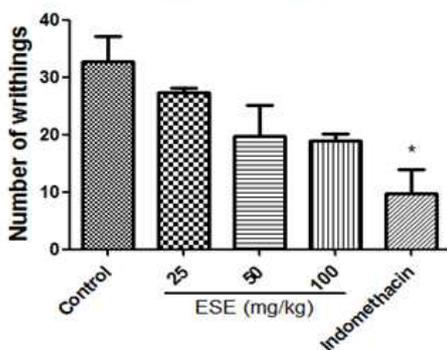


- 담팔수 50% 주정추출물은 바이러스 부착에는 다소 약하게 작용하나 진입 과정에서 매우 높은 감소율을 나타냄
- 또한 바이러스 증식에 있어 초기 발현 유전자로 알려진 ICP27, ICP4, VP16의 발현량을 분석한 결과 모두 매우 우수한 억제 효과를 나타냄

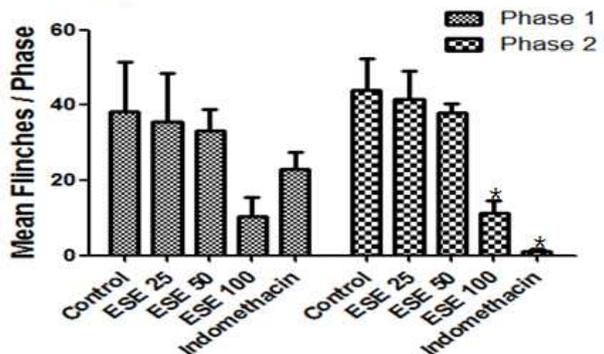
10) 급성/만성 통증 동물모델을 통한 진통효과 규명

- 가) 대상포진의 경우 매우 극심한 통증을 수반하므로 담팔수 50% 주정추출물의 통증 억제 효과를 acetic acid-induced writhing test와 formalin test를 이용하여 급성 (말초성) 및 만성 통증억제 효과를 규명함

✓ Acetic acid-induced writhing test



✓ Formalin test



- 담팔수 50% 주정추출물은 급성 및 만성 통증 모두 dose-dependent하게 억제시킴을 확인함

바. IND 자료를 위한 항바이러스 치료제 연구개발의 의학적 고찰

- 1) 소득수준 향상, 인구의 고령화, 만성질환 관련 의약품에 대한 수요증가, 수명증가 등으로 인하여 전 세계적으로 의약품 시장이 성장하고 있는 가운데, 천연물 소재와 바이오 의약품의 연구개발이 국내(외) 제약 산업에서 증대되고 있는 실정이며, 그 가운데 전 인류의 숙제인 AIDS 치료제 개발 및 간질환 인플루엔자 질환 치료제 개발의 기초가 되는 항바이러스 치료제 관련 연구 및 이를 활용한 치료제 개발, 의료기술 및 삶의 질 향상과 기술 개발에 대한 요구가 증대되고 있음
- 2) 바이러스로 인해 야기되는 질병에 대한 치료제로 체내에 침입한 바이러스의 작용을 약하게 하거나 소멸하게 하는 약을 항바이러스 치료제라 하며, 현재 바이러스 감염증에 대한 치료법은 백신에 의한 면역요법이 주축을 이루고 있음
 - 가) 테트라시클린, 클로람페니콜 : 트라코마, 제4성명(성병) 등 클라미디아 (대형 바이러스)에 의한 감염증 치료
 - 나) 아만타딘 : 인플루엔자 A형 바이러스에 대한 예방 효과
 - 다) IDU(이독스우리딘) 점안제 : 헤르페스 각막염에 대한 예방효과
 - 라) 피다라빈이/아시클로빌 : 단순 헤르페스 뇌염(뇌염)이나 면역억제 환자에게 발생하는 대상포진에 유효한 약품으로 개발되어 새로운 항바이러스제로 주목받고 있음
 - 마) 인테페론 : 바이러스 감염증에 대해 가장 유망시되는 약제로, 현재 그 유용성이 검토되고 있음
- 3) 난치성 질환의 상당 부분이 바이러스 질환으로 항바이러스 치료제 시장의 성장 잠재력이 높게 평가되고 있으며, 현재 사용되고 있는 바이러스 치료제로는 각종 화학약품들과 인터페론이 있으나 임상에서 많은 한계점들을 가지고 있음

사. 헤피스바이러스 감염의 고찰 및 경쟁약물

- 1) 헤피스바이러스는 전 세계 정상 성인의 약 60% - 95%에서 감염이 확인될 정도로 가장 널리 퍼져 있는 감염 질환이며, 한 번 감염이 일어나면 평생 인체 내에서 대부분 잠복 형태로 존재함. 또한, 면역이 저하된 사람에서는 심각한 합병증을 초래할 수도 있고 잦은 재발은 스트레스의 원인이 되기도 함. 그러나 바이러스를 완전히 없앨 수 있는 방법은 아직 없으며 치료법에 대한 지침이 혼돈스러운 것이 현실임
 - 가) 따라서 본 약물요법에서는 헤피스바이러스 치료에 대한 국내 보험 기준과 미국식품의약품국 (Food and Drug Administration, FDA)과 질병통제센터 (CDC)의 권고사항, 외국에서 보고된 임상시험에 따른 근거 바탕치료법에 대해 기술하고자 함
- 2) 헤피스바이러스는 Herpesviridae에 속하는 바이러스로 현재까지 80종 이상의 herpesviruses가 알려져 있으나 이 중 8종만이 인간에게 질병을 유발하는 병원체임 (herpes simplex virus-1 (HSV-1), herpes simplex virus-2 (HSV-2), varicella zoster virus, cytomegalo-virus, Epstein-Barr virus, human herpesviruses 6과 7, 그리고 카포시육종 관련 herpesvirus (type 8) 등)
- 3) 입술 헤피스는 대부분 herpes simplex type 1 (HSV-1)이, 성기 헤피스는 herpes simplex type 2 (HSV-2)가 유발 하며, 재발이 특징적인데 빈도가 다양하나 평균 1년에

한번 정도이고 나이가 들면서 빈도와 중증도는 감소함. 재발을 일으키는 원인으로는 정신적인 스트레스 피곤함, 자외선이나 열, 추위 등에 노출됨, 성접촉, 월경, 발열, 면역저하, 스테로이드투여, 레이저수술, 외상, 신경손상 등이 있음

- 4) 50세 이상 성인의 90%가 HSV-1에 대해 혈청반응 양성을 보이는 것으로 알려져 있으며, 혈청반응 양성률은 나이, 인종, 지역, 사회 경제적 상황에 따라 차이가 있어 인구밀도가 높고 사회 경제적 지위가 낮은 곳에서 더 높게 나타남. 미국의 통계에 의하면 성기 허피스의 경우 12세 이상의 인구 중 약 4,500 만 명이 감염되어 있는데 이는 청소년과 성인의 5명중 1명꼴 이라고 하며 여자에서 남자보다 더 흔함
- 5) 허피스는 피부 또는 점막에 붉은 기저부 위에 군집을 이루는 작은 물집을 보이며 그 자리에 소양감이나 작열감을 호소하는 급성수포성 질환임. 감염부위 면역상태에 따라 다양한 증상이 발생하며 재발성 보다 원발성 일 때 증상이 더 심하고 합병증 또한 더 많고 심함. 임상양상은 입술 허피스, 성기 허피스, 허피스 손끝염 (herpetic whitlow), 허피스 습진 (eczema herpeticum)과 같은 점막 피부감염으로부터 태아와 신생아 단순 허피스 증추와 말초신경계 감염 면역 저하 상태에서의 치명적 감염까지 다양함
- 6) 치료는 예방으로부터 시작해야 하며, 즉 일반인들에게 질환의 접촉에 의해 감염 된다는 특징, 자가 접촉의 가능성 바이러스 확산을 막는 방법 등에 대한 교육이 요구됨. 대부분의 허피스는 치료가 필요하지 않고 병변을 깨끗이 하고 건조하게 유지하는 것만으로 자연치유가 됨. 치료는 병변이 오래 지속 되고 증상과 합병증이 동반 될 것 같은 경우 시행하며, 현재 허피스 감염에 대한 치료는 바이러스를 완전히 없앨 수는 없으므로 전염을 막고 재발을 억제하며 임상증상 바이러스확산 합병증을 완화하는 것이 목표임. 항바이러스제는 바이러스의 복제와 이에 따른 상피손상을 억제함으로써 감염의 임상 경과를 조절 하게 되며, 허피스의 자연 경과에 따라 재발이 된지 첫 48시간 내에 바이러스 복제를 억제하는 것이 매우 중요함
- 7) 항바이러스제 경로별 특징 : 항바이러스제는 국소, 경구, 정맥 내 경로로 모두 사용할 수 있으며, 국소약물은 대체적으로 다른 경로의 약제에 비해 효과가 떨어지는 것으로 알려져 있음. 비중격, 내이 (內耳), 두피, 외음부 내부의 병변에는 전신 요법을 사용해야 하며, 국소약제에 비해 경구약제는 전신적으로 약물이 분포되고 바이러스 복제가 일어나는 곳으로 빠르게 도달할 수 있으므로 생체이용률이 높고 사용 횟수가 적어 환자의 순응도가 좋은 장점이 있음. 또 재발이 잦고 병변이 심한 경우 장기적인 억제 요법에 사용할 수 있음
- 8) Acyclovir, 9-[(2-hydroxyethoxy)methyl] Guanine : 허피스바이러스 1형 2형과 varicella-zoster 바이러스 및 Epstein-Barr 바이러스 등 허피스바이러스의 복제를 아주 강력하고 선택적으로 억제하나 cytomegalovirus 감염에는 효과가 적은 단점이 있으며, Acyclovir는 acyclic guanosine analogue로 바이러스의 polymerase와 DNA 복제를 표적으로 함. 약제로 작용하기 위해서는 일차로 바이러스에서 나오는 thymidine kinase (TK)에 의해 인산화를 거쳐 일인산 (monophosphate) acyclovir로의 전환이 필요한데 감염되지 않은 세포에서는 이런 인산화과정이 거의 일어나지 않기 때문에 감염된 세포 내에 acyclovir의 선택적인 축적이 일어나게 됨. 일인산 acyclovir는 다시 삼인산 triphosphate acyclovir로 전환되어 바이러스DNA 중합효소를 억제하고 복제되는 바이

러스의 DNA 사슬에 합일화가 되어 불가역적으로 DNA가 연장되는 것을 차단함으로써 초기에 바이러스의 성장 및 복제를 막을 수 있음. Acyclovir는 정맥주사 경구 및 국소 투여가 가능하며 안전성이 잘 확립되어있고 환자들이 잘 사용 할 수 있음. 면역 손상 환자에서는 정맥주사를 통한 투여가 바람직하여 그에 따른 회복에 걸리는 시간 통증의 기간 및 바이러스의 전파를 줄이는 효과를 기대할 수 있으며, 성기 허피스에서는 정맥 주사와 경구투여 모두 증상기간을 줄이고 바이러스 전파를 감소시키며 일차 감염일 경우에는 회복을 촉진시킴. 그러나 이러한 치료가 추후 재발의 빈도를 감소시키지는 못하는데 이는 acyclovir가 잠재성 감염을 제거하는데 효과가 없음을 의미하며, 그러나 생체이용률이 매우 낮고 (10-20%), 혈장 내 반감기가 짧으므로 (성인3시간) 자주 투여해야 하는 단점이 있음. 또한, 대사되지 않은 상태로 사구체 여과와 세뇨관 분비를 통해 신장으로 배설되므로 신장 기능이 저하된 환자에 투여하는 경우에는 크레아티닌 청소율에 따라 용량을 조절해야 하며, 고용량으로 정맥주사를 빠르게 하면 드문 부작용인 가역적 결정 콩팥병증 (reversible crystalline nephropathy)을 초래할 수 있음. 임신 기간 동안의 acyclovir의 투여는 FDA 임신카테고리 (category)로 생명을 위협하는 경우나 심한 감염이 있는 경우에는 사용하여야하며, 국내 승인 적응증은 성기 허피스를 포함한 점막 및 피하에 발생한 원발성 재발성 단순 허피스의 예방 및 치료 대상포진 감염증 치료 2세 이상의 소아수두 치료로 되어 있음. 2세 미만의 소아에서 경구 제형의 안전성과 유효성을 확립되어 있지 않으며 입술 허피스는 국내에서는 국소제형의 사용만이 급여 인정되고 있음

9) Valacyclovir hydrochloride, 2-[2-amino-1,6-dihydro-6-oxo-9H-purin-9yl-methoxy]ethyl-L-valinate hydrochloride : Acyclovir의 L-valine ester체로 간과 창자에서 체내에서 acyclovir과 L-valine으로 전환되어 같은 기전에 의해 바이러스의 복제를 억제하며, Acyclovir에 비해 위장관을 통한 흡수가 더 잘 되어 생체이용률이 5배 정도 (75-77%) 높아 경구 투여인 경우 횡수를 줄 일수 있어 환자의 순응도를 높일 수 있음. 현재 경구 제형만 생산되며 대부분 acyclovir를 사용 할 때와 같은 부작용과 주의를 요함. 가장 흔하게 보고된 부작용은 두통이며 특별히 면역손상 환자에서 장기간 고용량 (매일8g) 으로 사용하는 경우에는 매우 심각하고 생명을 위협 할 수 있는 혈전미세혈관병증 thrombotic microangiopathy)에 유의하여야 함. 국내 보험허가 사항은 대상포진 및 이로 인한 통증의 치료 원발성 및 재발성 성기 허피스의 치료 성기허피스의 재발억제 안전한 성생활을 병행하는 경우 억제요법으로서의 성기 허피스의 전염감소, 신장이식 후 거대세포바이러스 감염예방, 입술 허피스 등임

10) Famciclovir, [9-(4-hydroxy-3-hydroxy-methylbut-1-yl) guanine] : Penciclovir, [9-(4-hydroxy-3-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine]의 diacetyl ester 전구약물로 위장 관계에서 신속히 흡수되어 활성대사체인 penciclovir로 변환되며, 이후 acyclovir와 같은 기전에 의해 DNA polymerase를 억제하고 DNA 사슬 연결을 방해함. 이 약제는 penciclovir 자체보다도 경구흡수가 개선되어 생체이용률이 높으므로 (77%) 투여 간격이 길어질 수 있게 되었으며, 혈중반감기는 2시간이고 60-70%의 약제는 대사되지 않은 채로 사구체여과와 세뇨관 분비를 통해 신장으로 배설됨. 경구제형 외에도 외국에서는 1% 연고제도 사용할 수 있으며, 신장기능이 저하된 환자에서는 용량을 낮

취야 하고, 두통, 구역, 설사, 어지러움 등의 부작용이 있을 수 있음. 국내 보험허가 적용증은 성기 허피스 감염증의 치료 및 재발성 성기 허피스의 억제 대상포진감염증의 치료임

11) Trifluridine, Foscarnet, Cidofovir : Trifluridine은 pyrimidine nucleoside analog로 전신적인 독성 때문에 점안액 1%로만 허피스 각막염에 사용하며, 국내에서도 사용이 가능함. Foscarnet는 pyrophosphate analog로 바이러스 DNA polymerase의 pyrophosphate 결합 부위를 억제하며 다른 약제와 달리 항바이러스 효과를 위해 인산화를 필요로 하지 않음. 대부분 정상 건강 성인에서는 acyclovir 내성이 흔하지 않으나 면역저하숙주에서 acyclovir 내성 HSV 감염이 있을 때 사용할 수 있는 정맥내주사제임. 신장독성의 위험이 있으므로 충분히 희석하여 1-2시간에 걸쳐 주입펌프를 이용해서만 투여해야 하며, 국내에서는 아직 생산 유통되지 않고 있음. Cidofovir는 phosphonate nucleotide analog로 역시 바이러스의 kinase에 의한 인산화를 필요로 하지 않으며 숙주세포효소에 의해 이인산염으로 전환되어 바이러스 DNA polymerase를 억제함. 이 약제는 정맥내주사인 경우 신장 독성이 매우 강해서 미국질병통제센터에서는 acyclovir와 foscarnet 내성인 허피스 감염증에만 사용하도록 권하고 있으며, 반감기가 무척 길어서 주 1회 주사로 충분함. 반면 1% gel 제형은 비교적 안전하여 acyclovir 내성 허피스 감염증에 사용하나, 국내에서는 생산 유통되지 않는 약제임

12) 본 과제인 천연물로부터 항바이러스제 개발을 위한 IND filing : 본 연구에서는 이러한 바이러스의 증상 및 치료, 치료제의 기준에 근거하여 임상프로토콜 개발 및 개발 배경, 이화학적 성질, 구조, 제제, 제형, 기시법 생산공정 설정 및 표준화, 전임상 및 약리 기전 자료를 포함한 일체의 IND를 위한 표준 filing을 진행

아. IND 자료를 위한 자료 수집 및 항바이러스 치료제 연구방법의 고찰

1) 안전성 평가

가) 이상반응의 종류 : 사람에서의 이상반응은 다음의 네 가지 유형으로 구분

- 과장된 약리 효과 (exaggerated pharmacological effects) - 약물의 주요 약리효과에 따라서 일반적으로 미리 예측될 수 있는 효과들이다.
- 부작용 (side effect)은 목표 장기 이외의 기관에서 약물의 효과가 발현될 때 일어나는 효과를 말한다.
- 농도의존적 독성반응 (dose-related toxic effects)은 화학적인 대사체의 용량에 의해 비목표 장기에 독성을 일으키는 것을 말함. 유전 혹은 생식독성이 이 범주에 속하고 비교적 예측 가능함. 독성 연구의 목표 중의 하나는 이런 용량 관련 독성을 일찍 제거하는 것이다.
- 특이 반응 (idiosyncratic reactions)은 드물고, 가끔 심각한 부작용으로서 몇몇 개인에게 나타나는 용량 비의존적인 독성임. 이 종류의 독성은 발생 빈도가 낮아 동물 실험에서는 잘 밝혀지지 않고 임상시험 중에 발견된다.

나) 안전성약리시험 : 효력 연구는 일반적으로 탐색적이며 가설기반인데 반해, 안전성약리시험은 약물에 치료 용량으로 노출되었을 때 발생할 수 있는 바람직하지 않거나 위험한 효과를 규명하기 위한 목적으로 정해진 프로토콜에 따른 시험들로 구성됨. ICH 가이드라인 S7A에서는 안전성약리시험 중 핵심시험 (core battery)과 추가시험

및 추적시험에 대해 설명하고 있다.

다) 용량 범위 확인을 위한 탐색적 독성연구 : 독성평가의 첫 단계는 설치류/비설치류를 대상으로 용량 범위를 확인하는 것이다. 일반적으로 독성시험에는 마우스, 랫드, 기니픽, 햄스터, 토끼, 개, 미니피그 및 영장류 동물이 사용된다. 일반적으로 첫 시험에서는 그룹 당 3~4마리의 설치류 동물에 대해, 넓은 간격의 용량 (예 10, 100, 1000 mg/kg)을 투여하며, 독성의 명확한 증상이 드러나는지 여부를 14일 이상 관찰하거나, 각 동물에 대해 일정 간격으로 용량을 증가시켜 투여하면서 독성증상이 나타나거나 2000 mg/kg가 될 때까지 투여한 다음 부검하여 영향을 받은 장기를 확인한다. 그 다음 독성이 나타나지 않는 용량에서 추정 무독성량을 넘어서는 용량까지 4~5개 용량에 대해 2종 이상의 동물을 대상으로 시험한다. 단회투여 독성시험을 실시한 다음 반복투여 독성시험을 보통 2주간 실시한다. 이러한 연구들은 예비적인 성격의 연구로서 최초 사람대상 적용을 뒷받침하지는 못하므로 보통 GLP에 따라 수행되지 않으며 시험물질을 GMP에 따라 생산하지 않아도 된다.

라) 유전독성 : 외부 물질은 다양한 방법으로 유전자의 기능에 영향을 미치는데 주로 다음의 두 가지 방법으로 독성이 발현

- 돌연변이(mutagenicity) - 세포 및 그 자손에 비정상적인 유전자 발현을 유발하는 DNA의 화학적 변이. 일반적으로 돌연변이는 개별 염기들의 공유결합 변화에 따라 발생함 (점 돌연변이). 돌연변이가 발생한 위치에 따라서 비정상적인 단백질이 생산되거나 단백질 발현량이 변하게 됨
- 염색체 손상(chromosomal damage) - 염색체의 절단, 융합, 염색체상에서 일부 DNA의 위치변경, 염색체의 복제 또는 삭제 등. 이러한 변경은 DNA 변경에서 기인하고 돌연변이보다 광범위하나, 그 기전은 잘 알려져 있지 않음. 유전독성시험의 최종 목표인 발암성과 생식독성 평가는 장기간의 동물연구를 통해서만 가능함. 그리고 많은 경우에 유전독성은 모 약물보다는 활성대사체로 인해 발생하므로 *in vitro* 시험은 대사체가 생성될 수 있는 조건을 포함함. 대표적인 유전독성시험에는 Ames test, 염색체이상시험, 소핵시험이 있음

마) 장기 독성시험 : 장기독성시험의 목적은 반복투여 후 항정상태에 도달했을 때 발현되는 독성을 확인하는 것이다. 장기독성시험에서는 대조군을 포함한 세 가지 이상의 용량군이 시험된다. 그 용량에는 확실하게 독성이 나타나는 용량과 치료범위 용량 및 그 두 용량 사이의 최소 1개 용량을 포함한다. 이상적으로는 두 용량 사이의 용량이 설치류에 있어서는 예상 임상 용량의 10배, 비설치류에 있어서는 5배 이상이면서 분명한 독성이 나타나지 않는 용량이어야 하며 이는 규제당국에서 일반적으로 요구하는 범위이다. 그리고 이런 연구에서 결정하고자 하는 것은 약물이 인체에 축적되었을 때에 미칠 수 있는 효과와 어느 정도 노출 수준에서 그러한 효과가 나타나는 것이다.

사) 발암성시험 : 약물이 6개월 이상 연속적으로 사용되거나 장기간 동안 간헐적으로 사용되는 경우에는 일반적으로 임상시험시작 전까지는 아니지만 시판 전까지는 발암성시험이 요구된다. 또한 다음과 같은 경우에도 요구된다.

- 화합물이 발암물질과 동일한 종류에 속하는 경우 또는 화합물의 특성이 발암성과 관련이 있는 경우 (최근에는 이러한 화합물들은 후보물질 확인 단계에서 제거)

- 장기독성시험에서 발암 전단계의 변화를 나타내는 경우
- 화합물 및 그 대사체가 조직에 오랫동안 남아있는 경우
- 어떤 화합물이 유전독성시험에서 양성이며 그 화합물은 발암성이 있다고 가정되어야 한다. 최근까지는 보통 2종의 설치류에 대한 장기시험이 요구되었으나, 종양생물학에 대한 이해 및 단기간의 평가를 가능하게 한 새로운 모델의 이용가능성 증가에 따라 최근에는 한 종의 장기시험과 잘 밸리테이션 된 단기시험에서 얻은 데이터로 대체가 가능하다.
- 장기 랫드 발암성 시험은 보통 2년간 수행되며, 3상 임상시험과 동시에 진행된다.
- 유전자 재조합 마우스 모델이 단기시험(약 6개월)을 위해 개발되었다. 이러한 모델에는 hRas와 같은 프로토 발암유전자를 발현하는 동물 또는 종양 억제 유전자 P53이 비활성화된 동물들을 포함한다.

아) 생식/발생 독성시험 : 약물이 생식에 영향을 미치는 방식은 다음의 주요 세 가지

- 수정(양성, 수정 및 착상) - Segment 1 연구에서 다루어 짐
- 배아 및 태아발달 또는 기형 - Segment 2 연구에서 다루어 짐
- 출산 전·후 발달 - Segment 3 연구에서 다루어 짐

자) 수정 및 착상에 대한 Segment 1 연구는 교미 이전에 수컷 (28일) 및 암컷 (14일) 모두에 투여되며, 정자의 수, 활동성, 착상 장소의 수, 임신 6일째 생사 배아의 수를 측정한다. 배아 및 태아 발달에 미치는 영향을 확인하기 위한 Segment 2 시험은 주로 2 내지 3종 (랫드, 마우스, 토끼)에 대해 실시되며 초기 임신기에 암컷동물에 약물이 투여된다. (랫드의 경우 교미 후 6 내지 16일 후) 동물들은 분만 직후 도살하여 배아의 수 및 형태 이상을 확인한다. 출산 전·후 발달과정에 대한 Segment 3 시험에서는 임신 및 수유기를 거쳐 암컷 동물에 약물을 투여한다. 출생자는 수유 및 이유기에 운동성, 반사반응 등에 대해 검사되고 몇몇 개체는 일정 간격으로 도살하여 구조적 이상을 관찰한다. 또한 몇몇 개체는 성장 후 교미를 시켜 후세대 영향 가능성을 평가한다. 성숙한 개체에 대해서 학습 및 기억능력을 대해서도 평가한다.

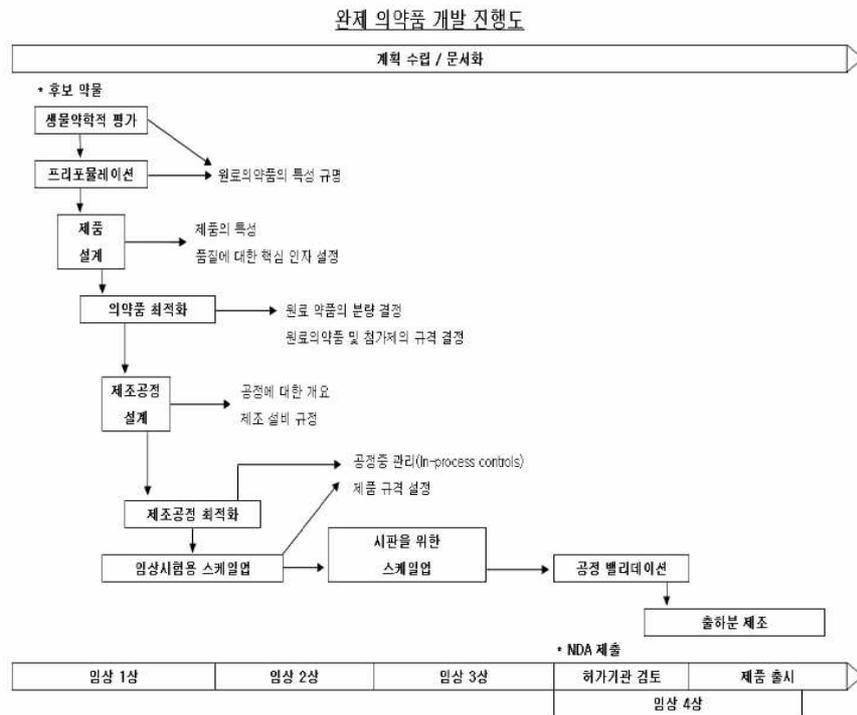
차) 향후 전망 : 전임상의 독성학 연구의 목적은 첫째로 임상시험 자원자들과 환자들에게 미치는 나쁜 영향을 최소화할 것과 둘째로 약이 시장으로 나갔을 때 적절한 효과와 함께 적은 부작용을 갖는 것이다. 최근 신약개발 경향은 첫 번째로는 규정의 요구는 점점 더 엄격해지고 복잡해진다는 것이다. 약으로부터의 효과만큼이나 약으로부터 일어날 수 있는 부작용이나 기대하지 못한 반응에 대해서 점점 더 강화된 기준으로 검토될 것이라는 점이다. 그런 이유로 두 번째의 경향은 제약 개발에 있어서 중간 실패를 막기 위해 여러 가지 고급기술과 새로운 방법들이 시도될 것이라는 점이다. 여러 가지 접근을 통해서 개발자들은 안전성에 대한 실패를 막을 수 있을 것으로 기대하고 실제로 성공한 사례가 있다. 즉, 약을 개발하는 데에 있어서 약의 효과만큼이나 부작용은 중요한 요소가 되어가고 있으며 이를 검토하는 것이 개발에 있어서 중요한 경향으로 보인다.

2) 의약품 개발

가) 의약품 개발은 선정된 후보 약물을 허가 및 시판을 위한 제품으로 변화시키는 과정이다. 현실적으로 의약품 개발을 위해서 고려되어야 할 여러 가지 사항은 다음과 같

다.

나) 후보 약물 선택 단계에서 전임상 연구를 도입하면 효율적으로 의약품 개발을 할 수 있다. 약물 선택은 주로 약물의 활성, 선택성, 작용시간 및 안전성/독성에 기초하여 이루어지게 되는데, 이러한 모든 특성들이 유사하다면, 후보 약물들의 제제학적 특성의 차이를 고려하여 약물을 선택할 수 있다. 보다 나은 제제학적 특성, 예를 들어, 수용성, 결정성, 조해성, 안정성 등에서 보다 우수한 약물을 선택한다면, 적합한 완제의약품 조성을 효율적으로 개발할 수 있다. 완제의약품 개발 계획을 효율적으로 설계하기 위해서는 안전성, 임상시험, 제제 개발, 제조 및 허가 범규에 대한 사항들을 개발 단계에서 고려한다. 제품개발 계획에서 각 담당부서에서의 관심사와 더불어 모든 부서가 동의할 수 있는 중심적이며 통합된 개발계획이 필요하다. 이러한 계획에는 수행 활동, 시간 계획, 책임 소재, 주요 사항, 재검토 및 의사결정 시점에 대한 자세한 내용이 포함되어야 한다. 재검토 및 의사 결정 시점은 각 진행 단계가 끝나는 시점에서 필요한 것으로, 진행사항이 개발 목적에 부합하는지의 여부와 다음 단계로 넘어가는 것이 타당한지 여부를 결정하기 위해 필요하다. 제품의 개발 과정은 제품 설계, 공정 설계, 제품 최적화, 공정 최적화, 스케일업 등 몇 개의 핵심적인 단계로 나누어 질 수 있다. 의약품 개발 과정을 간략하게 도식화한 아래의 그림에서 볼 수 있다.



우수의약품 개발 가이드라인 (2008), 식품의약품안전처

다) 제형은 약물로 체내로 전달하는데 중요한 역할을 한다. 약물 분자의 임상적 효능은 필요한 양을 적합한 속도로 적절한 부위에 적합한 시간에 전달함으로써 최적화되어야 한다. 임상적 유효성을 확보하기 위해서는 프리폼레이션의 초기단계부터 제제연구를 거쳐 의약품 허가를 위한 허가 문서에 이르기까지 생물약제학적 자료가 요구된다. 여기에서 제제의 생물약제학적 (biopharmaceutical) 기능과 상호 작용하는 생물학적 과정 (biological process)에 대한 이해는 필수적이다. 의약품개발과정에서 양질의

생물약제학적 자료는 완제 의약품의 임상적 효과와 내성에 대한 중요한 기능을 한다. 예를 들어, 장관에서 분해되면서 체내 흡수가 잘 되지 않는 약물의 경우, 생물약제학적 특성에 따라 유효한 신약이 되느냐와 가능성만 있는 약물로 개발이 중단되느냐가 결정될 수 있다. 가능성 있는 후보 약물들을 선택한 다음에는 효율적으로 제제화하는 과정이 필요하며, 이것이 바로 프리포물레이션이다. 프리포물레이션은 일반적으로 후보 약물에 대한 물리화학적 성질을 규명하는 연구로 정의된다. 또한 후보 약물을 제제화하기 위한 조건들을 밝히는데 수행되는 모든 연구 역시 프리포물레이션이라고 하며, 여러 조건하에서의 예비 연구 조성들을 포함한다. 이러한 연구의 일반적인 목적은 선택된 원료의약품의 물리화학적 변수, 반응속도, 물리적 성상 및 일반적으로 사용되는 첨가제들과 배합적합성을 평가하는 것이다. 이러한 연구들은 제품설계과정에 영향을 줄 수 있으며, 의약품개발의 초기 단계에 수행되어야 한다. 인체에 적용되는 제제가 치료목적에 따른 약효를 효과적으로 발휘하기 위해서는 안정성이 확보되어야만 한다. 이러한 목적을 달성하기 위해 여러 조작을 통하여 제제의 조성 및 제법을 계획하는 것을 제제설계라고 한다. 원료의약품의 물리화학적 성질 또는 약효발현을 위해서는 제제에 필요한 첨가제의 종류와 성질, 제법 등을 고려해야한다. 또한 동일 약물을 동량 함유하는 제제도 약물의 흡수, 대사, 분포, 배설 등의 종합적인 견지에서 볼 때 제제설계에 따라 전혀 다른 제품이 될 수도 있다. 또한 제제는 제제시험, 안정성시험, 용출시험 등에 적합해야 하며 비임상 또는 임상시험을 수행하기에 적합한 제제이어야 한다.

○ 의약품을 개발하는 초기 단계에서는 체내 투여되고 순환하기 위한 약물용해도, 세포막 투과를 위한 분배계수, 용매에서 녹는 속도인 분배계수, 약물의 결정형 또는 무정형, 입자크기를 고려하는 물리적 상태, 안전성을 확인하여야 한다.

- 약리학적 연구 (Pharmacology study)

① 약물 농도와 효과 사이의 상관관계, 작용기전, 인체에 미치는 영향 평가, 생물학적, 약물학적, 생리학적 상호작용 평가가 기초되어야 한다.

- 약동학적 연구 (Pharmacokinetic study)

① 약동학적 연구는 흡수, 분포, 대사, 배설 (ADME)을 평가하는 것으로 약리학적 관점과 독성학적 평가와 관련이 있음. 초기 연구에서는 단회 투여시 약동학적 지표, 용량 증가, 생체이용률, 다회 투여 시 약동학적 지표, 음식물 영향, 조직 분포, 뇌로의 흡수여부가 평가되어야 함

② 초기에는 흡수 기전 : 약물의 용해도, 투과도(permeability rate-limit)를 평가하여야 함.

라) 제형개발

- 임상적으로 사용되기 위해서 약은 제형화가 되어야 한다. 약을 개발한다는 것은 이런 물리적인 복용 형태를 개발하는 것에서부터 시장성을 고려하는 것까지를 포함한다. 이런 제형 연구를 위해서는 제제화 전연구가 필요하다. 제형연구에 있어서 가장 기본이 되는 제형은 경구 투여 제형이다.

○ 투여경로와 제형

- 치료제에 있어서 가장 선호되는 복용 형태는 경구형 정제 혹은 캡슐제이다. 또한 1

일 1회 혹은 2회 복용이 선호된다. 그러나 제형에는 여러 가지 종류가 있으며, 전신 노출 또는 국소 노출 필요성을 고려하여 제형을 결정해야 한다. 대부분의 경우 전신 노출이 요구되므로 경구형 정제 또는 캡슐제가 최종 제형으로 선호된다. 그렇더라도, 사람에서의 안전성 약리, 독성학, 약동학 평가를 위해 정맥투여 제형도 요구된다.

○ 제제화 전 연구

- 복용 형태를 결정하기 위한 사전 연구로서 약물의 여러 가지 물리학적 혹은 화학적 성질을 조사하는 일을 ‘제제화 전 연구 (preformulation studies)’라고 한다. 이러한 연구에는 농도와 순도를 확인하기 위한 적절한 분광학적 시험법의 개발, 물과 기타 용매에서의 모약물 및 염의 용해도 및 붕해도 확인, 모약물 및 염의 용액 및 고체상태에서의 화학적 안정성, 용해도 및 화학적 안정성의 pKa 및 pH 의존성 확인, 지질친화성 확인, 입자의 형태, 녹는점 및 제분적합성이 포함된다.

○ 용해도 및 붕해 속도

- 제제화에 있어서 용해도의 문제는 중요하다. 일반적으로 물에서 10 mg/mL 이상의 용해도를 갖는 약물은 제제화에 있어서 아무런 문제가 없다. 하지만 그 이하의 낮은 용해도를 갖는 경우에는 만족할만한 흡수와 용해도를 위해 염을 변경한다거나 비수용성 용매를 이용한다. 수용성 용매에 녹지 않는 화합물은 폴리소르베이트나 에탄올, PEG와 같은 용해제를 이용하여 용액으로 만들 수 있다. 제제화 전 연구에는 메칠셀룰로오스나 사이클로덱스트린과 같은 비교적 사람에게 부작용이 없다고 알려진 다양한 용해제에 대한 연구를 포함한다. 용해도뿐만 아니라 붕해속도는 경구용 제제의 흡수속도를 결정하는 중요한 요인이다. 붕해속도는 주로 용해도, 분자량, 입자의 크기 및 용질의 분산에 영향을 받는다.

○ 안정성

- 일반적인 사용 환경에서의 의약품은 5% 이내의 분해율 및 심각한 물리적 변화가 없는 상태로 최소 3년간의 유효기간을 갖는다. 제제화 전 시험에서 안정성 시험은 보통 1-4주간 실시된다. 고형 제제의 화학적 안정성은 4~75°C 범위의 온도에서 측정되며, 수분 흡수는 여러 가지 상대습도 환경 하에서 평가된다. 용액 중에서의 안정성 평가는 실온 또는 37°C에서 pH 범위 1-11에서, 필요시 용해제를 포함한 제형을 포함하여 시험한다. 자외선과 가시광선, 그리고 산소에 대한 노출에 대한 민감도 역시 평가된다.
- 이러한 조건에서의 단기간의 붕해 속도 시험은 정상 보관조건에서의 분해속도에 대한 예비 평가결과를 제공한다. 또한 낮은 pH에 대한 민감도는 위 내에서 분해될 수 있음을 의미하며 장에 도달할 때까지 화합물의 방출을 막기 위한 조치가 요구됨을 의미한다. 이러한 제제화 전 안정성 시험은 약물 연구가 앞으로 가능한지 혹은 불가능한지에 대해서 가늠케 하는 중요한 정보를 제공한다.

○ 제제화

- 1일 1회 경구투여에 적합한 이상적인 약물은 다음과 같은 특성을 가짐.
 - 물에 대한 용해성
 - 화학적 안정성 (낮은 pH에서의 안정성 포함)
 - 장 상피세포 투과성

- 작용부위에 대한 좋은 접근성
- 초회 대사에 대한 저항성
- 수 시간의 혈중 반감기
- 충분한 치료역

- 이러한 조건이 만족되는 경우에는 문제가 없지만 그렇지 않은 경우에는 단점을 보완하기 위한 제제학적 개발이 요구됨. 제형 개발은 의약품 성분의 특성뿐만 아니라 요구되는 전달 시스템 및 최종 제품의 형태도 고려해야 함

○ 약물 전달 시스템

- 최근 들어 약물 전달 시스템은 점점 더 복잡해지고 있다. 그 세 가지 이유는 다음과 같다. 첫 번째로 신약에서 생물의약품이 차지하는 비율이 증가하고 있기 때문이다. 생물의약품은 위에서 언급한 이상적인 특성에 부합하지 않기 때문에 제품화를 위해서는 특별한 제제화가 필요하다. 두 번째로 특별한 약물 전달 시스템을 이용하여 특정 질병 부위에 대한 선택적인 약물 작용이 강조되기 때문이다. 이는 특히 항암제와 관련 있다. 세 번째로는 점점 더 통제 가능한 약물 전달 시스템이 다양한 적용 목적으로 개발되기 때문이다.

- Electrophoresis와 인슐린 펌프가 그 예이다. 최근에는 새로운 약물 제제화 및 전달 시스템 중에서도 폴리머 기술의 이용이 많은 관심을 받고 있다.

- 제제 개발은 치료효과를 가진 성분을 하나의 상품으로 만들어 실제 사람에게 투여되었을 때 만족할 만한 효과를 나타내도록 하기 위한 모든 활동들로 구성된다. 제제화 전 연구는 만족할 만한 종류의 제형을 확인하기 위한 의약품 성분에 대한 일련의 화학적 조사들로 구성된다. 그리고 이 과정에서 생겨나는 많은 질문들과 문제들을 해결하기 위해서 다양한 연구가 필요하다.

- 제형화의 과정은 약물의 투여 경로에 크게 좌우된다. 정제나 캡슐제를 개발하고자 하는 대부분의 경우에 있어서 임상시험을 위한 정맥주사용 제제도 개발되고, 초기 유효성 평가를 위한 임상시험에 사용되는 제형은 최종 시판 제형과 다를 수 있다.

- 제형화에 있어서 아무런 문제가 없는 경우에도 제제화에는 상당한 시간과 비용이 소요된다. 최종 제제는 대규모 생산이 가능해야 하고 엄격한 품질관리 기준에 적합해야 하며 서로 다른 온도 및 습도 조건 하에서 심각한 변화 없이 보존될 수 있어야 하기 때문이다.

마) 완제의약품 제형 개발

- 의약품의 제형화 (formulation)는 약물의 용해도와 생체이용률 (bioavailability)를 높이고, 안정성을 향상시키며, 목적하는 조직으로 이행을 돕는데 그 목적이 있다. 제형을 개발할 때는 약물자체와 첨가제의 물리화학적 특성, 무균 여부, 치료효과, 독성에 대한 정보를 기초로, 약물학적, 약동학적인 면을 고려하여 안정성을 유지하도록 한다.

- 안정성에 영향을 주는 내적 및 외적 인자는 다음과 같다.

- 내적 인자 : 약물-약물 상호작용, 약물-첨가제 상호작용
- 외적 인자 : 용기와 포장 재질의 접촉

- 제형은 목적에 따라 분류할 때 다음과 같이 크게 나눌 수 있음.

- 제제 중 산소, 혹은 습기로부터 약물의 보호 : 코팅된 정제, 밀봉된 앰플

- 경구 투여 후 위액으로부터의 보호 : 장용성 제제
- 맛, 냄새 등의 차폐 : 캡슐, 코팅된 정제, 향미 시럽
- 불용성이거나 난용성인 약물은 적저란 첨가제를 이용하여 액상형태로 조제 : 현탁제
- 투명한 액상으로 제제화 : 시럽, 액제
- 다양하게 방출을 조절하여 시간에 따른 약리작용 조절 : 다양한 제어방출제제, 캡슐, 현탁제
- 국소 부위에 약효를 발휘할 수 있도록 외용제화 : 연고제, 크림제, 패취제, 점안제, 점이제, 비강제제
- 체강에 약물을 삽입 : 좌제, 질좌제
- 약물을 직접 혈관계로 주입 : 주사제
- 흡입하여 약효 발현 : 흡입제, 에어로솔제

바) 임상개발

- 임상 개발은 기술적 전문성과 함께 가치 판단, 그리고 상업적인 토대에서 이루어져야 한다. 임상 개발의 최고 목적은 신약이 빠르게 출시되어 약을 필요로 하는 환자들에게 빠르고 안전하게 사용되고, 그와 동시에 투자에 사용된 비용을 충분히 회수하는 것이다.
- 의약품 개발에는 막대한 비용이 소모되는데 그 중에서도 70-80% 가량의 비용은 임상시험을 수행하는 데에 소요된다. 임상시험의 실패 원인 중 30%는 효력을 입증하지 못한 경우이며, 25%는 안전성의 문제로 중지된다. 정부는 국민의 건강 및 관련 예산에 영향을 미치므로, 점차적으로 신약허가에 있어서 안전성 및 유효성뿐만 아니라 비용-효율성에도 영향을 받고 있다.
- 향후에는 유전자 분석을 통해 질병에 대해 동일한 유전적 특성을 지니는 환자의 그룹들을 확인하고 질병의 세부분류에 맞는 의약품을 처방하는 것이 가능할 것이다. 그러므로 향후 맞춤형 의약품이 환자에게는 바람직할 것이며 정부도 규제활동을 통해 이러한 개발방향으로 유도할 것이다.

○ 임상시험

- 임상시험은 새로운 치료물질의 생체이용률, 유효성, 안전성, 내약성 등을 평가하기 위해 사람에게 통제된 조건 하에서 투약하는 것이다.
 - 1상 임상 : 사람을 대상으로 최초 투여, 보통 건강한 자원자들에 대한 안전성 평가
 - 2상 임상 : 환자들을 대상으로 초기 탐색적, 용량설정 시험
 - 3상 임상 : 환자를 대상으로 대규모 시험
 - 4상 임상 : 환자를 대상으로 시판 후 안전성 모니터링
- 대부분의 국가에서 임상시험은 신약이 시판되거나 치료적 유용성 및 안전성을 주장하기 전에 반드시 수행되어야 한다. 1상 임상시험을 포함하여 임상시험은 국제적, 국가적 혹은 지역적인 규제에 맞게 수행된다. 새로운 물질에 대한 일련의 임상시험 가이드라인은 ICH (International Committee on harmonization)에 의해 발간되었다. ICH는 주요 의약품 개발지역인 유럽 연합과 미국 그리고 일본 간의 임상시험 규제조

화를 위해 설립되었다. 이들 지역에서 신약 승인을 받기 위한 임상시험을 실시하는 경우 개발 지역과 상관없이 ICH 가이드라인에 따라 실시해야 한다.

- 임상시험은 엄격한 윤리적 규범에 따라 수행되는데, 헬싱키 선언 (2000)이 모든 임상시험 규칙을 제시하고 있다. 헬싱키 선언은 한 문장으로 요약되는데 그 내용은 ‘의약품 개발 혹은 치료자는 인간의 존엄과 사생활, 건강과 삶을 지킬 의무를 지낸다.’이다. ICH에서는 모든 임상시험이 GMP와 GCP의 항목을 만족하는 조건에서 수행되는 것을 요구한다. 임상시험을 수행하는 데에 있어서 무엇보다 중요한 것은 강한 윤리적인 기초 위에 지역적, 국가적, 국제적 규정에 맞는 시험을 수행해야 한다는 점이다.

○ 1상 임상시험

- 임상 개발의 첫 번째 단계는 인체에 있어서 내약성과 생체이용률, 약동학과 안전성 등에 대한 사전 정보를 얻는 것이다. 1상 임상시험은 예기치 못한 독성이나 개체 간 특성 등을 고려해 일반적으로 건강한 피험자를 대상으로 수행된다. 1상 임상시험의 경우에는 치료 효과나 적절한 용량 등 구체적인 정보보다는 안전성이나 내약성 혹은 약동학 정보 등을 얻기 위함이므로 자원자들에게 치료적인 이익은 없다.

○ 환자의 선택

- 1상 임상시험의 대상은 건강한 자원자여야 한다. 임상시험에 있어서 ‘자원자’의 정의는 임상시험의 위험요소와 목적 그리고 필요성을 이해할 수 있고 자유 의지로 임상시험에 참여할 수 있는 능력을 가진 사람이다. 일반적으로 임상시험의 자원자는 젊은 남자가 많은데, 그 이유는 여성의 경우 생식독성이나 혹은 태어나지 않은 태아와 관련된 장기에 영향을 미칠 수 있기 때문이다.
- 특별한 1상 임상시험의 경우 일정한 특성을 지닌 자원자들을 모집할 수도 있다. 예를 들어, 고령 환자를 대상으로 개발될 약물의 경우에는 고령 환자를 대상으로 자원자를 모집한다거나 가벼운 천색 환자를 대상으로 만성 천색에 쓰는 제품의 임상시험을 수행하는 경우도 있다.

○ 임상시험의 규제

- 1상 임상시험에서 피험자의 안전성은 언제나 최우선적으로 고려되어야 한다. 임상시험 계획서를 평가하는 두 가지 주요 기관이 있다. 하나는 임상시험이 실시되는 국가의 의약품 규제당국이고 다른 하나는 임상시험이 수행되는 의료기관의 윤리위원회 (EC, Ethics Committee) 또는 IRB (Institutional Review Board)이다. 윤리위원회는 독립된 전문가들 및 비전문가들로 구성되며 제안된 임상시험을 검토하고 윤리적 측면에서의 정당성을 결정한다. 그들은 피험자에 대한 위험도, 피험자 및 시험자에게 제공되는 금전적인 보상의 적절성, 시험디자인 및 일차 목표 달성 가능성, 임상시험자의 자격, 경험 및 임상수행 능력, 피험자 모집을 위한 광고 문구 등을 평가한다.

○ 피험자의 모집

- 임상시험 계획서가 EC/IRB 및 규제당국의 승인을 받은 다음에는, 여러 가지 방법을 통해 피험자를 모집할 수 있다. 모집된 피험자에 대한 임상시험을 실시하기 전에 피험자는 반드시 동의서를 제출해야 한다. 이것은 문서로서 먼저 제공되며, 위험, 이익, 시험의 과정과 보수, 보험과 피험자의 권리 등이 문서 또는 구두로 설명되어야 한다. 피험자는 결정을 할 충분한 시간을 가져야 하고, 참가 압력을 받거나 다른 방식으로

영향을 받아서는 안 된다.

○ 적합성 기준

- 피험자 동의서에 서명을 한 이후, 피험자는 임상시험 진입 적합성 여부에 대해 스크리닝 될 수 있다. 스크리닝은 임상시험에 참여하는 모든 피험자가 건강함을 보증하기 위한 것이다. 시험자는 임상시험 계획서에 설정된 선정/제외 기준에 따라 스크리닝 결과를 평가한다.

○ 1상 임상시험 디자인

- 1상 임상시험은 단계적으로 볼 때 두 부분으로 나눌 수 있다. 하나는 1a상 시험 (단회 용량 시험)이고, 다른 하나는 1b상 시험 (반복투여 시험)이다.
- 1a상 시험은 사람에게 처음 약물을 투여하는 시험이다. 이 시험에서는 안전성 또는 내약성 문제가 발생할 때까지 각 군별로 이전 군에 투여한 용량보다 높은 용량을 투여하여 최대내성용량을 확인한다. 1a상 시험에서 투여될 용량의 설정은 가장 민감한 종에 대해 실시된 독성시험에서 이상반응이 나타나지 않는 가장 높은 용량 (NOAEL) 및 독성의 특성을 근거로 설정된다.
- 1a상 시험의 두 번째 목적은 약동학적 평가이다. 이를 위해 각 농도군 별로 정해진 간격에 따라 혈액을 채취하여 약물 농도를 측정한다. 일반적으로 1a상 시험에서 얻어지는 약동학 평가변수는 C_{max} , T_{max} , AUC, 반감기이며, 분포용적, 청소율, MRT가 추가로 측정될 수 있다.
- 1a상 시험에서 안전성 데이터 및 단회투여 약동학 프로파일에 대한 검토 결과에 따라 세 가지 내약성이 확립된 용량에 대해 반복투여시험 (1b상)이 설계된다. 1b상 시험의 목적은 약물을 반복적으로 투여했을 때의 안전성, 내약성 및 약동학 프로파일을 확인하는 것이다. 단회투여 약동학 특성은 항정상 상태 (steady state)에 이르는 시간을 포함하여 반복투여 약동학 프로파일을 예측하는데 사용되며 이를 통해 투여빈도 및 기간을 결정하게 된다.
- 1b상 시험에서는 약동학 평가뿐만 아니라 예상되는 약리학적 효과를 확인하기 위한 예비시험으로서 약력학적 평가도 이루어질 수 있다. 이러한 연구를 약동약력학적 (PK/PK) 연구라고 하는데, 이러한 연구는 투여용량과 효과 및 농도와 효과간의 관계를 밝히는 초기 수단이다. 1a와 1b상 시험 결과는 환자에게 약을 투여할 것인지, 투여한다면 어떠한 용법용량으로 어느 기간만큼 투여할 것인지에 대한 결정에 도움을 줄 수 있다.

○ 2상 임상시험 : 초기 효력 발견 및 환자에서 용량 발견의 시험 단계

- 건강인을 대상으로 PK/PD 및 용량-반응 데이터를 얻을 수 있다고 하더라도, 효력은 적절한 환자를 대상으로 평가되어야 하며, 2상 임상시험 역시 1상 시험과 동일한 윤리적 및 규제적 승인절차를 따라야 한다. 2상 임상시험은 다음과 같이 둘로 나뉜다.
- 2상 임상시험은 2a상과 2b상 시험으로 나뉜다. 2a상 시험은 효력과 안전성에 대한 사전 정보를 얻기 위해 소규모 환자를 대상으로 실시되는 탐색적인 시험이다. 2b상은 충분히 많은 환자군을 대상으로 통계학적으로 의미 있는 효력을 확인하고 적정 용법 • 용량을 결정하는 시험이다. 2a상에서 2b상으로의 진입은 의약품 개발 프로그램에 있어 특히 중요한 결정 단계이다. 이 결정 단계를 'proof of concept'라고 한다.

○ 2a상 임상시험

- 임상 2a상에서는 약력학/효력 평가뿐만 아니라 약동학적 분석도 이루어진다. 왜냐하면 많은 질병의 경우 환자에서의 약동학적 양상이 건강인과 다르게 나타나기 때문이다. 만일 1상 임상시험에서 의미 있는 약력학적 평가가 이루어지지 않았다면, 2a상 임상시험은 PK/PK 상관관계 및 용량-반응관계를 평가하는 첫 번째 기회가 될 것이다.
- 2a상 임상의 용법용량은 1상 임상시험에서 생성된 약동학적 양상 및 약물의 작용기전에 근거하여 설정된다. 2a상 임상시험 기간은 초기 개발프로그램에서 중요한데, 그 기간에 따라서 비임상 독성시험의 기간이 결정되기 때문이다.
- 신약의 경우 개발 전략은 보통 치료효과를 먼저 확인한 다음 약동학적 특성이나 수용체 특이성 등 기타 특성을 향상시키는 방식이므로 2a상 임상시험 시 최소한의 비용으로 최소한의 기간 동안 임상시험을 실하는 전략이 선호된다. 이 경우 대상 환자에 대한 효력평가에 시간이 오래 소요되는 경우, 관련된 다른 질환 환자를 대상으로 시험을 실시하거나, 경증환자 또는 정상인을 대상으로 생물학적 또는 임상적 대리변수를 이용하여 새로운 작용기전을 시험해 볼 수도 있다. 그러나 질병에 대한 관련 생체표지자 (biomarker)가 정상인에서 발견된다고 하더라도, 그러한 마커에 대한 효과와 임상적 효과 사이의 관련성은 종종 알려져 있지 않다. 따라서 환자를 대상으로 2a상 임상시험을 실시하는 것이 필요하다.
- 후발의약품을 개발하는 경우에는 기존의 원개발사 품목과 효력뿐만 아니라 안전성/내약성 및 약동학적 양상의 비교가 이루어지므로 1상 임상시험의 계획시, 원개발사 품목을 대조약으로 포함시키는 경우도 있으며, 2a상 임상시험의 경우도 신약을 개발하는 경우에 비해 시간과 비용이 많이 소요된다.
- 어떠한 전략으로 개발하든 간에, 2a상 임상시험의 목적은 의약품으로서의 기본 개념을 입증하고 그 기반에서 향후 개발 진행 여부를 정확히 결정하는데 있다.

○ 2b상 임상시험

- 2b상 임상시험은 1상 및 2a상 임상시험에서 생성된 초기 안전성 및 유효성 데이터를 확증하고, 대규모 3상 임상시험을 위한 최적 용량을 확인하기 위해 용량-반응관계를 자세히 탐색하는 시험이다. 2b상 임상시험으로부터 확실한 결과를 얻기 위해서는 시험 대상자로부터 얻은 결과를 더 큰 환자군으로의 외삽이 가능하도록 대상 환자수를 통계적으로 계산해야 한다.
- 일반적인 2b상 용량결정시험의 디자인은 평행군, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험이다. 위약대조군이 포함된 시험을 통해서 시험약의 절대적인 유효성과 안전성 평가가 가능하며 활성 대조약을 이용한 시험을 통해서 상대적인 평가가 가능하다.
- 모든 경우에 있어서 2b상 임상시험의 목적은 대부분의 환자를 대상으로 최대 효력과 만족할 ks한 내약성 및 적절한 안전성 범위를 고려한 최적의 용량을 선정하는 것이다. 이 단계에서 2b상 임상시험에 사용될 용량의 선정은 2b상 임상시험에서의 초기 유효성 평가 및 1상 및 2a상 임상시험에서 확인할 안전성 및 내약성 양상을 고려하여 선정된다.

○ 3상 임상

- 새로운 의약품이 시판 허가를 받기 위해서는 위약과 비교하여 절대적인 효력을 입증하거나 표준치료법이 있는 경우에는 그에 비해 정량적인 이익이 있음을 입증하는 것이 필요하다. 이러한 이익은 안전성, 내약성, 유효성, 환자 순응도, 및 비용효율성과 관련이 있다. 3상 임상시험은 이러한 요인들을 고려하여 새로운 의약품의 성능을 기존 치료제 또는 선택된 적응증에 대한 표준 치료법과 비교하기 위해 디자인된다. 3상 임상시험은 보통 여러 가지 시험으로 구성되며 보통 시판될 지역에서 실시된다. ICH 가이드라인에 적합하고, 인종간 차이가 고려된 경우 모든 3상시험이 한 지역에서 실시된 임상시험 자료를 다른 지역에 허가신청 자료로 제출할 수 있다. 인종간 차이는 내인적 (인종적) 또는 외인성 (식이, 의료행위) 인자에 의해 유발되며, 한 지역의 임상시험자료를 다른 지역의 허가신청 자료로 사용하는 경우 이러한 인종적 차이를 나타내는 요인들이 안전성 및 유효성에 미치는 효과가 고려되어야 한다.
- 3상 임상시험은 일반적으로 여러 각각에 걸쳐 시행되며 한정된 예산으로, 계획된 시간내에, 요구되는 수준에 맞도록 임상시험을 완료하기 위해서는 전문적인 프로젝트 관리가 필요하다.
- 3상 임상시험의 디자인은 다양하지만 일반적으로 무작위, 이중맹검, 표준 치료와의 비교시험으로 이루어진다.

○ 4상 임상시험 : 많은 수의 환자를 상대로 한 시판 후 조사

- 의약품 개발에는 상당한 시간과 비용이 소요되지만, 가장 고비용의 임상시험으로도 시판 전에 모든 이상반응을 확인할 수는 없다. 그렇다고 새로운 약의 치료효과를 무시하고 안전성 시험을 위해 수년간 시판을 막는 것도 환자들에게는 바람직하지 않다. 따라서 규제당국에서는 제약회사로 하여금 시판 후 일정 기간 동안 환자로부터 안전성 데이터를 수집하도록 하는 전략을 취하고 있다. 일반적으로 그러한 데이터 수집은 해당약물을 투여한 수천 명의 환자에 대한 시판 후 조사연구의 형태를 취한다.

○ 소아에 대한 임상

- 의약품은 성인뿐만 아니라 소아에게도 사용되므로, 규제당국은 성인으로부터 얻은 시험자료로부터 추정하는 것이 아닌 소아에 대한 시험의 필요성을 주창하고 있다. 소아에서의 약물의 약력학적, 약동학적 프로파일이 성인과는 다를 수 있다는 근거에 따른 이 주장은 점점 신뢰를 얻고 있다.

사) 원료의약품 및 완제의약품의 분석법 개발

- 기준이라 함은 설정된 시험방법에 따라 시험하였을 때 적합하다고 인정할 수 있는 한도, 범위를 말한다. 기준에 적합하다 함은 설정된 분석방법에 따라 시험하였을 때 원료의약품 또는 완제의약품이 설정된 기준을 충족시킨다는 말이다. 기준은 매우 중요한 품질의 표준으로서 회사에서는 기준을 설정하고 기준설정의 근거를 제시하여야 한다. 일반적으로 허가사항으로서의 기준 및 시험방법은 출하 전 시험으로서 적용하며, 그 외에 공정 중 시험 (in-process control), 출하승인규격 (release specification) 등 시험항목, 기준 및 시험방법을 회사 자체적으로 별도 설정하여 출하 전 시험보다 좀 더 엄격하게 관리하는 것이 바람직하다.
- 기준을 처음 설정할 때는 각각의 시험방법과 각 허용기준에 대하여 근거를 제시한다. 근거자료로서 관련 개발 중 현재까지 생산한 모든 배치 분석결과 (3배치 분석자

료 포함)와 가속/장기 안정성시험 결과, 약전기준, 독성시험 및 임상시험에 사용된 원료의약품 및 완제의약품의 시험데이터 등을 고려한다. 그 외에도 제조 및 분석상의 예상 편차 범위를 고려하여야 한다.

- 만약 여러 개의 제조소에서 생산하려고 계획할 경우에는 각 제조소에서 얻은 시험결과들에 근거하여 초기 기준 및 시험방법을 설정할 수 있다. 기준 및 시험방법을 설정할 때 하나의 대표 제조소로부터 얻은 데이터를 근거로 할 수 있으나 이때에도 나머지 제조소에서 생산된 제품들은 모두 설정된 기준에 적합하여야 한다. 함량과 불순물 한도에 대해서도 개발연구에서 얻은 데이터와 시판용 생산 배치로부터 얻은 원료의약품 및 완제의약품의 안정성 데이터들에 근거하여야 한다.

- 원료의약품 품질관리를 위한 시험방법

① 원료의약품에 공통적으로 설정하여야 하는 시험항목

원료의약품에 공통적으로 필요한 시험 항목은 성상, 확인, 정량, 불순물 (순도) 등이며, 각 시험항목에 대한 자세한 사항은 아래와 같다. 새로운 분석 기술이 지속적으로 개발되고, 기존의 기술도 계속 변형되고 있으므로, 이와 같은 기술은 타당성을 입증한 후 사용한다.

㉠ 성상

원료의약품의 상태 (고체, 액체 등), 색에 관한 정성적인 설명을 말하며, 보관 중 성상에 변화가 있다면 이를 조사하고 적절한 조치를 취하여야 한다.

㉡ 확인시험

확인시험은 유사구조를 가진 화합물들이 혼재할 수도 있는 상황에서 목적하는 성분만을 골라낼 수 있도록 특이적이어야 한다. 신약성분의 경우에는 크로마토그래프 상 하나의 유지시간만을 확인하는 것은 특이적이라고 볼 수 있으며, 두 가지의 크로마토그램을 이용하여 두 가지 서로 다른 원리의 시험을 하나의 시험방법으로 조합 (예-HPLC/UV diode array, HPLC/MS, GC/MS)하여 실시할 수 있다. 원료의약품이 염의 형태인 경우, 염 자체에 특이적인 시험방법이라면 이를 확인시험에 적용할 수 있다. 광학활성이 있는 경우 특이적인 확인시험 또는 키랄 분석이 필요할 수 있다.

㉢ 정량법

원료의약품의 함량을 측정할 수 있는 특이적, 안정성 지시방법 (stability-indicating procedure)을 선택한다. 많은 경우에 주성분의 함량 측정과 불순물 정량에 동일한 시험방법을 적용하기도 한다. 측정하고자 하는 성분에 비 특이적인 시험방법을 선택하고자 하는 경우 특이성을 확인할 수 있는 보조적인 시험방법이 추가적으로 사용되어야 한다. 예를 들어 적정법을 정량시험으로 설정하였을 때는 불순물 정량을 위한 한 개 이상의 정량법과 적절한 테스트를 함께 사용한다.

㉣ 불순물

불순물은 유기, 무기 불순물 및 잔류용매를 포함한다.

의약품 개발 중에 얻은 데이터를 기반으로 유의미한 불순물 한도를 외삽할 수 있다. 원료의약품의 제조, 정제 및 보관 동안 발생하는 실제적이고 잠재적인 불

순물을 모두 분석하여야 한다. 신약성분의 경우 불순물을 검출하기 위해 실시한 실험결과도 분석 정리하여야 하며, 이때 개발과정에서 제조된 배치와 판매용 배치의 실험결과, 그리고 보관 중에 발생할 가능성이 있는 불순물을 파악하기 위해 실시한 가혹시험 결과를 포함시킨다. 각 유연물질의 근원, 검출된 분석절차 및 유연물질의 기재 (Reporting), 화학구조의 제출 (Identification) 및 안전성 입증자료 제출 (Qualification) 여부를 파악하고 그 확인과정에 사용된 방법 등을 문서화한다. 판매용 원료의약품 배치의 불순물 프로파일을 개발단계의 것과 비교하여 차이가 있다며 그에 대한 설명을 추가한다. 유기불순물은 합성과정 중위 화학반응에 근거한 과학적 기반에서 정리하여야 하며, 무기불순물은 일반적으로 약전시험법 또는 기타 시험방법을 이용하여 검출, 정량하고, 허용기준은 약전 표준품 또는 알려진 안전성 데이터에 근거하여 설정할 수 있다.

② 추가적으로 설정하여야 하는 시험

공통적으로 설정하여야 하는 시험항목 외에도 원료의약품의 특성을 고려하여 물리 화학적 성질, 입자도, 다형성, 키랄성, 수분함량, 무기불순물, 미생물한도시험 등 추가적인 시험항목을 설정한다. 원료의약품의 품질에 영향을 줄 수 있는 시험항목들은 반드시 포함되어야 한다.

㉠ 물리화학적 성질

물리화학적 성질은 수용액의 pH, 용점, 굴절률 등을 포함한다.

㉡ 입자도

정제 또는 현탁액으로 제제화 할 원료의약품의 입자도는 용출률, 생체이용률 및 안전성에 큰 영향을 미칠 수 있으므로, 이러한 경우에는 입자도의 기준과 시험 방법을 설정한다.

㉢ 결정다형성

물리적 성질에 차이가 있는 다른 결정형[다형성은 용매화 (solvation) 또는 수화 (hydration)를 포함하기도 함]을 가진 원료의약품의 경우 품질이나 성능에 영향을 줄 수 있으며, 완제의약품의 성능, 생체이용률 또는 안정성에 영향을 주는 경우에는 적절한 고체상을 규정하여야 한다. 일반적으로 용점, 고체상 IR (solid state IR), X-선 파우더회절 (X-ray powder diffraction), 열분석법 (thermal analysis procedure), 고체상 NMR (solid state NMR) 등을 이용하여 개발한 원료의약품이 다형성을 가지고 있는지 여부를 확인한다.

㉣ 이성체시험

단일 광학 이성질체로 개발된 약효성분인 경우, 확인시험은 광학 이성질체와 라세미 혼합물을 모두 식별할 수 있어야 한다. 라세미산염 대신 광학 이성질체가 있을 가능성이 높은 경우 또는 결정화 과정으로 의도하지 않았던 비라세미 혼합물이 생산될 수 있을 때는 광학 특이적 확인시험을 출하/인수 승인 시험에 포함시키는 것이 바람직하다.

㉤ 수분함량

원료의약품이 흡습성이거나 수분에 의하여 분해되는 성질이 있거나, 화학당량 수화물인 경우 수분함량 측정을 반드시 고려하여야 한다. 허용기준은 수화 또는

흡습의 영향에 대한 데이터에 근거하여 타당성을 증명한다. 경우에 따라서는 건조감량 시험이 더 적합할 수도 있겠으나, 칼피셔 (Karl Fischer)법과 같이 수분 특이적인 방법이 권장된다.

㉞ 무기불순물

축매 등 무기불순물의 기준 및 시험방법을 포함시킬지 여부는 의약품의 개발단계에서 제조방법에 근거하여 판단하여야 한다. 회분/강열잔분의 기준 및 시험방법은 약전에 수재된 바에 따라야 하며, 기타 무기 불순물은 원자흡광광도법(AAS)등 적당한 시험방법을 적용한다.

㉟ 미생물한도시험

호기성 미생물의 총균수, 효모 및 곰팡이의 총 균수, 특정미생물 (예, 황색포도상구균, 대장균, 살모넬라, 슈도모나스 등) 부재 기준을 규정한다. 이들 미생물의 확인은 약전의 시험법에 따라서 하고, 허용기준은 원료의약품의 성질, 제조방법, 완제의약품의 농도 등에 근거하여 결정한다. 원료의약품을 무균 제조할 때는 무균시험이 적절하며, 주사제를 만들기 위한 원료의약품일 경우에는 엔도톡신시험이 더 타당하다.

- 시험방법 밸리데이션

시험방법 밸리데이션은 실제로 적용하기에 적합한지를 평가하는 일련의 과정이다. 밸리데이션을 시행하여 확립된 시험방법은 시험자가 시험조건을 재현하여 일관성 있는 결과를 확보할 수 있도록 상세하게 기술하고, 특히 시험과정에서 주의가 요구되는 부분을 설명한다. 다만, 공정서 수재 시험방법의 경우에는 시험과정을 상세하게 설명하지 않고 해당 시험방법을 인용할 수 있다. 일반적으로 모든 시험방법은 밸리데이션이 완료된 시험방법을 적용하여야 하며, 이는 공정 중 시험, 출하승인, 안정성시험에 적용되는 시험에 모두 해당된다.

- 표준품

정량, 확인 또는 순도시험에서 표준으로 사용하기 위해 만든 성분을 표준품(Reference standard)이라고 하며, 표준품을 용도에 적절한 품질을 구비하여야 한다. 일상적인 목적이외의 용도에 사용할 경우에는 추가적인 방법으로 목적용도에 적합한지 특성분석 및 평가를 실시한다. 정량시험용 신약성분의 표준품인 경우에는 불순물을 적절히 확인하고 관리하여야 하며, 순도를 정량적 방법으로 측정하여야 한다.

- 완제의약품 품질관리를 위한 시험방법

① 공통적으로 설정하여야 하는 시험방법

일반적으로 모든 완제의약품에는 다음의 시험과 기준 항목을 기본적으로 설정한다.

㉠ 성상

제품의 정성적 (예, 크기, 형태, 색상 등) 상태를 규정한다. 이런 특성이 제조 또는 보관 중에 변하는 경우, 이러한 변화를 조사하고 적절한 조치를 취한다.

㉡ 확인시험

확인시험은 완제의약품 중에 존재하는 약효성분을 확인하는 것이며, 존재 가능성이 높은 긴밀한 관계의 화합물들을 구분하여 확인할 수 있어야 한다. 확인시험은 IR법과 같이 약효 성분에 특이적이어야 한다.

㉔ 정량법

신약의 경우 함량을 결정하는 특이적인 안정성 지시 분석방법이 포함되어야 한다. 많은 경우에 약효 성분의 함량시험법과 불순물의 정량시험에 동일한 방법(예, HPLC)을 채택할 수도 있다. 함량균일성시험 방법이 정량시험용으로 적절하다면, 새로운 의약품의 함량균일성시험 결과를 의약품 함량 분석에 활용할 수 있다. 적정법으로 약효성분을 분석한다면, 함량시험과 적합한 불순물 시험을 함께 활용할 수 있다. 첨가물이 비특이적인 정량법을 간섭한다는 증거가 있다면 특이적인 방법을 채택하여야 한다.

㉕ 불순물

유기 및 무기 불순물과 잔류용매에 대한 내용이 포함되어야 한다. 약효성분의 분해에 의해 발생하는 유기 불순물과 의약품 제조공정 중에 발생하는 불순물을 모니터해야 한다. 개개의 지정 분해산물 별로 허용기준을 정해야하며, 확인 분해산물과 미확인 분해산물, 그리고 총 분해산물을 모두 포함한다. 주성분의 합성과정에서 나오는 공정 불순물은 보통 주성분 시험과정에서 관리하고, 총 불순물 기준에 포함시키지 않기도 하나, 합성불순물이 분해산물이기도 한 경우에는 그 수준을 모니터하고 총 분해산물에 포함시킨다.

- 확인시험, 정량시험, 순도시험 등에 적용할 수 있는 시험방법의 종류

① 액체 크로마토그래프법

적당한 고정상을 써서 컬럼에 검체 혼합물을 주입하고 이동상으로 액체를 써서 고정상에 대한 유지력의 차를 이용하여 각각의 성분으로 분리하여 분석하는 방법으로서, 뛰어난 분리효율성 및 재현성이 있는 분리분석법이며 그 어떤 용매에 용해되면 상온부근에서 신속, 예민한 정성·정량분석을 할 수 있다.

정성분석은 동일조건하에서 측정된 미지검체와 표준검체와의 유지값(유지시간, 유지용량, 상대유지시간)을 비교하여 분석하며, 고정상의 변경, 이동상의 종류를 변화시키는 등 분리조건을 바꾸어 하나의 피크가 하나의 성분이 되도록 하거나 다른 분석법과 병행할 수 있다.

② 기체 크로마토그래프법

적당한 고정상을 사용하여 만든 컬럼에 검체 혼합물을 주입하고 이동상으로 불활성기체(운반기체)를 써서 고정상에 대한 유지력의 차를 이용하여 각각의 성분으로 분리하여 분석하는 방법으로서, 그 조작이 간편, 신속하고, 분리능이 크며, 고감도와 높은 재현성을 가져 물질의 확인, 순도시험 또는 정량에 이용되고 물리적 특성의 측정에도 이용되나 자체만으로 정성분석으로는 좋은 방법은 아니다(피크유지시간만으로 특정물질임을 확인할 수 없음). 다만, 보통의 컬럼조작온도에서는 기화되지 않은 증기압이 아주 낮은 화합물에는 적용할 수 없으며, 검출기의 감도가 높아서 다량의 검체 정제에는 부적당하다.

③ 선광도 측정법

선광도측정법은 의약품 또는 그 용액 중에는 편광면을 회전시켜 특정한 회전각도(선광도)를 나타내는 데 이를 선광계로 측정하는 것이며 선광성은 물질의 화학구조와 관계가 있어서 입체화학적 순도를 측정하는 시험법이다. 선광도는 측정관의 층

장에 비례하고 용액의 농도, 온도 및 파장에 따라 달라진다.

④ 입자크기분석 관련 방법

원료입자의 크기 및 분산도는 aerosol, dispersion, suspension을 포함하는 미립자계에서 중요한 정보이며 입자의 생성 성장 및 응집을 평가하는 중요한 변수이므로 입자 크기 평가에 입자 형태, 표면, 응집 특성이 포함되어야 한다 (특히 합성공정에는 입자의 크기 및 분산도는 콜로이드의 점도에 많은 영향을 미침).

⑤ 자외가시부 흡광도 측정법

자외가시부 흡광도 측정법은 보통 파장 200~800nm의 빛이 물질에 의해 흡수되는 정도를 측정하여 물질의 확인시험, 순도시험, 정량 등을 할 수 있는 방법으로서, 확인시험, 시성값, 정량시험에 응용할 수 있다.

⑥ 적외부 스펙트럼 측정법

적외부 스펙트럼 측정법은 적외선이 검체를 통과할 때 흡수 또는 투과되는 정도를 각 파수에 대하여 측정하는 방법이며, 물질의 화학구조에 따라 흡수파수와 그 강도가 정해지므로 확인 또는 정량에 사용한다. 확인시험, 정량시험에 응용할 수 있다.

⑦ X-선 회절분석법

시료에 X-선을 조사하면 그 중 일부는 회절을 하는데 그 회절각과 강도는 물질구조상 고유한 것으로서 이 회절 X-선을 이용하여 시료에 함유된 결정성 물질의 종류와 양에 관계되는 정보를 제공한다.

- 완제 의약품의 규격

의약품 최적화 방법은 개발하고자 하는 제품의 특성에 달려 있다. 이것은 원료의약품의 다양한 공급처, 등급 및 사용량, 사용되는 물질 사이의 조합, 포장재의 크기 또는 포장재의 종류 등에 따른 여러 범위의 선택사항들에 대한 연구를 포함한다. 또한 추가적으로 후보 약물이나 첨가제의 입자 크기 분포 시험 등이 포함될 수 있는데 입자 크기는 약물 전달이나 제제 공정에 중요한 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

최적화의 초기 단계 제제연구에서는 첨가제 또는 포장재를 선택하게 되는데 가속시험이나 가속시험을 통하여 후보 약물과 배합 적합한 성분들을 선정하여야 한다. 최적화의 마지막 단계에서는 일반적으로 최적의 조성을 선정하기 위해 여러 조성들의 충분한 안정성 자료를 검토하여야 한다. 최적의 제품은 기술적 이점에 근거하여 선정된다. 의약품의 최적화 단계에서 사용되는 제조공정은 대량 생산을 고려하여 설계되어야 한다. 이상적으로 제조 공정은 제조공정이 제품의 작용 특성 및 임상시험 결과에 영향을 줄 수 있기 때문에 최종적인 시판 생산 규격의 제조를 최대한 반영할 수 있어야 한다. 완제의약품 개발 진행도에서는 의약품 및 제조공정의 설계 및 최적화가 각각 분리된 것으로 나타나있지만, 실제로 이 단계들은 종종 결합되어 있거나 밀접히 연관되어 있다.

의약품을 제형화하기 위하여 구성 성분과 제조공정을 선택할 때는 그 약물의 물리화학적 및 생화학적 성질을 충분히 고려하여야 한다. 의약품 개발은 원료의약품과 첨가제의 물리화학적 성질 및 제조공정을 조작하여 최종제품에서 목표로 하는 품질을 확보하는 것이다.

최신 기술을 이용하여 단시간 내에 대량 생산 하는 것은 효율적이며 경제적인 생산

을 위한 필수요소이다. 이러한 스케일업 단계에서는 보다 크고 빠른 속도의 장비를 사용하게 되며 이 때 작은 규모의 장비를 사용하여 설정된 공정 변수에 대한 조율이 필요할 수 있다. 또한 공정 중 반제품이나 완제품은 설정된 제품 규격에 적합하여야 하며, 스케일업 이전 배치와 스케일업 배치는 물리적으로나 화학적으로 동등하여야 한다.

스케일업 단계의 최초 과정은 배치 크기를 결정하는 것이다. 이 경우, 제조 가능한 최대의 배치크기보다는 최적의 배치크기를 결정하는 것이 중요하며, 작은 배치 크기의 제조에 사용된 제조 공정과 조작 변수들을 스케일업 계획에 고려해야 한다. 공정 개발에 이용된 기술 및 장비로 인해 스케일업 작업이 일부 제한될 수 있다.

공정밸리데이션이란 어느 특정한 공정이 미리 설정되어 규격 및 품질 특성에 적합한 결과가 일관되게 얻어진다는 것을 검증하고 이를 문서화하는 것을 말한다. 공정밸리데이션을 통하여 완제의약품의 의도된 특성을 확보하기 위해서는 제조 공정 중 품질 관리과정에서 나타날 수 있는 유연성을 가지는 사항과 제한사항들을 설정하여 의도되지 않은 특성이 나타나는 것을 방지한다. 공정밸리데이션은 의약품 제조공정에서의 핵심적인 변수들을 통하여 품질이 확보된 제품을 일관되게 생산하기 위한 체계적인 작업 및 실행한 내용에 대한 문서화를 포함한다. 비록 공정밸리데이션이 의약품 개발의 마지막 단계이지만 몇몇 밸리데이션 개념들은 실험실 규모의 개발, 스케일업 단계 및 공정 최적화 단계에도 포함되어 있다.

제조공정이 복잡할수록 일부 장비들, 공정 및 제품에 대한 변수들은 최종 생산 배치에 비해 작은 규모에서 최적화된다. 일단 제품의 조성과 제조공정을 작은 규모에서 최적화된 다음, 보다 큰 규모에서 공정단계를 최적화한다. 이 단계에서 완제의약품이 설정된 규격의 범위에 적합한지 시험하여 필요한 경우에는 제조공정을 변경하기도 한다. 의약품 제조공정의 단계에 따라 몇몇 핵심적인 공정 변수들을 다양화하여 제품의 특성을 측정하고 철저하게 평가한다.

스케일업이나 공정밸리데이션은 의약품개발 후반부에 수행되지만, 이러한 단계들은 초기단계에서 결정된 의약품의 조성과 제조공정에 크게 영향을 받는다. 개발의 초기 단계에서 선택된 기술과 임상시험용 배치를 제조하는데 사용된 제조방법은 제품수명(life cycle)이 다할 때까지 유지된다.

따라서 초기 단계에서의 개발 연구자들은 제조공정과 장비를 선정하는데 있어서 향후 제품에 요구되는 사항들을 검토해야 한다. 제조 공정을 검토하는데 있어서 원료의약품 및 첨가제의 물리화학적 특성은 사용하는 장비의 용량 및 한계와 함께 고려되어야 한다. 모든 장비들은 임상시험용 배치를 생산하기 이전에 설치적격성, 운전적격성 및 성능적격성이 평가되어야 하며 밸리데이션된 세척방법에 따라 세척되고 시험되어야 한다. 임상시험용 배치로부터 얻은 모든 서류와 시험 결과들은 추가적인 스케일업을 실시하기 이전에 반드시 재검토 되어야 한다.

의약품 개발의 목적은 제품의 품질을 설계하고 이와 같은 제품의 성능을 일관되게 제공할 수 있는 제조 공정을 설계하는데 있다. 의약품 개발을 위한 연구 과정과 제조 경험에서 얻어진 지식과 정보는 제품 규격, 제조 관리 방법 등의 확립을 뒷받침하는 과학적인 설명을 제공한다. 선진국의 경우 ICH Q8에서 규정한 디자인 스페이스

(Design space)를 적용하여 의약품 개발하는 경우도 있다.

의약품 개발 부분에서는 선정된 제형과 조성이 사용 목적에 부합하다는 것이 기술되어야 한다. 이 부분은 각 항목에 의약품 및 제조 공정의 개발 과정을 설명할 수 있는 충분한 정보를 제공해야 한다. 최소한 원료의약품, 첨가제, 용기 및 포장, 그리고 제조공정에 대하여 제품의 품질에 영향을 미치는 핵심적인 사항을 결정하고 관리 방법을 제시해야 한다. 일반적으로, 주요한 조성의 특성 및 공정 변수가 있는 경우, 이들의 변동이 의약품 품질에 어느 정도의 영향을 주는지 평가되어야 한다.

아) 천연물의약품 개발에 필요한 원료기준 설정 및 연구 방법

○ 천연물의약품 원료의 기준 설정 및 시험방법

- 원료 한약 (생약)의 경우 기원 (원식물명과 약용부위 기재) 및 성상(냄새, 맛, 형태 등)은 최소한 요구사항이며, 회분, 산불용성회분, 건조감량 등은 일반적으로 쉽게 검토할 수 있는 사항이므로 기재하여야 한다. 지표성분이 밝혀진 한약 (생약)의 경우에는 확인 및 함량시험을 설정할 뿐만 아니라, 엑스함량, 정유함량 등을 추가로 설정하여 고품질의 원료를 확보하여야 한다.
- 또한 자연에서 재배, 채취, 건조, 가공 등의 과정에 사용되는 농약 등의 잔류물질과 자연발생적인 오염물질에 대하여 그 한계를 설정하여야 한다.
- 한약 (생약)제제의 경우, 원료 한약 (생약)과 비슷하게 설정하되 미생물한도시험이 추가로 설정되며, 제형의 특성을 감안하여 정제의 경우 용출 또는 붕해시험, 고립제의 경우 입도시험 등을 설정하고, 그 외에도 보존제시험, 무균시험 등을 추가 설정하여야 한다.
- 식약처에서 제시하고 있는 일반적인 한약 (생약) 및 한약 (생약)제제의 기준 및 시험방법 설정은 다음과 같다.

[성상]

적부판정의 기준이 되며, 색, 냄새, 형상 등을 기재한다.

[확인시험]

생리활성이 강하고, 정량이 가능한 성분에 대하여 검토한다. 지표성분에 대해서는 기준을 설정하며, 지표성분 이외의 것이라도 정량이 가능한 것은 설정한다. 지표성분은 반드시 유효성분을 의미하는 것은 아니지만, 제제의 추출용매, 추출방법 등에 따라 성분의 양이 달라지므로, 그 양이 일정하게 유지되어야 약효가 보증될 수 있다.

[엑스함량]

일반적으로 엑스함량은 고가생약의 경우 추출이 끝난 것이 혼입될 수 있고, 절단생약의 경우 절단 시 장시간 물에 담글 우려가 있는 것이 있는데, 이 두 가지의 경우 정상품에 비해 엑스함량은 당연히 낮아지게 된다. 이와 같은 사항을 고려하여 품질확보에 엑스함량 규정이 필요한 항목으로 설정되고 있다.

물엑스함량은 추출액의 여과 및 증발에 시간이 많이 걸리기 때문에 특정한 품목에만 설정하고, 대부분의 경우 묽은 에탄올 엑스함량을 설정하고 있다. 물, 에탄올, 초산에틸 등의 용매를 사용하여 엑스함량을 검토하여 적당한 것을 설정하는 것이 일반적이다. 주로 원료 한약 (생약)에 설정되며, 제제에서는 확인시험을 설정할 수 없는 주성분이 하나라도 있을 경우 설정한다.

[회분 • 산불용성회분]

이 시험은 확인, 함량시험 등을 설정할 수 없는 제제에 대해서는 중요한 평가 지표로 약전 일반시험법 생약시험법에 따라 시험할 때 적합해야 한다.

회분은 같은 생약에 있어서도 원 식물의 생육시 환경, 예를 들면 산지, 야생품과 재배품 또는 채취시기 등에 따라 일정하지 않은 것이 많다. 일반적으로 전초생약은 잎이 많은 양질의 것일수록 회분이 많은 예도 있다.

산불용성회분은 엽류, 전초류, 종자류 한약 (생약) 등에 본질적으로 많이 함유되는 물질 (조직중의 규산염)과 토사 등으로 유래되는 것을 고려할 수 있다.

[건조감량]

생약은 통상 바람에 의해 건조한 건조품을 사용하지만, 보관상 공기에 의한 습도에 따라 변동할 수 있다. 따라서 흡습성이 강한 한약 (생약)은 품질확보를 위해 건조감량이 필요하고, 절단생약의 경우 물로 축이면서 절단하는 경우가 있어 건조감량이 필요하다. 일반적으로 엑스산제, 과립제 등에 설정하는 것이 바람직하다.

[잔류오염물질]

한약 (생약)은 자연에서 재배 또는 야생품을 채취하여 건조하는 동안 농약, 이산화황, 중금속 등으로 오염되는 경우가 있고, 또한 건조 후 보관하는 동안 곰팡이의 오염 등이 있을 수 있기 때문에 잔류오염물질의 기준 및 시험방법을 정함으로서 한약 (생약) 등의 품질관리에 적정을 기하여야 한다.

이외에도 제제의 특성상 액제의 경우는 미생물한도시험, 보존제시험 등을 설정하고, 산제 또는 과립제의 경우는 입도시험, 봉해시험 등을 설정하고, 효소제, 단백질 • 장기추출 (가수분해)물 제제 등은 필요한 경우 안전성시험, 항원성시험, 히스타민 시험 등을 설정하여, 제형에 따른 기준 및 시험방법을 설정하여 제제의 특성에 고려하여 품질을 확보할 수 있도록 하여야 한다.

또한, 최종제품이 동물유래 성분을 함유하거나 제조과정 중 동물유래 성분을 사용하는 경우에는 기원동물 및 사용부위를 기재하여야 하며, 동물유래 성분의 경우 바이러스 감염 및 제조과정 중 바이러스 활성화, 반추동물유래성분의 경우는 전염성해면상뇌증 (TSE)을 방지하기 위한 원료선택 및 처리방법을 기재하여 관리하여야 한다.

○ 천연물의약품 제제의 성분 프로파일 설정

① 성분프로파일의 관리

천연물로부터 개발된 의약품은 매우 다양한 화합물들을 포함하고 있으며 일반적으로 각 구성성분 전체에 대한 화학적 구조 및 성질을 완전히 규명하는 것은 매우 어려운 것으로 받아들여지고 있다. 또한, 구성성분 중 주요 약효성분이 밝혀지고 그 성분과 약효간의 상관관계가 어느 정도 나타나는 경우도 있지만 일반적으로 성분과 약효의 상관관계를 명확히 밝힐 수 없는 경우가 일반적이다. 따라서 천연물로부터 개발된 생약 • 한약제제의 품질과 약효는 합성의약품과는 다른 차원에서 고려되어야 한다.

생약 • 한약제제의 성분프로파일은 이들의 화학적 특징에 대한 윤관 또는 개요라고 할 수 있다. 보다 자세하게는 생약 • 한약제제의 원료의약품 및 완제의약품을 HPLC 등으로 분석하였을 때 얻어지는 분석 결과물로부터 분석시료의 화학적 특징과 연관성이 큰 부분을 추출하여 정리한 데이터를 뜻한다.

특히 적합한 규격을 가진 표준시료들의 성분프로파일로부터 얻어진, 표준시료에 대한 화학적 특징에 대한 대표성을 갖는 성분프로파일을 표준 성분프로파일이라고 하며 이는 비교하고자 하는 시료의 확인, 조성 또는 로트간 일관성을 평가하는 기준으로 활용될 수 있다.

성분프로파일이 품질관리 기준으로 사용되기 위해서는 우선 개발과정 중의 여러 요소를 종합하여 제품의 특징을 가장 잘 반영하는 표준 성분프로파일을 설정하여야 한다. 확립된 표준 성분프로파일은 실생산 로트의 품질확보의 기준이 된다. 즉, 사용되는 생약의 화학적 분포와 특징, 안전성·유효성에 관련된 화학적 정보 및 제조공정 조절 등에 근거하여 목표로 하는 기준범위를 설정하는 것이다. 실 생산 로트의 성분프로파일은 허용된 범위 내에서 표준 성분프로파일과의 유사성을 확보하여야 한다. 이렇게 함으로써 생약·한약제제의 매 로트의 성분프로파일을 일정 기준범위 내로 관리함으로써 약효와 품질의 로트간 균질성을 보장할 수 있다.

위에서 설명한 성분프로파일은 생약·한약제제의 원료의약품(생약), 생약추출물 및 완제의약품에 적용할 수 있다. 특히 화학적 조성성분이 명확하게 규명되지 않았거나, 활성성분이 규명되지 않은 경우 또는 활성성분들이 어느 정도 규명되어 있다 하더라도 활성의 기여도를 설명할 수 없는 경우에 유용하게 사용될 수 있다.

그러나 제제의 구성성분 중 활성 또는 독성물질이 명확하게 규명된 경우에는 성분프로파일을 설정하는 것보다는 이들 물질 각각에 대해 시험방법 및 기준을 설정하는 것이 바람직할 수 있다.

또한 활성 및 독성관계가 명확히 규명되지 않은 경우에도 충분한 수의 지표성분에 대하여 함량 기준을 설정하여 관리하고 있다면 따로 성분프로파일을 설정하지 않을 수 있다. 일반적으로 단일제에 대하여 3개 이상의 지표성분이 설정, 관리된다면 성분프로파일 관리와 동등한 수준으로 관리된다고 볼 수 있을 것이다.

② 표준 성분프로파일 확립

표준 성분프로파일은 프로파일을 이용한 품질 관련 평가의 기준이 된다. 따라서 표준 성분프로파일은 설정하는 품목의 약효와 관련된 화학적 특성을 최대한 반영할 수 있어야 한다. 또한, 생약·한약제제의 경우 다양한 원인에 의해 성분프로파일이 영향을 받을 수 있으므로 이러한 특징이 고려되어야 한다. 예를 들면, 적합한 규격의 생약을 사용할 경우에도 채집시기나 재배지 등에 따라 구성 성분의 배합이 크게 바뀔 수 있으며 생약추출물 제조를 위한 공정조건의 차이에 의해서 동일한 공정을 적용한 경우에도 그 조건이나 로트 별로 변동이 발생할 수 있다. 따라서 허용 가능한 범위에서 원료 또는 공정상 발생할 수 있는 변동을 포함할 수 있는 표준 성분프로파일을 확보하기 위해서는 다양한 시료를 사용하는 것이 바람직하다. 한편 낮은 품질의 생약이나 대체생약이 사용될 가능성이 있는 경우에는 이들을 구분할 수 있는 수준의 표준 성분프로파일을 확보하여야 한다.

분석법은 일반적으로 HPLC 등을 이용하여 크로마토그램을 얻는 것을 원칙으로 한다. 가장 일반적으로 HPLC-UV/DAD를 사용할 수 있으며 분석 대상의 특징에 따라 UV에 잘 검출되지 않는 경우에는 ELSD 및 CAD와 같은 다양한 검출기를 적용할 수 있다. 또한 정유 같은 낮은 극성의 휘발성 성분을 다량 함유하고 있는 시료를 GC를 사용

할 수도 있다.

분석조건은 대상 시료의 화학적 특성을 가장 잘 반영할 수 있는 크로마토그램을 얻을 수 있도록 최적화되어야 한다. 문헌자료 등을 통해 분석 대상 시료에 대한 구성성분 및 분석조건에 대한 정보를 확보할 수 있을 경우, 이들 정보보다 특정 성분군에 대한 선택적 분석법이 아닌지 검토해야 한다. 만약 특정 성분군의 분석만을 위해 개발된 방법일 경우에는 다른 분석법 개발을 시도하여 특정성분군 외에 다른 성분들에 대한 정보도 포함할 수 있는 분석법을 개발해야 한다.

성분프로파일 확보에 적용되는 분석법의 적절성에 따라 성분프로파일의 정확성 및 확보할 수 있는 정보의 수준을 결정하므로 다양한 분석용 시료 전처리 방법, 이동상 및 고정상, 검출기 등을 적용하여 가장 많은 성분에 대한 정보를 제공하는 분석법을 도출하도록 한다. 가급적 크로마토그램상에서 전체 피크면적 합이 1% 이상의 면적을 가진 피크들이 10개 이상 관찰되는 수준으로 분석조건을 최적화하도록 노력해야 한다.

분석법의 타당성을 평가하기 위해 밸리데이션을 실시한다. 밸리데이션은 최소한 특이성과 정밀성, 지표로서는 반복성 및 실험실내 정밀성을 확보하도록 한다. 성분프로파일 분석을 위한 특이성은 크로마토그램 상 각 피크의 특징(이 특이적으로 확보되는 것을 확인하는 정도로 가능하다.

각 표준시료로부터 얻어진 크로마토그램으로부터 해당 제제의 특징을 가장 잘 반영할 수 있는 다수의 피크를 설정하여 성분프로파일을 만든다. 해당 의약품의 약효 및 독성과 관련하여 알려진 정보가 부족할 경우 일반적으로 일정 수준 이상의 피크를 선정하는 방법이 권장된다.

각각의 표준시료들로부터 성분프로파일을 확보하고 그 피크유지시간의 평균값 또는 중간값을 구함으로써 표준 성분프로파일에 대한 수치값을 확보한다. 표준 성분 프로파일을 포함한 크로마토그램을 확보하는 것은 현실적으로 어려우므로 표준시료들의 크로마토그램을 중첩하여 표시한다.

표준 성분프로파일은 각각 다른 경로로 얻어진 생약을 사용한 3로트 이상의 표준시료에 대해서 시험한 후 얻어지는 분석 결과를 확보한다. 적합한 규격의 생약을 사용했음에도 채집시기나 재배지 등의 차이에 의해 발생할 수 있는 변동 사항이나 제조 과정 중에 발생할 수 있는 허용 가능한 변동 사항을 반영하기 위해서 다양한 시료로부터 성분프로파일을 확보하도록 한다. 다양한 시료를 사용할수록 보다 정확한 대표성을 가질 수 있는 표준 성분프로파일을 얻을 수 있다.

성분프로파일은 의약품의 구성 생약과 관련된 화학적 특징과 안전성·유효성에 관한 정보를 최대한 종합적으로 반영할 수 있도록 설정되어야 한다. 따라서, 성분프로파일을 얻기 위하여 사용한 크로마토그램과 분석조건과 아울러 성분프로파일을 구성하는 특정 피크의 선택에 대해서도 근거와 타당성을 확보하여야 한다.

또한, 필요한 경우 얻어진 표준 성분프로파일의 대표성에 대한 검증은 실시한다. 평균값과 중간값으로 구한 표준 성분프로파일 간에 큰 차이가 있는 경우 그 원인을 확인한다. 또한, 표준 성분프로파일에서 나타난 피크들 간의 비율이 표준시료에서 얻은 성분프로파일의 피크들의 비율과 유사한지 등을 확인할 필요가 있다. 경우에 따라 해당 성분들이 포함된 저품질 시료 또는 자주 발생하는 불순물이나 대체 서분이 포함된 시료

등의 성분 프로파일과 비교하여 구별 가능한지 판단할 필요도 있다.

③ 기준

표준 성분프로파일은 성분프로파일의 적합성 판정의 기준이 된다. 이는 표준 성분프로파일과 동일한 분석조건에서 평가대상이 되는 시료들로부터 표준 성분프로파일을 얻은 것과 동일한 분석조건에서 시험하여 성분프로파일을 확보하고 이를 표준 성분프로파일과 얼마나 화학적으로 유사한지 비교함으로써 이루어질 수 있다. 표준 성분프로파일과 평가시료의 성분프로파일 간의 화학적유사도의 지표로는 두 성분프로파일의 동등상관계수가 사용된다.

동등상관계수는 표준 성분프로파일 중의 각 피크의 피크면적과 분석시료의 성분프로파일 중에 대응하는 각각의 피크의 피크면적의 상관관계를 나타내는 것이다.

성분프로파일의 적합성 평가는 표준 성분프로파일과 평가시료의 성분프로파일 간의 동등상관계수가 설정된 기준치 이상으로 확보되는지 판단함으로써 이루어진다.

원료의약품으로 사용되는 생약추출물의 경우 동등상관계수 최소 0.900 이상을 확보하는 것을 권장한다. 완제의약품의 경우 제형에 따른 제조공정조건의 변이와 안정성 등을 고려하여 적절하게 설정할 수 있다.

성분프로파일은 생약추출물 및 완제의약품의 약효와 품질의 균질성을 보증하는 방법의 일부로 설정·관리되어야 한다. 단순히 품질적합성 확보를 용이하게 하기 위해 동등상관계수의 기준치 또는 피크면적의 변동 허용 범위를 낮추어서는 안 되면 허용 가능한 변동 요인을 고려하여 기준을 설정해야 한다.

자) 생약(한약)제제의 허가 신고 심사

관련 용어

- 천연물 : 육상 및 해양에 생존하는 동·식물 등의 생물과 생물의 세포 또는 조직 배양산물 등 생물을 기원하는 산물
- 천연물 성분을 이용하여 연구·개발한 의약품 중 조성성분·효능 등이 새로운 의약품
- 동·식물의 약용으로 하는 부분, 세포내용물, 분비물, 추출물 또는 광물
- 한약 : 동·식물 또는 광물에서 채취된 것으로 주로 원형대로 건조·절단 또는 정제된 생약
- 생약제제 : 서양의학적 입장에서 본 천연물제제로 한의학적 치료목적으로는 사용되지 않는 제제, 천연물을 기원으로 하되 특정 성분을 추출·정제하여 제제화한 것은 생약제제로 간주하지 아니함
- 한약제제 : 한약을 한방원리에 따라 배합하여 제조한 의약품

자. 담팔수 추출물 제조 공정 및 제제/제형 개발

1) 담팔수 추출물 제조 공정

가) 담팔수 분말을 육안 검사하여 곰팡이 등 이물질 검사 및 냄새 확인.

나) 추출기에 50 % 에탄올 1000 L를 넣음

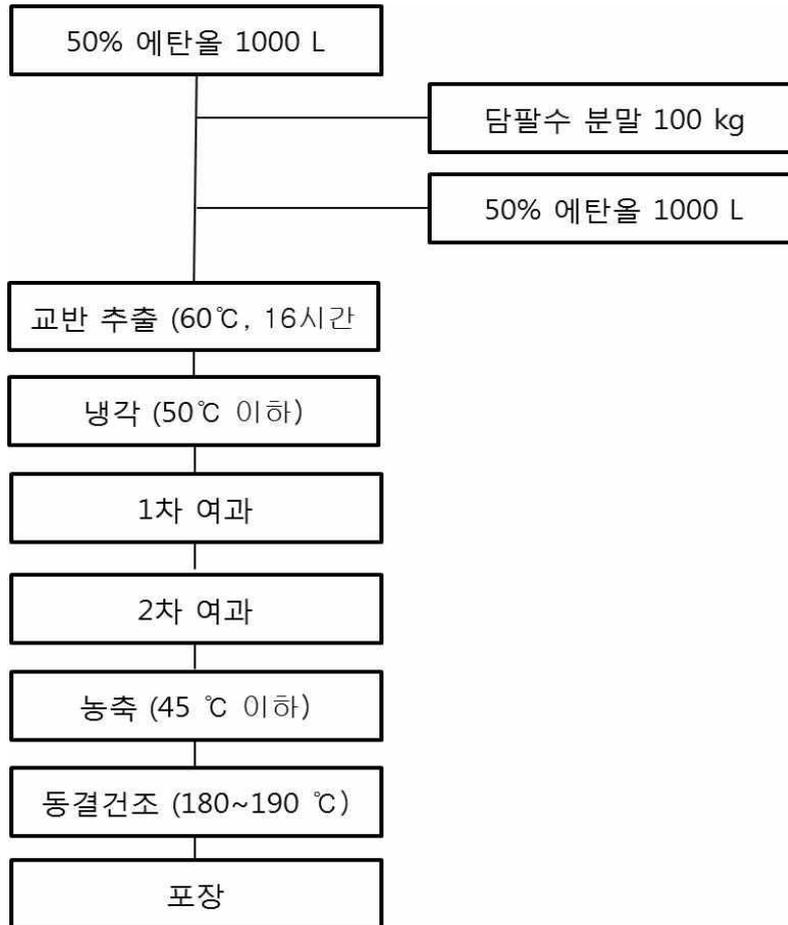
다) 나)에 담팔수 분말을 100 kg을 투입

라) 다)에 50 % 에탄올 1000 L 추가로 투입

마) 온도를 60℃로 가온하며, 교반기를 가동하여 교반 추출하며, 온도 상승 후 16 시간

추출

- 바) 16시간 후 추출액을 50℃ 이하로 냉각
- 사) 추출액을 0.5 μm로 1차 여과를 거쳐 2차 여과를 실시
- 아) 여과액을 45℃ 이하로 온도를 유지하면서 농축
- 자) 농축액을 동결 건조기로 180~190℃로 건조



담팔수 추출물 제조 공정도

담팔수 추출물 수율

생산량	포장량	Loss	추출 수율	제품 수율
28.1 kg	28.0 kg	0.1 kg	28.1 %	28.0 %

$$\text{추출 수율(\%)} = \frac{\text{생산량(kg)}}{\text{사용 원료량(kg)}} \times 100$$

$$\text{제품 수율(\%)} = \frac{\text{포장량(kg)}}{\text{사용 원료량(kg)}} \times 100$$

추출 설비

추출기



여과기 1



동결건조기



농축기



여과기 2

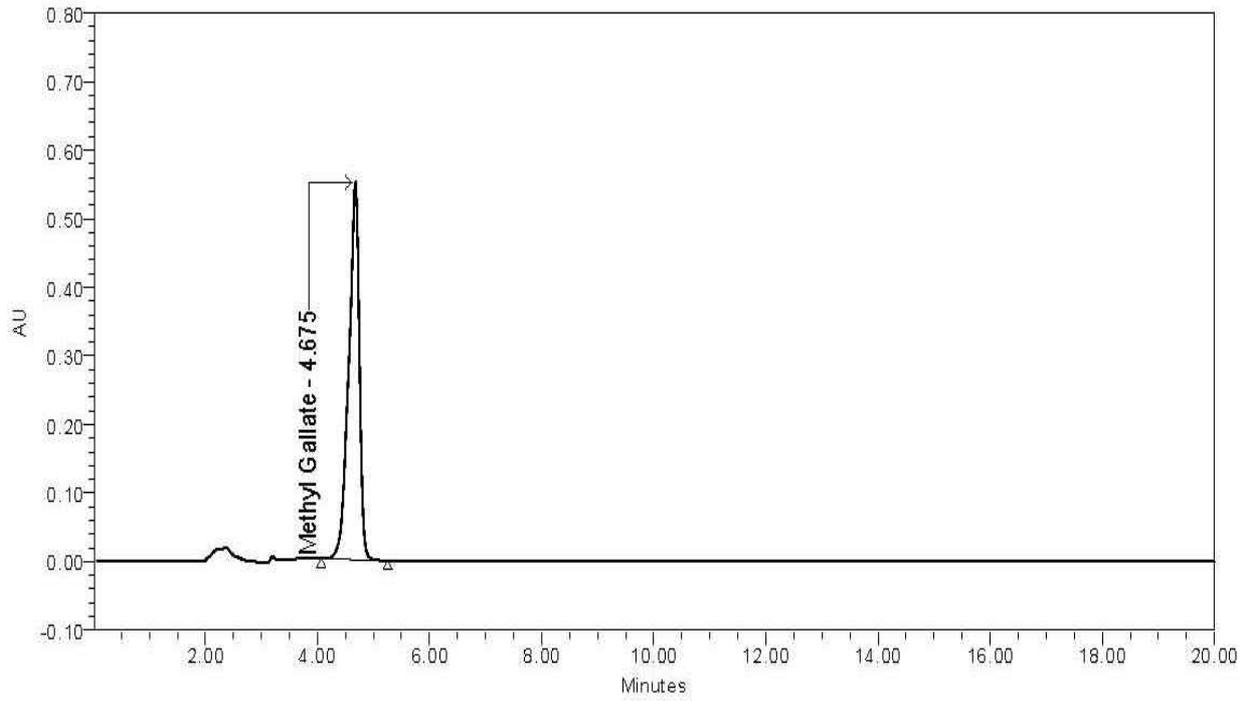


샘플(담팔수 추출물)

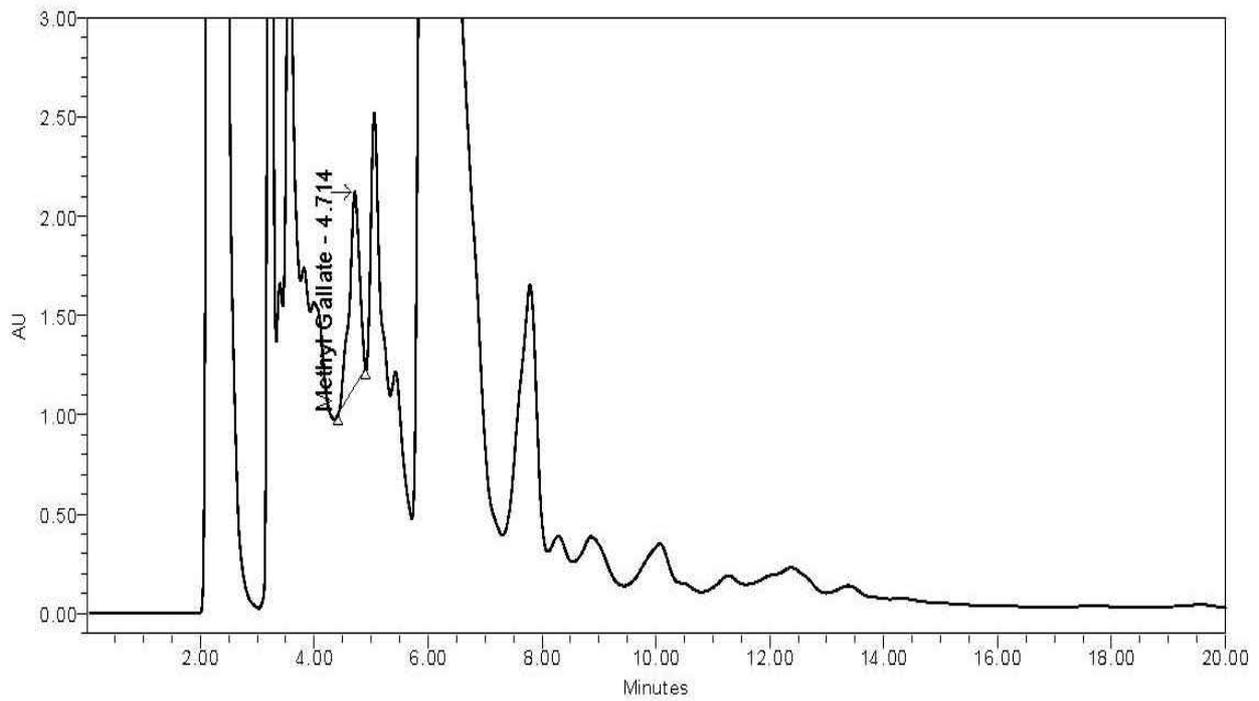


2) 담팔수 추출물의 HPLC 크로마토그램

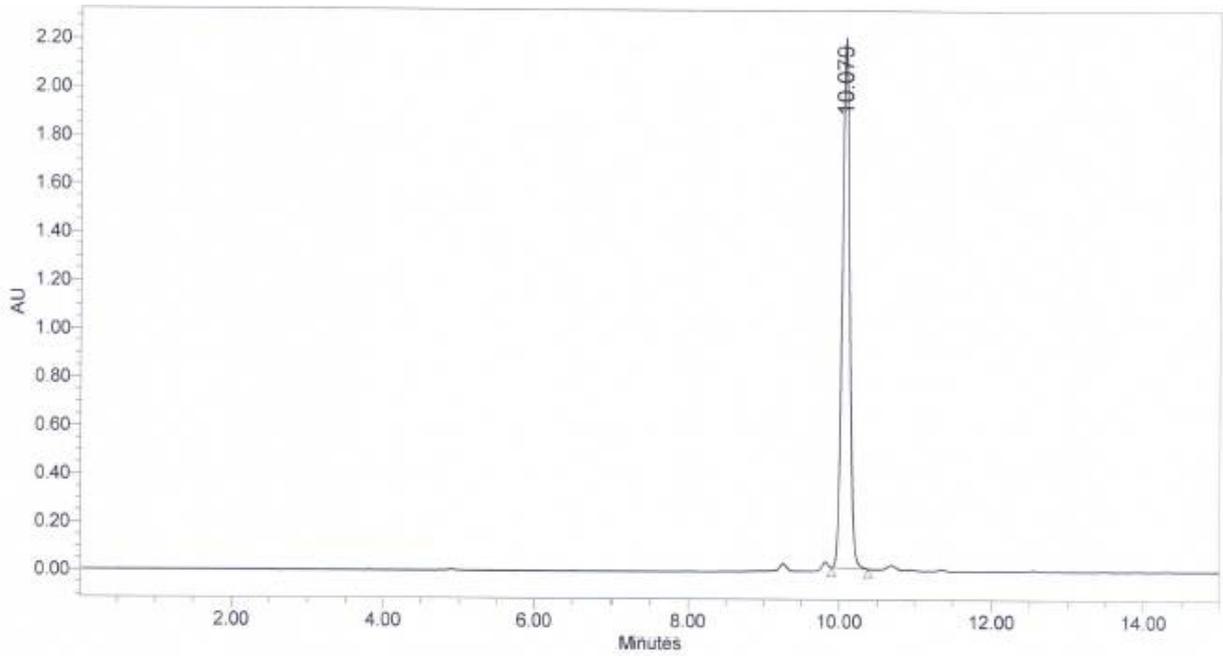
Methyl Gallate



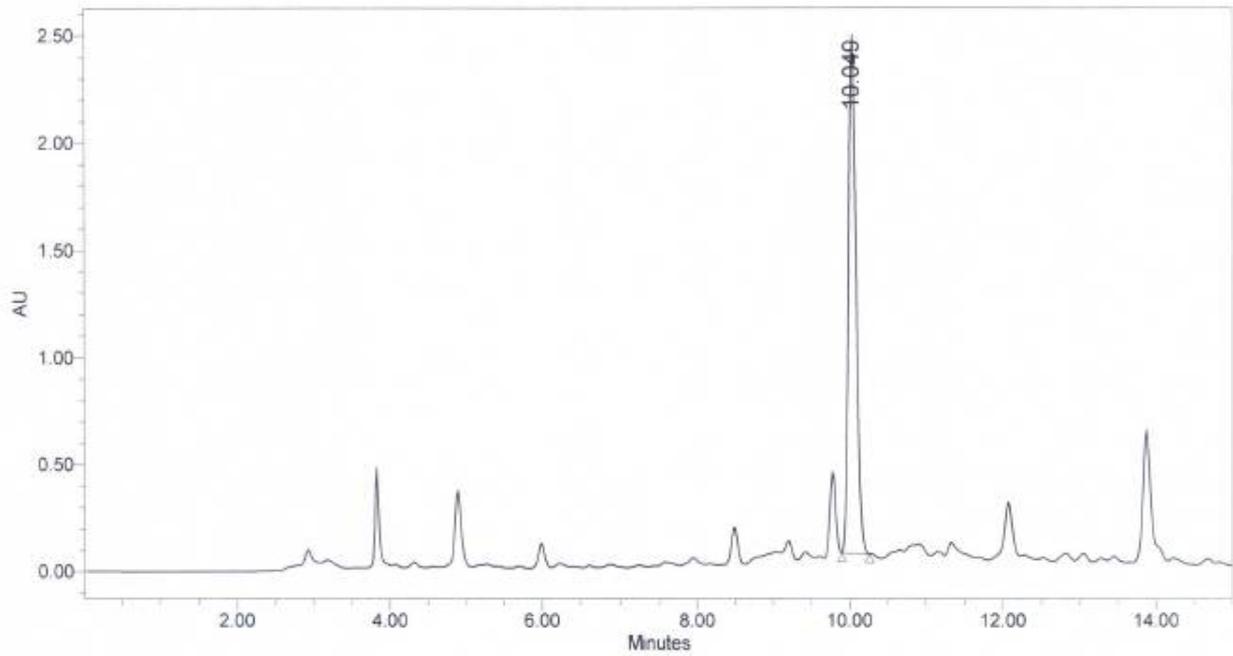
담팔수 추출물



Geraniin



담팔수 추출물



3) 담팔수 추출물 - 원료 성적서

원료 성적서

- 품 명 : 담팔수 추출물
- 제조번호 : 150122
- 제 조 일 : 2015. 01. 22.
- 제 조 처 : 대평

시험항목	기준	결과
성상	NA	갈색의 분말
이물	이물 없음	적합
함량	NA	Methyl Gallate 0.40 %
중금속	중금속 : 30 ppm 이하 납 : 5 ppm 이하 비소 : 3 ppm 이하	적합
미생물시험	세균 : 1×10^5 이하 진균 : 1×10^2 이하 특정미생물 : 불검출	적합

(주)한국파비스제약 연구소

가) 중금속시험 : 대한민국약전 생약시험법 중 중금속시험에 근거하여 진행

- 담팔수 추출물의 중금속 함량을 측정하고자 납, 비소는 습식분해법, 중금속은 중금속 시험법 중제 3법에 따라 시험을 진행하였으며, 판정기준인 납 5 ppm, 비소 3 ppm, 중금속 30 ppm 이하로 확인되었음.

나) 미생물시험 : 대한민국약전 생약시험법 중 미생물한도시험법에 근거하여 진행

- 생균수 시험은 한천평판도말법을 사용하여 총호기성미생물수(TAMC)은 대두카제인 소화한천배지를 써서 진균의 집락을 측정, 총진균수(TYMC)는 사부로포도당한천배지를 써서 측정하였음.
- 특정미생물시험은 담즙산저항성 그람음성균, 대장균, 살모넬라, 녹농균, 황색포도상구균을 한천평판도말법을 사용하여 측정하였음.

4) 담팔수 50% 주정추출물의 규격 확립

가) 3 배치 생산을 통한 수율 및 함량 근거 설정

제조번호	담팔수	생산량	추출수율	Geraniin
S141006	4 kg	1.13 kg	28.3 %	10.83 %
S141009	4 kg	1.15 kg	28.8 %	10.88 %
S141015	4 kg	1.14 kg	28.5 %	10.87 %

시험 성적서
Certificate of Analysis

제품명 : 담팔수추출물
Product Name

제조번호 : S141006
Lot No.

시험번호 : -
Analytical No.

제조일자 : 2014. 10. 06
Mfg. Date

수량 : 1kg
Quant.

평균

10.86 %

평균의 90%

9.77 %

최종 규격

9.8 % 이상

시험항목 Test Item	시험기준 Specification	결과 Result
성상	황갈색 - 갈색의 분말	적합
함량	Geraniin 으로서 9.8% 이상	10.83
확인시험	검역과 표준액의 주 피크 유지시간 동일	적합
중금속	30ppm 이하	적합
미생물한도시험	총호기성미생물수 10 ⁷ 개/g 이하 총진균수 10 ⁷ 개/g 이하 특정미생물 불검출 (대장균, 살모넬라, 녹농균, 황색포도상구균)	적합



나) 기준 및 시험법 확립

【별규】

담팔수50%에탄올건조엑스(3.3~4→1)

Elaeocarpus sylvestris var. *ellipticus* Extract(3.3~4→1)

이 약은 세절한 담팔수엽 분말을 50% 에탄올로 추출하여 엑스제의 제법에 따라 조제하며 정량할 때 제라닌(C₄₁H₇₂O₇: 952.66)으로서 9.8% 이상을 함유한다.

제법 이 약은 담팔수와 *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus* 의 잎인 담팔수엽을 건조하고 세절한 다음 50% 에탄올로 추출하여 엑스제의 제법에 따라 만든다. 세절한 담팔수엽 100kg에 50% 에탄올 2,000L를 넣고, 60℃에서 16시간 추출한 다음 여과하고 건조하여 이 약 25~30kg을 얻는다(3.3~4→1). (수율 약 28%)

성상 이 약은 황갈색 ~ 갈색의 가루이다.

확인시험 이 약은 정량법에 따라 시험할 때 검역과 표준액의 주 피크 유지시간은 동일하다.

중금속

이 약 1.0g을 가지고 대한민국약전 일반시험법의 생약시험법 중 중금속시험법에 따라 시험한다(30ppm 이하).

정량법

이 약 0.2g을 정밀하게 달아 물 70mL을 넣어 30분간 조음과추출한 후 물을 넣어 100mL로 하고 이를 검역으로 한다. 따로 제라닌 표준품 20mg을 물에 녹여 100mL로 하고 이를 표준액으로 한다.

검역과 표준액을 가지고 다음 HPLC 조건에 따라 분석한다.

<HPLC 조건>

- 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 220nm)
- 컬럼 : 안지름 약 4.6mm, 길이 약 25cm인 스테인레스강관에 5μm의 액체크로마토그래프용 옥타데실실릴화한 실리카겔을 충전한다.
- 유량 : 1mL/분
- 이동상 : 용액 A - 아세트니트릴
용액 B - 0.1% 인산 수용액

시간(분)	용액 A(%)	용액 B(%)
0	10	90
10.0	25	75
12.0	25	75
12.1	10	90
15.0	10	90

- 주입량 : 20μL

<계산식>

$$\text{담팔수추출물 중 제라닌의 함량(\%)} = W_{ST} \times P \times \frac{A_{SA}}{A_{ST}} \times \frac{1}{W_{SA}} \times 100$$

이때,

A_{ST} : 표준액의 제라닌 피크면적

A_{SA} : 검역의 제라닌 피크면적

W_{ST} : 표준액의 제라닌 표준품 취량(μg)

W_{SA} : 검역의 검체 취량(μg)

P : 표준품의 순도

5) 담팔수 경구투여용 정제 제조 공정

가) 일반 정제는 주성분 (활성성분)과 많은 종류의 보조 물질 혹은 첨가제들로 이루어져 있으며, 첨가제에는 많은 종류들이 있음

- 충전제 (유당일수화물, 만니톨, 미결정셀룰로오스, 인산일수소칼슘 등)
- 결합제 (메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 호화전분 등)

- 활택제 (스테아르산마그네슘, 스테아릴푸마르산나트륨, 스테아르산 등)
- 봉해제 (전분글리콜산나트륨, 크로스카멜로오스나트륨, 크로스포비돈 등)
- 유동화제 또는 분말 유동성 증진제 (콜로이드성 이산화규소, 탭크 등)

- 대부분의 약물은 그 자체만으로는 정제로 만들 수 없으며, 쉽게 마모되는 정제로 제조되는데, 결합제 (약물 입자 사이의 접촉을 연결해주는 물질)를 사용하여 제조하는데 충전제는 종종 우수한 결합제가 되는데 이것이 결합제-충진제임.

- 정제 안의 고체 입자들은 종종 마모성이 크며, 금속 표면에 달라붙기도 함. 이로 인해 타정기에 큰 문제를 일으킬 수 있는데 활택제를 첨가함으로써 해결할 수 있지만 내부 결합력을 감소시키며 정제 안의 공극들의 습윤성을 감소시킴.

- 정제를 제조하는 방법은 크게 직타법과 습식 또는 건식과립법 두가지로 구분. 직타법과 습식 또는 건식과립법의 구별은 절대적인 것은 아님. 익서은 과립 사이에 넣은 성분들 (조립 후의 유동 분말)의 첨가가 직타 단계에 속하게 되어, 과립 그 자체가 직타용 성분들의 하나로 간주될 수 있기 때문. 직타과정에서 정제의 경도를 증가시키기 위해 조립 후에 미결정셀룰로오스를 사용하는 것은 지타법이 도입된 이래로 흔한 일. 혼합과 다짐은 습식/건식 조립법과 직타법의 모두에 공통으로 사용되는 두 가지의 단위공정이고 할 수 있음.

- 담팔수 추출물의 정제에 사용한 직타법은 간단하여, 원료의약품의 성질이나 부하량이 적절한 경우 실험실에서 최우선으로 선택. 직타는 단순히 주성분과 충전제-결합제, 봉해제를 혼합하고, 활택제를 첨가한 다음 타정하는 것. 약물의 부하량이 많아지거나 원료의약품의 다짐성이 더 나빠질수록, 유당이나 인산수소칼슘과 같이 원료의약품의 부하량이 적은 정제의 부피를 키워 편리한 크기의 정제가 되도록 하는 충전제들보다 미결정셀룰로오스와 같은 진정한 직타용 결합제를 더 많이 사용하게 됨.

- 직타로 제조한 담팔수 추출물의 정제를 코팅하여 필름코팅정제를 제조하였는데, 정제를 코팅하는 이유는 여러 가지가 있음.

- 색을 입히기 위하여 사용 (식별 목적)
- 약물의 맛이나 냄새를 차폐하기 위하여 사용
- 정제의 분진 발생을 피하기 위하여 사용
- 정제의 방출속도를 조절하기 위하여 사용

- 코팅 기술 방법은 매우 다양하며 주로 유기용매에 고분자를 녹여 피막을 입히거나 마이크로캡슐화 외에도 최근 dry coating이나 hot-melting에 의한 기술도 보고되었으나 수성코팅 기술은 여러 면에서 널리 활용됨.

- 필름코팅액은 수성과 비수성용액이 있음. 최근 환경오염 등의 문제점 때문에 수성코팅이 제제 연구 및 산업화에 널리 활용되고 있으며, 특히 유기용매에 의한 환경문제

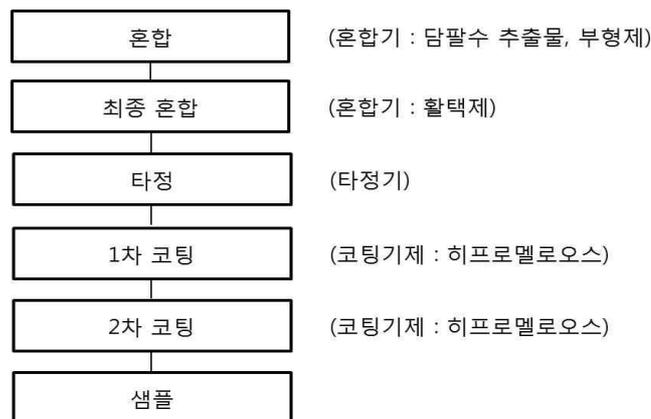
의 방지 외에도 코팅막이 균일하며 공정 중 안전하다는 장점이 있음. 수성 용액을 사용할 때는 휘발성 용매 사용에 의한 비용 및 환경 독성을 줄일 수 있고, 용매 회수 시스템이 불필요하며 휘발성 용매가 갖는 폭발성이 없기 때문에 수성 필름코팅액을 많이 씀. 그러나 느리게 증발되기 때문에 정제 표면으로부터 벗겨진 필름조각이 나타나며, 정제 표면이 거칠고, 정제 표면에 착색이 고르게 되지 않으며, 로고 등이 필름에 의해 안 보이는 될 우려가 있고, 피복 용액과 너무 장시간 방치 시 정제가 부식된다는 단점이 있음. 수성 필름코팅액으로는 다음과 같은 것들을 들 수 있음.

- 피막용고분자 : cellulose ether polymers 등
- 가소제 : glycerin, propylene glycol 등
- 착색제, 차광제 : 알루미늄레이크 색소, iron oxide pigments

나) 위의 배경을 바탕으로 담팔수 추출물을 이용해 경구투여용 정제를 다음과 같은 제조 방법과 분량으로 제조

<담팔수 경구투여용 정제 제조 방법>

- ① 혼합 : 담팔수 추출물과 부형제를 15 분간 혼합.
- ② 최종 혼합 : ①을 활택제와 최종 혼합.
- ③ 타정 : 타정기를 이용하여 ②의 최종 혼합물을 기준 질량으로 타정.
- ④ 1차 코팅 : 히프로멜로오스를 코팅기제로 하여 ③의 나정을 1차 코팅.
- ⑤ 2차 코팅 : 폴리비닐알코올을 코팅기제로 하여 ④의 1차 코팅물을 2차 코팅.



담팔수 경구투여용 정제 공정도

- 제조장비

혼합기



타정기



코팅기



샘플(정제)



<샘플 1>

배합목적	성분명	규격	분량	비율	붕해
주성분	담팔수 추출물	별규	200.0 mg	50.0 %	4분 29초 ~ 5분 03초
부형제	미결정 셀룰로오스102	KP	135.0 mg	33.8 %	
부형제	경질무수규산	KP	20.0 mg	5.0 %	
붕해제	크로스포비돈	NF	40.0 mg	10.0 %	
활택제	스테아르산 마그네슘	KP	5.0 mg	1.3 %	
		합계	400.0	100.0%	

<샘플 2>

배합목적	성분명	규격	분량	비율	붕해
주성분	담팔수 추출물	별규	200.0 mg	50.0 %	21분 40초 ~ 23분 30초
부형제	경질무수규산	KP	10.0 mg	2.5 %	
붕해제	규소화미결정셀룰로오스	NF	180.0 mg	45.0 %	
활택제	스테아르산 마그네슘	KP	10.0 mg	2.5 %	
합계			400.0 mg	100.0 %	

<샘플 3>

배합목적	성분명	규격	분량	비율	붕해
주성분	담팔수 추출물	별규	200.0 mg	50.0 %	26분 25초 ~ 28분 40초
부형제	경질무수규산	KP	10.0 mg	2.5 %	
붕해제	규소화미결정셀룰로오스	NF	170.0 mg	42.5 %	
활택제	스테아르산 마그네슘	KP	20.0 mg	5.0 %	
합계			400.0 mg	100.0 %	

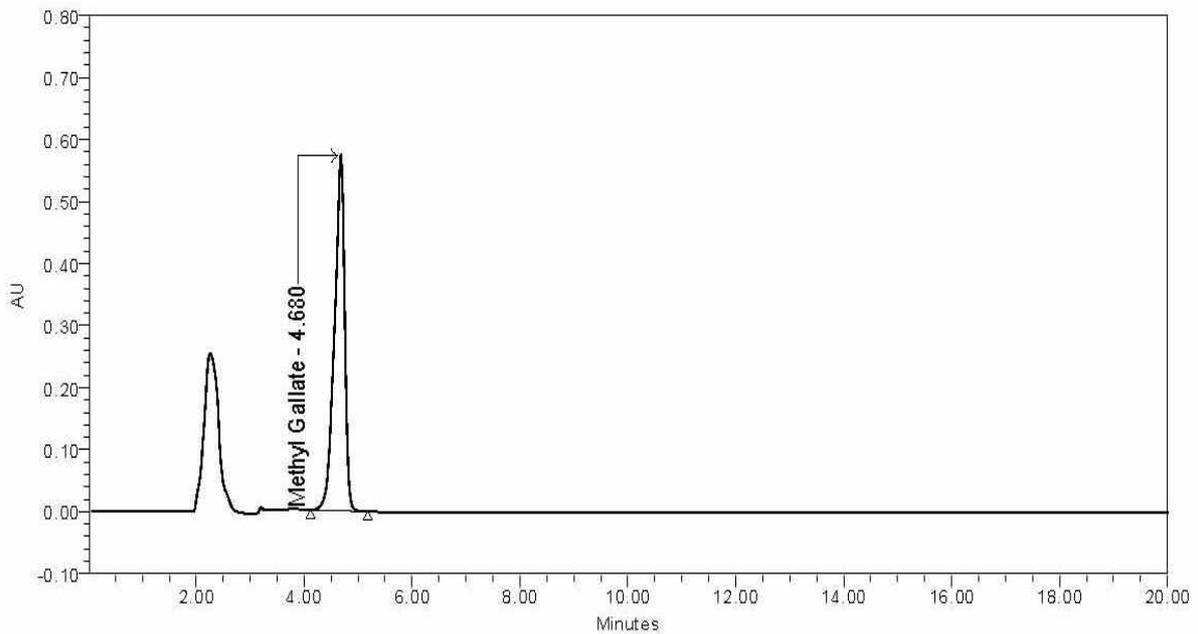
<샘플 4>

배합목적	성분명	규격	분량	비율	붕해
주성분	담팔수 추출물	별규	200.0 mg	50.0 %	16분 20초 ~ 16분 50초
부형제	경질무수규산	KP	10.0 mg	2.5 %	
붕해제	규소화미결정셀룰로오스	NF	185.0 mg	46.3 %	
활택제	스테아르산 마그네슘	KP	5.0 mg	1.3 %	
합계			400.0 mg	100.0 %	

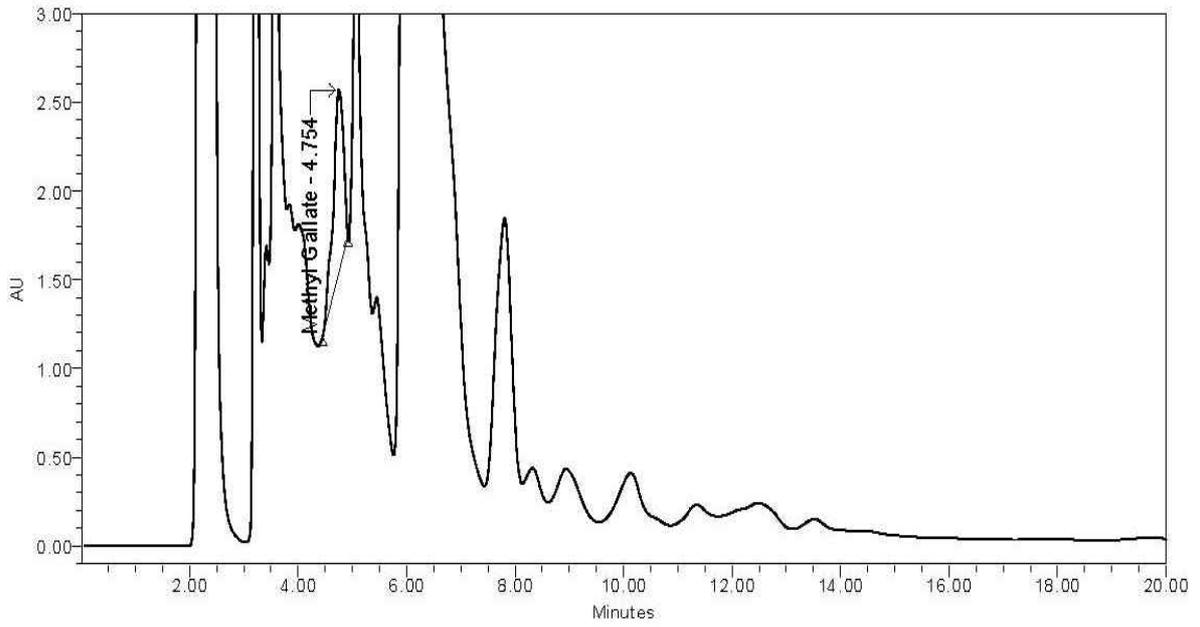
- 위의 샘플들 중 샘플 4의 분량으로 Scale-up 재현성을 확인하였으며, 그에 대한 붕해는 15분 32초 ~16분 25초로 재현성이 나타남을 확인.

- 담팔수 추출물 정제 - HPLC 크로마토그램

Methyl Gallate



담팔수 추출물 정제



담팔수 경구투여용 정제 샘플

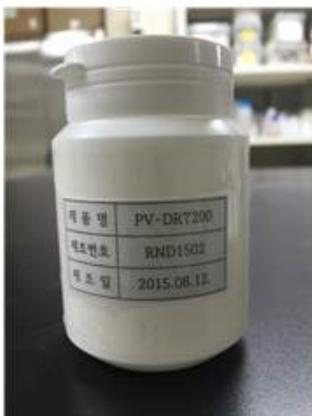
안정성시험용 정제



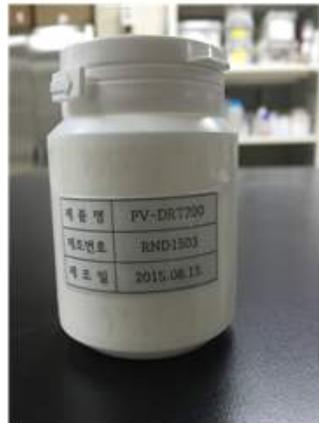
RND1501



RND1502



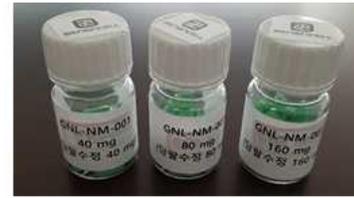
RND1503



다) 완제의약품의 최종 규격 설정 (담팔수정)

- 담팔수 50% 주정추출물(건조엑스) 40, 80, 160 mg 함유 완제 의약품 제조 (3 lot 생산)

공정번호	공정명칭	원료, 시약, 용매 등	비고
1	원료칭량	주성분 : 담팔수50%에탄올건조엑스 (3.3~4→1) 부형제 : 유당수화물 부형제 : D-소르비톨 부형제 : 전호화전분 결합제 : 포비돈K30 활택제 : 스테아르산마그네슘 코팅제 : 오파드라이 amb II 88A180040 화이트 착색제 : 황색4호알루미늄레이크 착색제 : 청색1호알루미늄레이크 용매 : 정제수	주성분 제조원 : (주)대명 소재지: 경상북도 상주시 함창읍 영동길 19-8(오동리)
2	혼합	주성분 : 담팔수50%에탄올건조엑스 (3.3~4→1) 부형제 : 유당수화물 부형제 : D-소르비톨 부형제 : 전호화전분 결합제 : 포비돈K30 부형제 : 경질무수규산 활택제 : 스테아르산마그네슘	
3	타정	공정 2의 반제품	
4	코팅액의 조제	코팅제 : 오파드라이 amb II 88A180040 화이트 착색제 : 황색4호알루미늄레이크 착색제 : 청색1호알루미늄레이크 용매 : 정제수	코팅액 조제 시 1정당 정제수(KP) 112mg를 사용하여 제조
5	코팅	공정 3의 반제품 / 공정 4의 코팅액	
6	선별	공정 5의 반제품	
7	포장	공정 6의 반제품	직접용기, 포장의 재질 : 병



완제 품 시험 성적서 (안정성 시험)

표준명	PV-DHT180	제조번호	PNQ1506		
주요분	담팔수추출물 100mg	제조량	0.000 mg		
시험일자(기준)	표시기준	제조일자	2015.08.19.		
시험항목	기	준	시험결과	시험일자	시험자
용량	녹색의 광택형 필름코팅형	녹색의 광택형 필름코팅형	15.08.24.	김민아	
용량도	90% 이내(±)	20±6%	15.08.24.	김민아	
잔류수분	습량분과 평균습량 ± 10.0%	431.51mg (+1.80% / -2.42%)	15.08.24.	김민아	
확인시험	함량시험 시 잔여, 표준액 주입과 잔여의 유지시간은 동일하다.	검량과 용량시험 주입과 유지시간은 동일하다.	15.08.24.	김민아	
중금속	30 ppm 이하	비교약품과 동일	15.08.24. - 08.28.	김민아	
용량	Genarlin으로서 0.8% 이상	10.85%	15.08.24.	김민아	
용량 불균일성	용량 불균일성 : 1×10 ² ctu/g 이하	불충족			
잔류물 시험	용량 불균일성 : 1×10 ² ctu/g 이하	불충족	15.08.24. - 08.31.	김민아	
시험항목	검량	검량			
비고	initial				
시험	시험일자	확인자	승인자		
시험	2015.07.31	lso	LEE		

- 완제의약품의 기준 및 시험방법 확립

<기준>

1. **성상** : 이 약은 녹색의 광택형 필름코팅형이다.
2. **확인시험** : 아래 확인시험법에 따라 시험할 때 적합하다.
3. **제제균일성시험** : 아래 제제균일성시험법에 따라 시험할 때 편차는 10%이내이다.
4. **붕해시험** : 아래 붕해시험법에 따라 시험할 때 60분 이내에 붕해되어야 한다.
5. **중금속시험** : 아래 중금속시험법에 따라 시험할 때 중금속은 30ppm 이하이다.
6. **미생물한도시험** : 아래 미생물시험법에 따라 시험할 때 적합하다.
7. **함량시험** : 아래 함량시험법에 따라 시험할 때 이 약 1정 당 제라닌으로서 9.8% 이상을 함유한다.

<시험방법>

1. **성상** : 육안으로 관찰한다.
2. **확인시험** : 이 약을 아래 함량시험법에 따라 시험할 때 검액과 표준액의 주 피크 유지시간은 동일하다.
3. **제제균일성시험** : 이 약 20정을 취해 대한민국약전 일반시험법의 제제균일성시험법 중 질량편차시험법에 따라 시험한다.
4. **붕해시험** : 이 약을 대한민국약전 일반시험법의 붕해시험법에 따라 시험한다.
5. **중금속시험** : 이 약을 대한민국약전 일반시험법의 생약시험법 중 중금속시험법에 따라 시험한다.
6. **미생물한도시험** : 이 약을 대한민국약전 일반시험법의 미생물한도시험법에 따라 시험한다.
7. **함량시험** :
1) 표준액

제라닌 표준품 10mg을 취해 50mL 용량플라스크에 넣고 물을 넣어 녹여 50mL로 한 액을 표준액으로 한다.

2) 검액

이 약 20정을 취해 곱게 갈아 담팔수추출물으로서 200mg에 해당하는 양을 달아 100mL 용량플라스크에 넣고 물 70mL을 넣어 30분간 초음파추출한 후 물을 넣어 100mL로 한다. 이 액을 0.2um 필터로 여과한 액을 검액으로 한다.

위의 표준액, 검액을 아래 HPLC 조건에 따라 시험한다.

<HPLC 조건>

- 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 220nm)
- 컬럼 : 안지름 약 4.6mm, 길이 약 25cm인 스테인레스강관에 5um의 역채 크로마토그래프용 옥타데실실릴화한 실리카겔을 충전한다.
- 유량 : 1ml/분
- 이동상 : 용액 A - 아세트니트릴
용액 B - 0.1% 인산 수용액

시간(분)	용액 A(%)	용액 B(%)
0	10	90
10.0	25	75
12.0	25	75
12.1	10	90
15.0	10	90

○ 주입량 : 20uL

- 답팔수 경구투여용 정제 안정성 시험 (장기보존시험)

[40mg]

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.12

포장조건 (재질): 병 (바디:HDPE,
캡:LDPE)

로트번호 : RND1501

시험시작일 : 2015.08.25

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3 개월	6 개월	9 개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.43%/ -2.22%	+1.49%/ -2.22%	+2.37%/ -2.33%	+1.23%/ -2.36%	+1.64%/ -2.35%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	10.98%	11.22%	11.22%	11.14%	10.99%
붕해시험	60분 이내	20분05초	21분37초	20분30초	19분41초	20분21초
중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×10 ⁵ 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×10 ² 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.12

포장조건 (재질): 병 (바디:HDPE,
캡:LDPE)

로트번호 : RND1502

시험시작일 : 2015.08.25

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3 개월	6 개월	9 개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.57%/ -2.45%	+1.57%/ -2.18%	+1.36%/ -2.05%	+1.37%/ -2.60%	+1.43%/ -1.91%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	10.77%	11.00%	11.27%	11.24%	11.01%
붕해시험	60분 이내	19분29초	20분29초	20분51초	19분52초	20분39초
중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×10 ⁵ 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×10 ² 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.12

포장조건 (재질): 병 (바디:HDPE,
캡:LDPE)

로트번호 : RND1503

시험시작일 : 2015.08.25

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3 개월	6 개월	9 개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.25%/ -2.42%	+1.37%/ -2.53%	+1.34%/ -1.50%	+1.84%/ -2.13%	+2.02%/ -2.33%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	10.84%	11.12%	11.37%	11.25%	11.12%
붕해시험	60분 이내	20분42초	19분23초	20분39초	20분29초	20분53초

중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×105개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×102개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

[80mg]

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.26

포장조건 (재질): 병 (바디:HDPE, 캡:LDPE)

로트번호 : RND1507

시험시작일 : 2015.09.08

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.84%/-1.66%	+1.61%/-2.67%	+1.22%/-1.64%	+1.83%/-1.95%	+2.16%/-2.48%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	11.15%	11.12%	11.22%	11/12%	11.17%
붕해시험	60분 이내	20분43초	19분29초	19분32초	20분06초	20분04초
중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×105개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×102개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.26

포장조건 (재질): 병 (바디:HDPE, 캡:LDPE)

로트번호 : RND1508

시험시작일 : 2015.09.08

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.44%/-2.05%	+1.50%/-1.79%	+1.53%/-1.89%	+1.69%/-1.18%	+1.40%/-1.68%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	11.16%	11.00%	11.27%	11.20%	11.12%
붕해시험	60분 이내	20분43초	19분05초	20분24초	19분43초	19분34초
중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×105개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×102개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.26

포장조건 (재질): 병 (바디:HDPE, 캡:LDPE)

로트번호 : RND1509

시험시작일 : 2015.09.08

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일

	크 면적의 유지시간은 동일					
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.63%/-1.67%	+1.82%/-2.12%	+1.77%/-2.53%	+1.42%/-1.15%	+1.81%/-2.41%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	11.12%	10.88%	11.09%	10.87%	10.88%
붕해시험	60분 이내	20분45초	19분41초	18분56초	19분49초	20분53초
중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×10 ⁵ 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×10 ² 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

[160mg]

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.19

포장조건(재질): 병(바디:HDPE, 캡:LDPE)

로트번호 : RND1504

시험시작일 : 2015.09.01

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피 크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.98%/-1.71%	+1.74%/-1.86%	+2.93%/-2.02%	+0.95%/-1.03%	+1.17%/-1.46%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	10.76%	11.00%	11.23%	10.79%	10.88%
붕해시험	60분 이내	20분42초	20분31초	19분29초	20분27초	20분41초
중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×10 ⁵ 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×10 ² 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.19

포장조건(재질): 병(바디:HDPE, 캡:LDPE)

로트번호 : RND1505

시험시작일 : 2015.09.01

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피 크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.59%/-2.59%	+1.81%/-1.30%	+1.88%/-2.09%	+2.04%/-2.57%	+1.43%/-1.95%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	10.90%	11.18%	11.19%	10.81%	10.73%
붕해시험	60분 이내	20분34초	19분28초	20분53초	19분57초	20분51초
중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×10 ⁵ 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×10 ² 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

제 품 명 : ES16001정

제조일자 : 2015.08.19

포장조건(재질): 병(바디:HDPE, 캡:LDPE)

로트번호 : RND1506

시험시작일 : 2015.09.01

저장조건:25±2℃ 60±5%

시험항목	기준	장기보존시험				
		initial	3 개월	6 개월	9 개월	12개월
성상	녹색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합
확인시험	정량시험 시 검액, 표준액 주피크 면적의 유지시간은 동일	동일	동일	동일	동일	동일
질량편차	평균질량과 개개 편차 10% 이하	+1.80%/-2.43%	+1.84%/-2.63%	+1.96%/-2.31%	+1.58%/-2.56%	+1.26%/-1.38%
함량시험	제라닌으로서 9.8%이상을 함유	10.65%	10.95%	11.17%	10.73%	10.77%
붕해시험	60분이내	20분53초	19분19초	20분18초	20분51초	19분19초
중금속시험	30ppm이하	적합	-	-	-	-
미생물한도시험	세균: 1×10 ⁵ 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	진균: 1×10 ² 개/g이하	불검출	-	-	-	-
	특정세균: 대장균, 황색포도상구균, 살모넬라균, 녹농균(불검출)	불검출	-	-	-	-

제9절 안전성 확보 및 임상시험 계획

가. 전임상 안전성 평가에 따른 담팔수 추출물의 안전성 확보

- 본시험의 담팔수 50% 에탄올 추출물은 설치류 단회, 설치류/비설치류 4주, 13주 반복독성, 유전독성시험에서 독성학적 의미를 가지는 요소는 발견되지 않음

1) 설치류 단회 경구투여독성시험

시험제목	Sprague-Dawley 랫드를 이용한 담팔수 50 % 에탄올 추출물의 단회 경구투여독성 시험						
시험책임자	안규섭						
시험기관	한국건설생활환경시험연구원	자료요건	GLP				
시험기간	2015년 3월 10일 ~ 2015년 4월 07일		시험번호	NT15-00007			
시험목적	시험물질 담팔수 50 % 에탄올 추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성증상과 반수치사량(LD50)을 조사하기 위해 실시함						
시험물질	담팔수 50% 에탄올 추출물		제조번호	150122			
시험동물	종 류	Rat		계 통	Sprague Dawley		
	월 령	8 주령		동 물 수	수컷: 10 암컷: 10		
시험방법	투여경로	경구투여					
	투여회수	1회					
시험내용	군	성별	동물수	투여용량 (mg/kg)	사망동물수		
	G1	대조군	M/F	5/5	0	M	F
					0/5	0/5	

	G2	투여군	M/F	5/5	500	0/5	0/5
	시시험물질을 이용하여 3,000 및 2,000 mg/kg의 투여용량으로 단회 경구투여 예비독성 시험을 실시한 결과, 모든 시험동물에서 시험물질에 의한 독성학적 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본시험에서는 3,000 mg/kg을 단일 시험물질 투여군으로 설정하고 추가로 멸균증류수만을 투여하는 부형제 대조군을 설정함						
시험결과	사망동물	시험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았음.					
	일반증상	시험기간 동안 특이한 일반증상이 관찰되지 않았음.					
	체중변화	체중측정결과, 모든 시험동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었음. 통계학적 검정결과, 암·수 모든 시험군에서 군간 유의한 체중차이는 관찰되지 않았음.					
	부검	시험종료 시 모든 생존동물의 부검 결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았음.					
결론	시험물질 담팔수 50 % 에탄올 추출물을 설치류인 SD 랫드에 단회 경구투여한 결과, 시험물질에 의한 전신적 독성학적 변화는 관찰되지 않았으며, 반수치사량은 3,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.						

2) 설치류 및 비설치류 반복투여 독성시험

가) 설치류 4주 DRF

시험제목	1. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 담팔수 50 % 에탄올 추출물의 4 주 반복 경구 투여 용량결정시험						
시험책임자	안규섭						
시험기관	한국건설생활환경시험연구원			자료요건	Non-GLP		
시험기간	2015년 4월 09일 ~ 2015년 5월 19일			시험번호	NT15-00007		
시험목적	시험물질 담팔수 50 % 에탄올 추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여 하였을때, 나타나는 독성을 조사하고 13 주 반복 경구투여독성시험의 투여용량을 설정하기 위해 실시함						
시험물질	담팔수 50% 에탄올 추출물			제조번호	150122		
시험동물	종 류	Rat		계 통	Sprague Dawley		
	월 령	6 주령		동 물 수	수컷: 20 암컷: 20		
시험방법	투여경로	경구투여					
	투여회수	1회/일, 7일/주, 4주간 매일 오전 중에 투여					
시험내용	군	성별	동물수	투여용량 (mg/kg/day)	사망동물수		

					M	F
G1	대조군	M/F	5/5	0	0/5	0/5
G2	저용량군	M/F	5/5	500	0/5	0/5
G3	중용량군	M/F	5/5	1,000	0/5	0/5
G4	고용량군	M/F	5/5	2,000	0/5	0/5
<p>시험물질을 이용한 단회 경구투여독성시험(GT15-00020) 결과, 3,000 mg/kg의 투여용량에서 시험물질에 의한 독성학적 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서는 반복투여독성시험에서 일반적으로 사용되는 한계용량인 2,000 mg/kg의 용량을 고용량으로 설정하고, 공비를 2로 두어 중용량 및 저용량을 설정하였다. 추가로 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 설정</p>						
시험결과	사망동물	관찰기간 동안, 암수 대조군 및 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았음.				
	일반증상	<ul style="list-style-type: none"> 암·수 1,000 mg/kg 투여군의 모든 시험동물에서 시험물질 투여직후 산발적인 유연(salivation)이 나타남 수컷 500 mg/kg 투여군의 일부 시험동물에서도 단발성으로 유연이 관찰됨 				
	체중변화	암·수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음				
	사료 섭취량	암·수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음				
	안검사	안검사를 실시한 암·수 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았음.				
	요검사	<ul style="list-style-type: none"> 수컷 pH 항목에서 군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되었음 ($p < 0.01$). 그 외 항목에서 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음. 요침사 및 요량 검사결과, 암·수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음. 				
	혈액학적 검사	<ul style="list-style-type: none"> 수컷 250 및 1,000 mg/kg 투여군의 WBC(white blood cell) 수치와 1,000 mg/kg 투여군의 LY(lymphocyte) 및 MO(monocyte) 수치가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가 함(0.05). 그 외 암·수 모든 시험군의 시험항목에서 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음. 				
	혈액응고시간 검사	혈액응고시간 검사결과, 암·수 모든 시험군의 시험항목에서 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음.				
	혈액생화학 적 검사	<ul style="list-style-type: none"> 수컷 1,000 mg/kg 투여군의 ALP(Alkaline phosphatase) 수치가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였음($p < 0.05$). 그 외 암·수 모든 시험군의 시험항목에서 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음. 				

	장기중량	<ul style="list-style-type: none"> • 상대장기중량 측정결과, 암컷 500 mg/kg 투여군의 뇌하수체 중량이 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다(p<0.05). • 그 외 암·수 모든 시험군의 절대 및 상대장기중량에서 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음
	부검	<ul style="list-style-type: none"> • 수컷 500 mg/kg 투여군의 1 레(G3-30번)에서 비장의 황색결절(nodule, yellow colored), 암컷 250 mg/kg 투여군의 1 레(G2-53번)에서 폐의 다병소성 회색점(spot, gray, multifocal), 암컷 500 mg/kg 투여군의 1 레(G3-68번)에서 난소의 양측성 소형화(small, bilateral), 그리고 암컷 1,000 mg/kg 투여군의 1 레(G4-77번)에서 비장의 비대(enlargement)가 각각 관찰되었다. • 그 외 모든 생존동물에서는 육안적 이상소견이 관찰되지 않았다.
	조직병리학 적 검사	<p>(1) 부검 시 관찰된 육안소견(폐 제외)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 부검 시 관찰된 수컷 500 mg/kg 투여군 비장의 황색결절은 광범위 괴사(massive necrosis)로, 암컷 500 mg/kg 투여군 난소의 양측성 소형화는 황체저형성(hypoplasia, corpus luteum) 및 난포낭(follicular cyst)으로 확인되었음. • 암컷 1,000 mg/kg 투여군 비장의 비대는 골수의 조혈반응(extramedullary hematopoiesis)으로 확인되었음. <p>(2) 폐</p> <ul style="list-style-type: none"> • 부검 시 관찰된 암컷 250 mg/kg 투여군 폐의 다병소성 회색점은 혈관주위의 단핵구성 세포침윤(cell infiltration, mononuclear, perivascular)으로 확인되었고, 그 외 암·수 부형제 대조군 및 1,000 mg/kg 투여군의 폐에 대한 조직병리 검사결과에서도 유사한 소견이 관찰되었음. • 수컷 부형제 대조군 및 1,000 mg/kg 투여군에서는 폐 혈관주위의 단핵구성 세포침윤이 각각 3 레(G1-3, G1-6, G1-7 번) 및 4레(G4-31~33, G4-38 번), 암컷 부형제 대조군 및 1,000 mg/kg 투여군에서 각각 5 레(G1-41, G1-44~46, G1-48 번) 및 3 레(G4-75, G4-77, G4-79 번) 관찰되었음. • 추가로 수컷 1,000 mg/kg 투여군의 1 레(G4-32 번)에서는 단핵구성 세포침윤에 폐포대식세포(alveolar macrophage)가 동반된 소견이 나타났고, 암컷 1,000 mg/kg 투여군의 1 레(G4-78 번)에서는 갈색색소를 함유한 대식세포를 동반하는 국소성의 염증(focal inflammation, with brown pigment laden macrophage)이 관찰되었음. <p>(3) 그 외 장기·조직</p> <ul style="list-style-type: none"> • 암·수 부형제 대조군 및 1,000 mg/kg 투여군에 대한 조직병리 검사결과, 수컷 부형제 대조군의 1 레(G1-3 번)에서 뇌하수체의 원위부 발달낭(developmental cyst, pars distalis), 수컷 1,000 mg/kg 투여군의 1 레(G4-36 번)에서 갑상선의 아가미소체낭(ultimobranchial cyst)이 관찰되었음.

		<ul style="list-style-type: none"> • 암컷 부형제 대조군의 1레(G1-43 번)에서 자궁 내막의 국소성 출혈(hemorrhage, focal, endometrial), 암컷 1,000 mg/kg 투여군의 1 레(G4-76 번)의 췌장에서 췌장섬 주위의 국소성 단핵구성세포침윤(cell infiltration, mononuclear, focal, around islet)이 관찰되었음. 						
결 론	시험물질 담팔수 50 % 에탄올 추출물을 설치류인 SD 랫드에 13 주간 반복 경구투여한 결과, 시험물질에 의한 전신적 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 무독성량은 1,000 mg/kg으로 판단되며 표적장기는 관찰되지 않았다.							
나) 설치류 13주 반복투여 독성시험								
시험제목	2. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 담팔수 50 % 에탄올 추출물의 13 주 반복 경구투여독성시험							
시험책임자	안규섭							
시험기관	한국건설생활환경시험연구원	자료요건	GLP					
시험기간	2015년 6월 22일 ~ 2015년 10월 08일	시험번호	GT15-00021					
시험목적	시험물질 담팔수 50 % 에탄올 추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 13 주간 반복 경구투여하였을 때, 나타나는 독성을 조사하고 무독성량(NOEL) 및 표적장기(target organ)를 알아보고자 수행하였다.							
시험물질	담팔수 50% 에탄올 추출물	제조번호	150122					
시험동물	종 류	Rat	계 통	Sprague Dawley				
	월 령	6 주령	동 물 수	수컷: 40 암컷: 40				
시험방법	투여경로	경구투여						
	투여회수	1회/일, 7일/주, 13주간 투여						
시험내용		군	성별	동물수	투여용량 (mg/kg/day)	사망동물수		
						M	F	
		G1	대조군	M/F	10/10	0	0/10	0/10
		G2	저용량군	M/F	10/10	250	0/10	0/10
		G3	중용량군	M/F	10/10	500	0/10	0/10
	G4	고용량군	M/F	10/10	1,000	0/10	0/10	
	시험물질을 이용한 4 주 반복 경구투여 용량결정시험(NT15-00007) 결과, 2,000 mg/kg의 투여용량에서 시험물질에 의한 독성학적 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서는 의뢰자와 협의하여 13 주 반복투여독성시험에서 일반적으로 사용되는 한계용량인 1,000 mg/kg의 용량을 고용량으로 설정하고, 공비를 2 로 두어 중용량 및 저용량을 설정하였다. 추가로 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 설정							
시험결과	사망동물	관찰기간 동안, 암수 대조군 및 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서						

	사망례는 관찰되지 않았음.
일반증상	일반증상으로는 시험물질 투여 후 7일 제부터 2,000mg/kg 투여군의 모든 시험동물에서 시험물질 투여 직후에 유연(Salivation)이 관찰 되었음.
체중변화	실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음..
사료 섭취량	<ul style="list-style-type: none"> • 수컷 1,000 mg/kg 투여군의 1 주차 사료섭취량이 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소함($p<0.05$). • 그 외 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음.
음수 섭취량	실험기간 동안 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음.
안검사	안검사를 실시한 암·수 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았음.
요검사	<ul style="list-style-type: none"> • 요색조 항목에서 암·수 시험군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰 되었음(수컷 : $p<0.01$, 암컷 : $p<0.05$). • 그 외 시험항목에서는 암·수 시험군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았음.
혈액학적 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 혈액학적 검사결과, 암컷 1,000 mg/kg 투여군의 RDW(red cell distribution width) 및 Reti(reticulocyte) 수치가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가하였음(RDW : $p<0.05$, Reti : $p<0.01$). • 그 외 검사항목에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음
혈액생화학 적 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 혈액생화학 적 검사결과, 수컷 2,000 mg/kg 투여군의 T-BIL(total bilirubin) 수치가부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였음($p<0.05$). • 수컷1,000 및 2,000 mg/kg 투여군의 Na(sodium) 수치와 암컷 500 mg/kg 투여군의Mg(magnesium) 수치는 통계학적으로 유의하게 증가하였음($p<0.05$). • 그 외 검사항목에서 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음.
장기중량	<ul style="list-style-type: none"> • 절대장기중량 측정결과, 수컷 500, 1,000 및 2,000 mg/kg 투여군의 우측 신장 중량이 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였음($p<0.05$). • 상대장기중량 측정결과, 암컷 1,000 mg/kg 투여군의 좌측 부신 중량이 통계학적으로 유의하게 감소하였음($p<0.05$). • 그 외 암·수 부형제 대조군과 시험물질 투여군간 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음.

	부검	<ul style="list-style-type: none"> • 수컷 부형제 대조군 1 레(G1-5번)에서 좌측 신장의 신우확장(dilatation, pelvis, left), 수컷 500 mg/kg 투여군 1 레(G2-8번)에서 간 꼬리엽의 적색 및 황색의 얼룩(mottled, red and yellow colored, caudate lobe) 그리고 수컷 2,000 mg/kg 투여군 1 레(G4-20번)에서 좌측 폐의 적색부분(red area, left)이 관찰되었음. • 그 외 시험동물에서는 특이한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.
	조직병리학 적 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 수컷 부형제 대조군에서 관찰된 신장의 신우확장은 편측성의 수신증(hydronephrosis, unilateral), 수컷 500 mg/kg 투여군에서 관찰된 간 꼬리엽의 적색 및 황색 얼룩은 연결괴사(necrosis, bridging, caudate lobe), 그리고 수컷 2,000 mg/kg 투여군에서 관찰된 좌측 폐의 적색부분은 간질성 폐렴을 동반한 폐포 내 이물(foreign body, alveolar, with interstitial pneumonitis)로 확인되었음.
결 론	<p>담팔수 50 % 에탄올 추출물의 설치류 SD 랫트에서 28일간 반복 경구투여한 결과, 시험물질에 의한 전신적인 독성학적 변화는 관찰되지 않았다.</p> <p>따라서 시험물질 담팔수 50 % 에탄올 추출물의 무독성량(NOAEL)은 2,000 mg/kg/day로 판단되며, 표적장기(target organ)는 관찰되지 않았다.</p>	

다) 비설치류 4주 DRF

시험제목	3. Beagle dog을 이용한 담팔수 50 % 에탄올 추출물의 4 주 반복 경구투여 용량 결정시험(DRF)				
시험책임자	고혁주				
시험기관	한국건설생활환경시험연구원	자료요건	GLP		
시험기간	2015년 4월 13일 ~ 2015년 6월 04일	시험번호	GT15-00026		
시험목적	시험물질인 담팔수 50 % 에탄올 추출물을 비설치류인 Beagle dog에 4 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하고, 추후 있을 반복투여 독성시험의 용량설정에 참고자료로 삼기 위해 실시함				
시험물질	담팔수 50% 에탄올 추출물	제조번호	150122		
시험동물	종 류	Beagle dog		계 통	Canis familiaris
	월 령	6~7개월령		동 물 수	수컷: 4 암컷: 4
시험방법	투여경로	경구투여			
	투여회수	반복투여(4주간 1일 1회)			
시험내용	군	성별	동물수	투여용량	사망동물수

				(mg/kg/day)	M	F
G1	대조군	M/F	1/1	0	0/1	0/1
G2	저용량군	M/F	1/1	250	0/1	0/1
G3	중용량군	M/F	1/1	500	0/1	0/1
G4	고용량군	M/F	1/1	1,000	0/1	0/1
<p>시험물질의 SD랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 결과, 3,000 mg/kg의 투여용량에서 시험물질에 의한 독성학적 변화가 관찰되지 않았다. 이상의 결과 및 의뢰자와 협의하여 본 시험에서는 1,000 mg/kg/day을 고용량으로 하고, 그 아래로 공비를 2 로 하여 2 군을 두었으며, 부형제만을 투여하는 부형제대조군을 설정</p>						
시험결과	사망동물	관찰기간 동안, 암수 대조군 및 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.				
	일반증상	<p>일반증상으로는 사료남김(remaining of feed), 유연(Salivation), 구토(Vomiting), 연변(Soft stool), 설사(Diarrhea)이 관찰되었다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 사료남김 부형제대조군: 수컷에서 3 회가 관찰됨 250 mg/kg/day 투여군: 수컷에서 4 회, 암컷에서 15 회 관찰됨 500 mg/kg/day 투여군: 수컷에서 8 회, 암컷에서 16 회 관찰됨 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 25 회, 암컷에서 18 회 관찰됨 • 유연 500 mg/kg/day 투여군 수컷에서 10 회, 암컷에서 4 회 관찰됨 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 15 회, 암컷에서 17 회 관찰됨 • 구토 500 mg/kg/day 투여군에서는 수컷에서 1 회가 관찰됨 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 3 회, 암컷에서 1 회 관찰됨 • 연변 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 9 회, 암컷에서 8 회 관찰됨 • 설사 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 11 회, 암컷에서 11 회 관찰됨 				
	체중변화	<ul style="list-style-type: none"> • 체중증가억제 250mg/kg/day 투여군에서는 수컷에서 2,4주차, 암컷에서 2주차에 관찰 500mg/kg/day 투여군에서는 수컷에서 2,4주차, 암컷에서 1~4주차 관찰 1000mg/kg/day투여군에서는 수컷에서 1주차 관찰됨 • 체중감소 250mg/kg/day 투여군에서는 암컷에서 1주차에 관찰 1000mg/kg/day투여군에서는 수컷에서 1~4주차, 암컷에서 2,4주차에 관찰됨 • 증량체감소 부형제 대조군과 비교하였을 때 250, 500 및 1,000mg/kg/day투여군에서 관찰됨 				

사료 섭취량	사료섭취량 감소가 250 및 500 mg/kg/day 투여군에서는 암컷에서 0, 1, 3 주차에 관찰되었고, 1,000 mg/kg/day 투여군에서는 암수에서 1, 2, 3, 4 주차에 관찰되었다.
안검사	시험물질의 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.
요검사	시험물질 투여 전 및 부형제대조군에 비하여 증가한 항목 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 BIL(bilirubin) 및 PRO(protein), 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 BIL, PRO 및 KET(ketone body)의 검출빈도가 증가하는 경향을 보였다. 그 외 항목에서는 시험물질 투여 전 및 부형제대조군과 비교 시 유의하다고 생각할 만한 변화가 관찰되지 않았다.
혈액학적 검사	시험물질 투여 전 및 부형제대조군과 비교 시 <ul style="list-style-type: none"> • 수치가 감소한 항목 수컷 시험물질 투여군에서 RBC(red blood cell count), HGB(hemoglobin conc.),HCT(hematocrit), LUP(percent of large unstained cell) <ul style="list-style-type: none"> • 수치가 감소한 항목 MCV(mean corpuscular volume) 및 MCH(mean corpuscular hemoglobin)
혈액생화학 적 검사	<ul style="list-style-type: none"> • 부형제대조군과 비교 시 증가한 항목 1,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 AST(aspartate inotransferase) 및 ALT(Alanine aminotransferase) 수치, 500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 ALT 수치 <ul style="list-style-type: none"> • 시험물질 투여 전 및 부형제대조군에 비교 시 감소한 항목 수컷 시험물질 투여군의 Ca(calcium)및 CPK(creatinine phosphokinase), 암컷 시험물질 투여군의 Ca, TP(total protein) 및 K(potassium)
장기중량	<ul style="list-style-type: none"> • 수컷 시험물질 투여군에서 좌측 부고환의 절대 및 상대중량 수치 및 전립선의 절대중량수치가 부형제대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였고, 간의 상대장기중량수치, 신장의 상대장기중량 수치(1,000 mg/kg/day), 좌측 갑상선의 절대 및 상대중량 수치 및 폐의 상대장기중량 수치가 부형제대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다. • 암컷 시험물질 투여군에서는 간, 우측 난소 및 뇌의 상대장기중량수치가 부형제대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였고, 좌측 신장, 심장 및 좌측갑상선의 상대장기중량 수치, 폐의 절대 및 상대장기중량 수치가 부형제대조군에비하여 감소하는 경향을 보였다.
부검	<ul style="list-style-type: none"> • 500 mg/kg 투여군 암수(동물번호 3번 및 7번)에서 십이지장의 회색 변색(discoloration, gray)이 관찰됨 • 1,000 mg/kg 투여군 수컷(동물번호 4번)에서 십이지장의 국소성 백탁(white coating, focal), 1,000 mg/kg 투여군 암컷(동물번호 8번)에서 십이지장의 회색 및 적색 변색(discoloration, gray and red)이 관찰됨

	조직병리학 적 검사	<ul style="list-style-type: none"> 500 및 1,000 mg/kg 투여군 암수에서 십이지장 점막상피에 갈색색소가 침착된 대식세포(brown pigment laden macrophage, mucosal epithelium)가 미미하게 관찰됨. 1,000 mg/kg 투여군 수컷의 십이지장에서는 점막상피의 국소성 미란(erosion, focal, mucosal epithelium), 1,000 mg/kg 투여군암컷의 십이지장에서는 점막하 충혈(congestion, focal, submucosal)이 추가로 미미하게 관찰됨
결론	<p>담팔수 50 % 에탄올 추출물을 Beagle dog에 4주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질 투여와 관련된 변화는 사료남김, 유연, 연변, 설사, 체중증가억제, 체중감소, 증체량감소, 사료섭취량감소, AST 및 ALT 증가, 간 상대중량 증가, 십이지장의 변색, 십이지장 점막상피의 갈색색소가 침착된 대식세포로 판단된다. 그리고, 1,000 mg/kg 투여군 암수에서 시험기간 동안 체중감소가 관찰되므로, 본 시험물질을 이용한 추후 있을 반복투여 독성시험에서는 500mg/kg/day 이하를 고용량군으로 설정하는 것이 무난할 것으로 판단된다.</p>	

라) 비설치류 13주 반복투여 독성시험

시험제목	4. Beagle dog을 이용한 담팔수 50 % 에탄올 추출물의 13 주 반복 경구투여 독성 시험						
시험책임자	고혁주						
시험기관	한국건설생활환경시험연구원	자료요건	GLP				
시험기간	2015년 5월 14일 ~ 2015년 9월 17일		시험번호	GT15-00022			
시험목적	시험물질인 담팔수 50 % 에탄올 추출물을 비설치류인 Beagle dog에 13 주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위하여 실시함.						
시험물질	담팔수 50 % 에탄올 추출물			제조번호	150122		
시험내용	군		성별	동물수	투여용량 (mg/kg/day)	사망동물수	
			M/F			M	F
	G1	대조군	M/F	3/3	0	0/3	0/3
	G2	저용량군	M/F	3/3	300	0/3	0/3
	G3	중용량군	M/F	3/3	400	0/3	0/3
G4	고용량군	M/F	3/3	500	0/3	0/3	
<p>본 시험물질의 beagle dog을 이용한 용량결정시험 결과, 일반증상으로 식욕부진, 체중 감소, 유연, 구토, 연변, 설사가 관찰되었고, 부검시에는 십이지장에서 회색 변색 및 백태가 관찰되었다. 이상의 결과를 고려하여 의뢰자와 협의 후 본 시험에서는 500 mg/kg/day을 고용량으로 하고, 그 아래로 400 및 300 mg/kg/day을 투여하는 2 군과 부형제만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였다</p>							
시험동물	종 류	Beagle dog			계 통	Canis familiaris	

	월 령	6~7개월령	동 물 수	수컷: 12 암컷: 12
시험방법	투여경로	경구투여		
	투여회수	반복투여(13주간 1일 1회)		
시험결과	사망동물	관찰기간 동안, 암수 대조군 및 300, 400 및 500 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았음.		
	일반증상	<p>일반증상으로는 유연(Salivation), 식욕부진(anorexia), 연변(Soft stool), 설사(Diarrhea)이 관찰되었다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 유연 300 mg/kg/day 투여군에서는 수컷 3 레에서 각각 14, 12 및 1 회가 관찰되었고, 암컷 3 레에서 각각 36, 62 및 13 회 관찰됨 400 mg/kg/day 투여군에서는 수컷 3 레에서 각각 29, 25 및 17 회가 관찰되었고, 암컷 3 레에서 각각 70, 20 및 63 회가 관찰됨 500 mg/kg/day 투여군에서는 수컷 3 레에서 각각 71, 23 및 41 회가 관찰되었고, 암컷 3 레에서 각각 55, 66 및 71 회가 관찰됨 • 식욕부진 300~500mg/kg/day 투여군 모두에서 증상을 보였으나, 빈도수의 개체차가 심하고, 암수 및 용량 상관성이 없어 시험물질 투여에 의한 변화는 아닌 것으로 판단된다. 300 mg/kg/day 투여군에서는 수컷 1레에서 25 회가 관찰되었고, 암컷 1 레에서 10 회가 관찰됨 400 mg/kg/day 투여군에서는 암컷 2 레에서 시험기간 동안 각각 23 및 35 회가 관찰됨 500 mg/kg/day 투여군에서는 수컷 1 레에서 4 회가 관찰되었고, 암컷 3레에서 각각 4, 1 및 28 회가 관찰됨 <p>연변 및 설사는 빈도수를 고려해 볼 때 시험물질 투여에 의한 변화는 아닌 것으로 판단된다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 연변 수컷에서는 부형제 대조군 1 레에서 1 회, 300 mg/kg/day 투여군 수컷 2 레에서 각각 1 회씩, 400 mg/kg/day 투여군 수컷 1 레에서 3 회, 500 mg/kg/day 투여군 수컷 1 레에서 2 회가 관찰되었고, 암컷의 경우 500 mg/kg/day 투여 1 레에서 1 회가 관찰됨 • 설사 500 mg/kg/day 투여군 암수 1레에서 1 회씩 관찰되었다. 		
	체중변화	시험기간 동안 시험물질 투여와 관련된 통계학적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았음		

사료 섭취량	시험기간 동안 시험물질 투여와 관련된 통계학적으로 유의한 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았음
안검사	시험물질의 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았음
심전도	시험물질 투여와 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았음
요검사	시험물질 투여와 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았음
혈액학적 검사	<ul style="list-style-type: none"> 투여 13 주째에 RBC 및 PLT가 300, 400 및 500 mg/kg/day 투여군 수컷에서 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가($P<0.05$)를 나타내었다. 그 외 항목에서 유의성있는 변화는 용량상관성 및 일관성이 없어 시험물질투여와 관련된 변화는 아닌 것으로 판단된다.
혈액응고시간 검사	투여 4 주째에 APTT가 500 mg/kg/day 투여군 수컷에서 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가($P<0.05$)를 나타내었지만, 투여 후 13 주 결과에서는 관찰되지 않은 일시적인 변화로서 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단 됨
혈액생화학 적 검사	<ul style="list-style-type: none"> 투여 13 주째에 ALT가 400 mg/kg/day 투여군 암컷 및 500 mg/kg/day 투여군 암수에서 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가($P<0.05$)를 나타냄. AST는 500 mg/kg/day 투여군의 암컷에서 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가($P<0.05$)를 나타내었음
장기중량	<ul style="list-style-type: none"> 좌측 신장의 상대장기중량이 400 및 500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 부형제 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가($P<0.05$)를 나타냄. 흉선의 절대장기중량이 500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 부형제대조군에 비해 통계적으로 유의한 감소가($P<0.05$)를 나타냄
부검	<ul style="list-style-type: none"> 500 mg/kg 투여군 암수(동물번호 3번 및 7번)에서 십이지장의 회색 변색(discoloration, gray)이 관찰됨 1,000 mg/kg 투여군 수컷(동물번호 4번)에서 십이지장의 국소성 백탁(white coating, focal), 1,000 mg/kg 투여군 암컷(동물번호 8번)에서 십이지장의 회색 및 적색 변색(discoloration, gray and red)이 관찰됨
조직병리학적 검사	<ul style="list-style-type: none"> 부검 시 육안소견으로 회색 또는 흑회색변색이 관찰된 400 및 500 mg/kg/day 투여군 수컷 및 300, 400 및 500 mg/kg/day 투여군 암컷의 십이지장 모두에서 점막상피에 갈색색소가 함유된 대식세포(brown pigment laden macrophage, mucosalepithelium)가 미미하게 관찰됨. 300 mg/kg/day 투여군 수컷 2 레(G2-4, 6번)의 십이지장에서도 동일한 소견이 관찰되었다. 그리고 400 및 500 mg/kg/day 투여군 수컷 및 300, 400 및 500 mg/kg/day 투여군 암컷 간에서 갈색 색소가 함유된 쿠퍼세포과다형성(hyperplasia, brown pigment laden kupffer cells)이 관찰됨

	<ul style="list-style-type: none"> • 수컷 500 mg/kg/day투여군 간에서 세포질 공포화(vacuolization, cytoplasmic)가 1 레(G4-10번) 관찰됨.
결론	<p>담팔수 50 % 에탄올 추출물을 Beagle dog에 13주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질투여와 관련된 변화는 유연, 십이지장에서 관찰된 회색 또는 흑회색 변색, 십이지장 점막상피에 갈색색소가 함유된 대식세포, 간의 갈색 색소가 함유된 쿠퍼세포 과다형성으로 판단된다. 하지만 이러한 변화는 독성학적 의미가 없는 것으로 판단되므로, 본 시험조건 하에서 담팔수 50 % 에탄올 추출물의 Beagle dog에 대한 무독성량(NOAEL: no observed adverse effect level)은 암수 모두 500 mg/kg/day로 판단된다.</p>

3) 유전독성 시험

가) 미생물복귀돌연변이시험

시험제목	1. 담팔수 50% 에탄올 추출물의 미생물복귀돌연변이시험		
시험책임자	김진식		
시험기관	한국건설생활환경시험연구원	자료요건	GLP
시험기간	2015년 3월 19일 ~ 2015년 4월 14일	시험번호	GT15-00023
시험목적	<p>시험물질 담팔수 50% 에탄올 추출물의 복귀돌연변이원성 유무를 히스티딘 요구성인 살모넬라균(<i>Salmonella typhimurium</i>)과 트립토판 요구성인 대장균(<i>Escheichia coli</i>)을 이용하여 검토함.</p>		
시험물질	담팔수 50% 에탄올 추출물	제조번호	150122
시험균주	균주	종류	
	히스티딘 요구성 균주 <i>Salmonella typhimurium</i>	TA98,, TA100, TA1535, TA1537	
	트립토판 요구성 균주 <i>Escherichia coli</i>	WP2uvrA	
시험내용	<p>본 시험은 시험물질(담팔수 50% 에탄올 추출물)에 대한 돌연변이 유발성 여부를 확인하기 위해 히스티딘 요구성 균주인 <i>Salmonella typhimurium</i> TA98,, TA100, TA1535, TA1537과 트립토판 요구성 균주인 <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA를 사용하여 직접법과 대사활성법으로 복귀돌연변이 시험을 실시함</p> <p>시험은 Preincubaion 방법을 이용하였으며, 농도결정시험을 바탕으로 직접법과 대사활성법에서 다음 농도를 적용하였다.</p> <p>S9 mix(-)의 경우 0, 62, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate</p> <p>S9 mix(+) 0, 62, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate</p> <p>본시험에서는 시험물질을 각 농도 별로 처리하여 대사활성계의 적용과 관계없이 음성대조군과 비교하여 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가를 관찰하였으며 이를 통해 시험물질(담팔수 50% 에탄올 추출물)이 복귀돌연변이를 유발하는 지 확인하였다.</p>		

[양성대조물질]

구분	대사활성화법에 의하지 않는 경우		대사활성화법에 의하는 경우	
균주명	양성대조물질	농도($\mu\text{g}/\text{plate}$)	양성대조물질	농도($\mu\text{g}/\text{plate}$)
TA100	AF-2	0.1	2-AA	1.0
TA1535	NaN_3	0.5	2-AA	2.0
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA1537	9-AA	80	2-AA	2.0
WP2uvrA	AF-2	0.01	2-AA	10

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

2-AA: 2-Aminoanthracene

NaN_3 : Sodium azide

[시험구성]

구분	사용 plate 수	농도단계	양성대조, 용매대조 사용 plate 수
직접법 (S9 mix(-))	3매	5단계 0, 62, 185, 556, 1667. 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$	3매
대사활성법 (S9 mix(+))	3매	5단계 0, 62, 185, 556, 1667. 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$	3매

시험결과의 판정

각 플레이트의 복귀돌연변이 콜로니 수에 대한 실측값과 평균값 및 표준편차를 표시한다. 결과의 판정은 대사활성제 존재 유·무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트 당 복귀된 집락 수에 있어서 농도 의존적이거나 하나 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 단, 음성대조군에 비해 2배 이상 명확히 증가함을 보여야 한다.

[판정범위]

대사활성 효소의 유무	시험물질 농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	복귀돌연변이수(colony수/plate)					
		염기치환형			frameshift 형		
		TA 100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 Mix(-)	음성대조	60-211	3-40	10-70	7-60	2-20	
S9 Mix(+)	음성대조	80-216	3-40	10-70	10-80	2-30	
양성대조	S9Mix 명칭	AF-2	NaN_3	AF-2	AF-2	9-AA	
	를 필요하지 않는 경우	농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	colony수/plate	300-1219	100-1000	100-500	150-700	80-5000	
S9Mix 명칭	($\mu\text{g}/\text{plate}$)	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	

		필요로 하는 경우	농도 ($\mu\text{g}/\text{plate}$) colony수/ plate	1.0 300-2000	2.0 95-586	10 230-3000	0.5 150-1000	2.0 100-500
시험결과	<p>히스티딘 요구성 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537과 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA를 이용하여 대사활성법과 직접법으로 시험물질의 돌연변이 유발성을 확인한 결과 다음과 같았다.</p> <p>TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA 시험물질(담팔수 50% 에탄올 추출물)의 시험결과, 대사활성계 적용유무과 관계없이 모든 균주에서 음성대조군과 비교하여 양성으로 판단할 만한 복귀집락수의 증가를 관찰할 수 없었다.</p>							
결 론	<p>본 시험조건에서 시험물질 담팔수 50% 에탄올 추출물의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단되었다.</p>							
나) 염색체이상시험								
시험제목	2. 포유류 배양세포를 이용한 담팔수 50% 에탄올 추출물의 염색체이상시험							
시험책임자	김진식							
시험기관	한국건설생활환경시험연구원				자료요건		GLP	
시험기간	2015년 3월 19일 ~ 2015년 4월 17일				시험번호		GT15-00024)	
시험목적	<p>시험물질 담팔수 50% 에탄올 추출물의 염색체이상 유발성의 유무를 Chinese hamster 배양세포 CHO-k1을 이용하여 확인한다</p>							
시험물질	담팔수 50% 에탄올 추출물				제조번호		150122	
시험계	Chinese Hamster (CHO-k1) 배양세포							
시험내용	<p>담팔수 50% 에탄올 추출물의 유전독성을 평가하기 위하여 Chinese hamster 유래의 난소유아세포 (CHO-k1 cell)를 이용하여 대사활성효소계 (S9)를 적용한 대사활성화법 (+S9 mix) 및 적용하지 않은 직접법 (-S9 mix)에서 염색체이상시험을 실시하였다. 시험물질은 멸균증류수에 분산시킨 후 희석하여 조제하였다.</p> <p>본시험의 시험물질 처리농도를 결정하기 위해 세포증식억제시험을 수행한 다음 본시험을 위한 시험물질 최고처리농도를 결정하여 공비 3의 3 단계 농도군으로 다음과 같이 정하였다.</p> <p>직접법 (-S9 mix, 24 시간 연속처리군) : 21, 62, 185 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 직접법 (-S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복군) : 21, 62, 185 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 대사활성법 (+S9 mix, 6 시간 처리 18 시간 회복군) : 62, 185, 556 $\mu\text{g}/\text{ml}$</p>							
양성대조물질	I 직접법				II 대사활성법			

	명칭	Mitomycin C(MMC)	Cyclophosphamide·H2O(CPA)
	적용농도	0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
시험결과	<p>본시험을 통해 이상중기상 (aberrant metaphase, gap-)의 빈도를 분석한 결과, 직접법의 24 시간 연속처리군에서는 음성대조군, 21, 62, 185 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도단계에서 각각 0.5, 0.5, 1.0, 1.5의 빈도를 나타내었으며, 음성대조군과 이상중기상의 빈도를 비교하였을 때 시험물질을 처리한 모든 농도단계에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다.</p> <ul style="list-style-type: none"> 직접법의 6 시간 처리 18 시간 회복군에서는 음성대조군, 21, 62, 185 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 단계에서 각각 0.5, 1.5, 1.0, 2.0의 빈도를 나타내었으며, 음성대조군과 이상중기상의 빈도를 비교하였을 때 시험물질을 처리한 모든 농도단계에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다. 대사활성화법의 6 시간 처리 18 시간 회복군에서는 음성대조군, 62, 185, 556 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도단계에서 각각 1.0, 1.0, 1.5, 0.0의 빈도를 나타내었으며, 음성대조군과 이상중기상의 빈도를 비교하였을 때 시험물질을 처리한 모든 농도단계에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 없었다. 직접법 및 대사활성법에 있어서 배수성(PP) 및 핵내배화(ER)의 빈도 또한 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 		
결론	이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 담팔수 50% 추출물은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.		

다) 소핵시험

시험제목	3. ICR 마우스 골수세포를 이용한 담팔수 50 % 에탄올추출물의 소핵시험							
시험책임자	김진식							
시험기관	한국건설생활환경시험연구원				자료요건	GLP		
시험기간	2015년 4월 8일 ~ 2015년 4월 16일				시험번호	GT15-00025		
시험목적	시험물질 담팔수 50 % 에탄올 추출물을 경구 투여하였을 때 ICR 마우스 골수의 다염성 적혈구에 대한 소핵의 유발성을 알아보고자 수행한다.							
시험물질	담팔수 50 % 에탄올추출물				제조번호	150122		
시험동물	종류	SPF 마우스			계통	CrjOri:CD1(ICR)		
	주령	8주령			동물수	수컷 33마리		
시험방법	투여경로	경구투여						
	투여회수	1회/일, 2일 투여			투여액량	10 mL/kg		
시험내용	군		성별	동물수	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (m/kg)	투여 횟수	투여경로
	G1 (V.C)	음성대조군	M	6	0	10	2	경구
	G2	저용량군	M	6	500	10	2	경구

	G3	중용량군	M	6	1,000	10	2	경구
	G4	고용량군	M	6	2,000	10	2	경구
	G5 (P.C)	양성대조군	M	6	2	10	2	복강내
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ G1: 음성대조군(주사용수) ▪ G2-G4: 시험물질 투여군 ▪ G5: 양성대조군(Mitomycin C (MMC)) 							
	<p>본 시험의 용량을 결정하기 위하여 용량설정시험을 실시하였다. 예비시험의 결과로, 최고용량은 2,000 mg/kg으로 하고, 이하 1,000 및 500mg/kg의 3용량을 설정하였다. 용량설정시험의 결과, 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 본시험의 최고용량은 2,000 mg/kg으로 하고, 이하 공비 2로 2용량(1,000 및 500 mg/kg)의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.</p>							
	<p>아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다. PCE/(PCE+NCE) 비율(Mean±SD)이 부형제 대조군(또는 용매 대조군)의 20 %이상인 경우 시험이 타당한 것으로 하고, 소핵 유발빈도(MNPCE/2000 PCEs, Mean±SD, %)가 통계학적으로 유의하며, 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정하였다.</p>							
	<p>통계처리 결과 $p < 0.05$인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.</p>							
시험결과	일반증상	용매대조군과 비교하여 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다.						
	체중변화	각 군의 투여후의 체중을 비교한 결과 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.						
	소핵유발 출현빈도	<p>개체 당 약 2000 개의 PCE에서 관찰된 MNPCE의 유발빈도는 용매대조군, 500, 1000, 2000 mg/kg 및 양성대조군의 순으로 평균 0.29 %, 0.29 %, 0.27 %, 0.30 % 및 9.34 %를 나타내었다. 즉 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 용매대조군에 비해 모든 투여군에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 양성대조군인 Mitomycin C 투여군의 소핵유발빈도는 용매대조군에 비해 통계적으로 유의성을 나타내었다($p < 0.01$).</p> <p>세포독성의 지표인 개체 당 약 200 개의 전적혈구(PCE+NCE)에서 관찰된 다염성적혈구(PCE)의 비율은 용매대조군, 500, 1000, 2000 mg/kg 및 양성대조군의 순으로 평균 0.35, 0.39, 0.45, 0.41 및 0.35로 시험물질 투여군에서 용매대조군과 비교하여 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았다.</p>						
	시험의 성립	음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 historical control data의 정상범위에 있었기 때문에 본 시험은 적절한 시험조건 하에서 실시된 것으로 판단하였다.						

결론	이상의 결과로부터 시험물질 담팔수 50% 에탄올 추출물은 본시험 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.
-----------	--

나. 임상시험 계획

1) 임상시험을 위한 자료 수집 및 프로토콜 작성

가) 본 연구개발 자료 및 임상연구 고찰을 통한 프로토콜 작성

나) 임상시험 CRO : 본 연구개발 과제의 협동기관 메콕스큐어메드(주) 주관

2) 임상시험 계획서

가) 목적

- 대상포진 환자에서 ES16001에 의한 통증 치료효과와 용량 반응성 및 안전성을 탐색적으로 평가하기 위한 28일간의 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 임상시험

나) 임상시험 요약

Study Title	대상포진 환자에서 ES16001에 의한 통증 치료효과와 용량 반응성 및 안전성을 탐색적으로 평가하기 위한 28일간의 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 임상시험
Study Code	GNC_PT2_2016001
Phase	임상2상
임상시험 실시 기관/국가	단일 기관/ 대한민국
예상 임상시험 기간 (FPFV-LPLV)	첫 환자의 최초 방문일(FPFV) 기준으로 약16개월
연구목적	<p>대상포진의 치료제 개발을 위해, 본 개발사의 선행연구에서 담팔수에탄올 추출물을 이용하여 대상포진(herpes zoster: HZ)의 원인바이러스인 수두 바이러스(varicella-zoster virus: VZV)대한 In vitro 시험을 통해ZVZ 억제 효능을 확인하였고, In vivo 시험으로HSV-1에 감염된 누드마우스모델에서 담팔수50%에탄올추출물의 항바이러스 억제 효능을 확인하였다. 본 연구에서는 선행 연구를 근거로, 대상포진 환자를 대상으로 ES16001을 투여 시 항바이러스 억제효능에 의한 통증 억제 효과를 관찰하고자 함이 본 연구의 목적이다.</p> <p>일차 목적</p> <p>임상시험용의약품을 투여 후 7일째에 측정된 지난 일주일간의 11단계 통증 척도(Numerical Rating Scale)에 의한 기저치 대비 통증 점수의 평균 변화량 비교 평가하는 것이다.</p> <p>이차 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 임상시험용의약품을 14일간 복용 후 통증 척도(Numerical Rating Scale)에 의한 기저치 대비 지난 14일 동안의 평균 변화량을 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 통증 척도(Numerical Rating Scale)에 의한 7일째 및 14일째에 측정된 평균 통증 점수를 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 수면 장애 척도에 의한 지난 7일째 및 14일째에 기저치 대비 평균 변화량을 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 SF-MPQ의Visual Analogue Scale (VAS)에 의한 지난 7일째 및 14일째에 기저치 대비 평균 변화량을

	<p>각 군간 비교 한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 임상시험용의약품을 복용 후 SF-MPQ의 sensory에 의한 지난 7일째 및 14일째에 기저치 대비 평균 변화량을 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 SF-MPQ의 affective에 의한 지난 7일째 및 14일째에 기저치 대비 평균 변화량을 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 SF-MPQ의 PPI에 의한 지난 7일째 및 14일째에 기저치 대비 평균 변화량을 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 SF-MPQ에 의한 지난 7일째 및 14일째에 기저치 대비 평균 변화량을 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 EQ-5D Index에 의한 지난 7일째 및 14일째에 기저치 대비 평균 변화량을 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 POMS-BRIEF에 의한 지난 7일째 및 14일째에 기저치 대비 평균 변화량을 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험용의약품을 복용 후 대상자가 직접 평가한 Patients' Global Impression of Change 에서 통증이 개선된 것으로 평가된 최초 기간 및 개선점수를 각 군간 비교 한다. ■ 임상시험기간 동안 구제약물의 평균 사용 일수, 사용 빈도(%) 및 하루 평균 사용량(총 사용량/총 사용 일수), 임상시험 참여기간 중 평균 사용량(총 사용량/임상시험 참여 기간)에 대해 각 군간 비교 한다. ■ 지급된 임상시험약품의 순응도를 각 군간 비교한다.
<p>참여 시험대상자수 및 산 출근거</p>	<p>총 128명(군당32명)</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Δ(시험약-대조약 차이): 0.8 ■ 표준편차(s): 1.0 ■ 유의수준(a): 0.05, 양측검정(Za/ ■ 검정력(b): 80% ■ 군간 배정비율: 1:1:1:1 n = 25 <p>로 할 때 최종연구대상자는 각 군별로 시험1군25명, 시험2군25명, 위약대조군25명으로 총75명이 필요하며, 20%의 중도 탈락률을 고려하면 각 군은32명으로 본 임상시험에 필요한 대상자4군으로서 총 128명이 된다.</p>
<p>시험약/위약 정보</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ ES16001 40mg 필름코팅정 ■ ES16001 80mg 필름코팅정 ■ ES16001 160mg 필름코팅정 ■ 시험약의 위약, 필름코팅정
<p>선정기준</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 만20세 이상80세 이하의 남녀 1. 발진이 후72시간 이내에 임상시험 참여(첫 투약이)가 가능한 자 2. 피부발진이편측(unilateral dermatomal rash)으로 확인된 자 3. 무작위 배정 방편에서 측정된SF-MPQ (short-form McGill Pain Questionnaire) 상VAS ³40mm 인 경우 4. 임상시험 기간 동안 피임 계획에 동의한 자 5. 본 임상 시험을 위한 방문이 가능한 자 6. 의사소통이 가능하고 설문지 등의 질문을 이해할 수 있는 자. 7. 자발적으로 서면 동의를 한 자
<p>제외기준</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 임신계획자, 임산부, 수유부 ■ 스크리닝 전3개월 이내에 알코올 및 기타 약물 남용 기왕력자 ■ 스크리닝 전3개월 이내에 통증 감각에 영향을 미칠 수 있는 항정신성 의약품, 마약성 진통제를 의존적으로 투약한 경험이 있는 경우 ■ 스크린 전4주 이내 아래 성분의 약물을 복용 중인 자 -HIV-1 protease :atazanavir, indinavir, nelfinavir, saquinavir, ritonavir etc. -CYP3A4 inhibitors: clarithromycin, itraconazole, ketoconazole, nefazodone, telithromycin etc. -CYP3A4 inducers: rifampin, efavirenz, etravirine, phenobarbital,

	<p>phenytoin, carbamazepine etc.</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 대상포진에 대한 예방 접종을 받은 자. ■ 임상시험용 의약품 또는 임상시험용 의약품 성분에 대한 과민증 환자 또는 기왕력이 있는 자 ■ 연구자의 판단으로 임상 결과에 영향을 줄 수 있는 의약품 또는 건강 기능식품 등을 복용하고 있거나 계획중인 자(eg: 캡사이신이 함유된 외용제 등). ■ 아래의 이유로 면역이 저하된 환자 ■ 질병(e.g., 스크리닝 전5년내 악성 종양 진단을 받은 자(단, 스크리닝 기준3년 이전에 완전 관해된 환자는 제외), HIV 환자) ■ 스크리닝3개월 전 면역억제제(항암제 투여 또는 장기이식을 위함)투여한 자 ■ 스크리닝30일 전에 비스테로이드 항염증제(Non-steroidal anti-inflammatory), 스테로이드성 항염증제 또는 면역억제제 의약품을 복용한 자 또는 임상 참여 중 복용을 계획중인 자. ■ 삼환계항우울제(tricyclic antidepressant, TCA)의 의약품을 복용하고 있는 자 ■ 소화기계 이상으로 본 연구 결과에 영향을 줄 수 있다고 판단되는 자. ■ 임상 시험 평가 수행이 어려울 것으로 판단되는 정신병 또는 기타 중추신경계 질환 ■ 신경병증 등으로 신경감각에 이상이 있다고 연구자가 판단하는 자. ■ 신장애(creatinine clearance < 50 cc/min) 또는 투석이 필요한 환자 ■ 혈중Alanine aminotransferase (ALT)가5xUNL 초과된 자 ■ 혈중Aspartate aminotransferase (AST) 가5xUNL 초과된 자 ■ 간장애: Child-Pugh class C 인 자 ■ 만성B, C 형 감염
<p>용량 및 투여 경로, 용법</p>	<p>아래와 같이 시험약 또는 위약을1일1회, 1회1정을14일 경구투여 한다.</p> <p>시험 1군 1정당 ES16001 40mg 용량 군으로서: 1일 1회, 1회 1정을14일간 경구 투여 한다</p> <p>시험 2군 1정당 ES16001 80mg 용량 군으로서: 1일 1회, 1회 1정을14일간 경구 투여 한다</p> <p>시험 3군 정당 ES16001 160mg 용량 군으로서: 1일 1회, 1회 1정을14일간 경구 투여 한다</p> <p>시험 4군(위약 대조군) 1일 1회, 1회 1정을14일간 경구 투여 한다</p>
<p>시험방법</p>	<p>본 임상시험은 대상포진환자에게서 ES16001를 투여 후 7일째에 11단계 통증 척도(Numerical Rating Scale)에 의한 경구 투여 후 기저치 대비 지난7일 동안의 평균 변화량을 주평가 변수로하는 무작위 배정 (randomized), 이중 눈가림(double blinded), 위약 대조 (Placebo-controlled), 용량반응성 (dose response)의3개 시험군 및 1개 위약대조군을 포함한 4군 평행(Four arm parallel), 단일기관(Single-center)의 임상2상 임상시험이다.</p>
<p>대상자 당 계획된 임상시험 기간</p>	<p>총 28일</p>
<p>유효성 평가</p>	<p>1차 유효성 평가변수 11단계 통증 척도(Numerical Rating Scale)에 의한 경구 투여 후 기저치 대비 지난 7일 동안의 평균 변화량 2차 유효성 평가변수</p>

	<p>■11단계 통증 척도(Numerical Rating Scale)에 의한 기저치 대비 지난14일 동안의 평균 변화량</p> <p>8. 11단계 통증 척도(Numerical Rating Scale)에 의한 7일째 및 14일째 측정된 평균 통증 점수</p> <p>9. 수면 장애 척도에 의한7일째 및14일째 기저치 대비 평균 변화량</p> <p>10. SF-MPQ의Visual Analogue Scale (VAS)에 의한 7일째 및14일째 기저치 대비 평균 변화량</p> <p>11. SF-MPQ의 sensory에 의한 7일째 및14일째 기저치 대비 평균 변화량</p> <p>12. SF-MPQ의affective에 의한 7일째 및14일째 기저치 대비 평균 변화량</p> <p>13. SF-MPQ의PPI에 의한 7일째 및14일째 기저치 대비 평균 변화량</p> <p>14. SF-MPQ에 의한 7일째 및14일째 기저치 대비 평균 변화량</p> <p>15. EQ-5D Index에 의한 7일째 및14일째 기저치 대비 평균 변화량</p> <p>16. POMS-BRIEF에 의한 7일째 및14일째 기저치 대비 평균 변화량</p> <p>17. 경구 투여 후대상자가 평가한Patients' Global Impression of Change에서 통증이 개선된 것으로 평가된 최초 기간 및 개선 점수 비교.</p> <p>18. 구제약 약물의 평균 사용 일수, 사용 빈도(%) 및 하루 평균 사용량(총 사용량/총 사용 일수), 임상시험 참여기간 중 평균 사용량(총 사용량/임상시험 참여 기간)</p> <p>19. 치료 기간 14일 동안의 임상시험약품의 투여 순응도</p>
안전성 평가	<p>활력징후, 실험실적 검사, 이상반응, 12-lead 심전도</p>
통계 분석	<p>분석의 정의</p> <p>유효성 평가군의 분석은 아래와 같이 정의한다.</p> <p>본 연구는ITT set 과PP set 모두에 유효성 분석을 실시하되, PP set 을 주 분석으로 한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> -ITT set: 무작위 배정을 받은 모든 대상자. -PP set: ITT set 대상자 중 임상용약품을 투여하지 않거나 한번도 유효성 평가가 수행되지 않은 대상자를 제외한 집단 중 임상시험 종료 후 중대한 위반사항(선정 및 제외기준 위반, 순응도 위반)이 없는 대상자 집단. <p>통계 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> -본 임상시험은 시험군 대비 대조군의 우위성을 검정하기 위한 임상시험이다. -임상시험 중 결측치가 발생한 경우 LOCF를 이용하여 분석을 실시한다. <p>■ 유효성 평가</p> <p>유효성 평가지표에 대한 분석 시, 본 연구에서 관찰된 모든 점수들은 기저치 대비 변화량 또는 평균값을 산출하여 ANOVA를 이용하여 통계적 유의성이 있는지 검정한다.필요 시 각 군간 시점 별 자료들을 함께 고려하여 분석할 때에는 repeated measured ANOVA로 검정한다</p> <p>주평가 변수를 포함한 모든 통계분석은 유의수준(α) 0.05로 하여 양측검정(Two-sided)을 원칙적으로 하여 실시한다. 단, 교호작용에 의한 유의성을 평가할 때는 유의수준 0.10을 적용하기로 한다.</p> <p>주평가 변수를 평가할 때는 군간 11단계 통증 척도(Numerical Rating Scale)의 경구 투여 후 지난 일주일간의 통증 평균 변화량의 차이를 95% 신뢰구간을 이용한 양측검정, 즉 유의 수준 0.05의 양측검정으로 한다.</p> <p>■ 안전성 평가</p> <p>1) 이상반응</p>

시험기간 동안 보고된 모든 이상반응을 도표화한 후 이상반응의 발현율을 구한다. 각 군간 이상반응이 발생한 대상자의 비율을 계산하고 Chi-square test 또는 Fisher's Exact test를 이용하여 비교한다.

20. 임상병리검사 결과

각 실험 결과값 중 연속형 자료에 대해서는 기저치 대비 관찰된 결과값에 대해 군 내에서는 paired t-test 또는 반복측정 자료 분석을 사용하며, 군간 비교를 위해서는 t-test 또는 ANOVA로 분석한다.

정상범위를 벗어난 임상실험실 검사 값에 대해서는 대상자에 대한 수와 비율을 군별로 산출하고, Chi-square test 또는 Fisher's Exact test를 이용하여 비교한다.

21. 신체검사 및 활력징후 검사 결과

- 신체검사

기저치 대비 임상시험의약품 복용 종료 후 측정된 신체검진 결과를 비교하여 변화율을 빈도 및 백분율로 요약하여 제시하고, Chi-square test 또는 Fisher's Exact test를 이용하여 군간 차이를 비교한다.

- 활력징후

기저치 대비 임상시험의약품 복용 종료 후 변화가 있는지 관찰된 결과를 산출하고, 군간 변화량에 차이가 있는지 ANOVA 이용하여 분석한다. 또한, 투여 전(스크리닝) 대비 시험약 복용 종료 시 군내 변화량에 차이가 있는지 paired t-test를 이용하여 분석한다.

제10절 연구개발 성과

가. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 연구 활용(타 연구 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
										SCI	비SCI						
최종목표	2	2	1	1					10	4				1	1	2	
1차년도	목표									1							
	실적	1							1	1	1		2			1	
2차년도	목표	1							2	1							
	실적								7				11				
3차년도	목표	1							2	1							
	실적	1							4	1			1				
4차년도	목표		1						3	1						1	
	실적		1						2		3		3			1	
5차년도	목표		1	1	1				3					1	1	1	
	실적		1	1	1			2	2		1		4			1	
소계	목표	2	2	1	1				10	4				1	1	2	
	실적	2	1	1	1			2	15	2	5	1	22	1	1	2	
중료 1차년도				1									1	1	1	1	

종료 2차년도																	
종료 3차년도																	
종료 4차년도																	
종료 5차년도																	
소 계				1								1	1	1	1	1	1
합 계	2	1	1	2				2			1	5	1	22	1	1	4

나. 지식재산권

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
특허	KSHV 잠복성 복제 검출용 프라이머 및 이를 이용한 KSHV 잠복성 복제 검출 방법	대한민국	동국대학교 산학협력단	2012.03.30	10-2012-0033134	동국대학교 산학협력단	2014.04.28.	10-1392137-0000	
특허	담팔수 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 알파게열 허피스 바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2016.09.09	10-2016-0116611				

다. 논문게재 및 학술회의 발표

1) 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Human papillomavirus type 16 E6 protein inhibits DNA fragmentation via interaction with DNA fragmentation factor 40	cancer letters	종재은, 전기완	324	미국	ELSEVIER	SCI
2	Alteration of histone H3 Lysine 4 Trimethylation on putative lytic gene promoters by human set1 complex during reactivation of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	Intervirology	종재은	10	프랑스	KARGER	SCI

3	Porphyromonas gingivalis-derived lipopolysaccharide-mediated activation of MAPK signaling regulates inflammatory response and differentiation in human periodontal ligament fibroblasts	The journal of Microbiology	서태근, 차세호	50	대한민국		SCI
4	viral interferon regulatory factor 1 of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with a translocation liposarcoma protein-associated serine-arginine protein	Osong public health resw perspect	김선미	3	대한민국	ELSEVIER	비SCI
5	Lupeol is one of active components in the extract of chrysanthemum indicum linne that inhibits LMP1-induced NF-kB activation	PLOSone	강세찬, 임수연	8	미국		SCI
6	development of animal experimental periodontitis	Journal of periodontal and implant science	도민재	43	대한민국		비SCI
7	Antiviral activity of angelicin against gammaherpesviruses	Antibiral Research	조혜경	100	네덜란드	ELSEVIER	SCI
8	Viral genome maintenance and latent replication of human gammaherpesviruses	Future virology	차세호	8	영국		SCI
9	Analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication using a real-time polymerase chain reacton techinque	Journal of virological methods	차세호	193	네덜란드	ELSEVIER	SCI
10	The extract of Elaeocarpus sylvestris inhibits human cytomegalovirus immediate early gene expression and replication in vitro	Molecular medicine reports	Kim phoung to	9	그리스		SCI
11	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF36 protein induces chromosome condensation and phosphorylation of histone H3	Acta virologica	김선미, 차세호	57	슬로바키아		SCI

12	deinococcus soli sp.nov., a gamma radiation resistant bacterium isolated from rice field soil	Curr microbiol	차세호	68	미국		SCI
13	deinococcus radiotolerans sp.nov., a gamma-radiation resistant bacterium isolated from gamma ray-irradiated soil	Actonie van leewenhoek	차세호	105	네덜란드	springer	SCI
14	Acetylation changes at lysine 5 of histone H4 associated with lytic gene promoters during reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	Acta cirologica	황이랑	58	슬로바키아		SCI
15	The extract of Tamarindus indica L. suppresses IKKb activity and NF-kB dependent lymphoblastoid cell line survival	Molecular cellular toxicology	임수연	9	대한민국	springer	SCI
16	Characterization of the rapamycin-inducible EBV LMP1 activation	Journal of microbiology	김상용	53	대한민국		SCI
17	Effects of compounds isolated from a Litsea japonica fruit extract on the TNF-a signaling pathway and cell viability	Molecular cellular toxicology	원지연	12	대한민국	springer	SCI

2) 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	37th annual herpesvirus workshop	김정은	2012.08.04	calgary telus convention center	Canada
2	2015년도 한국자원식물학회 춘계학술대회	송해성	2015.04.24	안동대학교	한국
3	Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Conference 2015	원지연	2015.8.1.	International Medical University	Kuala Lumpur, Malaysia
4	2015년도 대한바이러스학회 연구회연합 정기학술대회	배소희	2015.8.29.	강원도 양양을지인력개발원	한국
5	2016년도 한국자원식물학회 춘계학술대회	권정은	2016.04.28	상효수목원	한국

라. 기술이전 성과

번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
1	소유권 이전 (양도)	국내 식물자원을 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재	(주)제넨셀	2016. 12. 26	선급기술료 5억원 / 경상기술료 순매출액의 3%

기술이전 계약서

경희대학교산학협력단(주소: 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 이하 "갑"이라 함)과 주식회사 제넨셀(주소: 경기도 용인시 기흥구 영덕동 1029 유타워 213 호, 이하 "을"이라 함)은 "갑"이 소유하는 제 1 조의 특허(특허출원을 포함한다. 이하 "'계약특허'들"이라 함) 및 관련 기술에 관하여 다음과 같이 계약을 체결한다.

제 1 조 (용어의 정의) 본 계약서에서 사용되는 다음 각 호에 기재되어 있는 용어는, 다른 특별한 언급이 없는 한, 각각 다음의 의미를 갖는다.

- "계약특허"란 아래에 기재된 특허(우선권 주장 및 개별국 특허출원을 포함한다)를 의미한다.

번호	국가	출원번호 (출원일)	등록번호 (등록일)	발명의 명칭
1	KR	10-2016-0116611 (2016.09.09)	-	담팔수 추출물 및 이로부터 분리된 성분을 포함하는 허피스바이러스 억제 및 대상포진 치료 약학적 조성물

- "계약기술"이라 함은 "갑"의 피용자인 기술발명자가 보유하고 있는 아래 및 [별첨 1]에 개시된 기술 및 기술의 실시예에 필요한 관련 노하우(Know-How)를 말한다.
 - 기술의 명칭: 국내 식물자원 활용 만성감염 허피스 바이러스 치료소재
 - 기술발명자: 경희대학교 생명과학대학 강 세 찬 교수
 - 계약기술 관련 연구과제: 20160395 (지원기관: 농림수산식품기술기획평가원, 311063055SB010)
- "계약제품"이라 함은 "계약특허" 또는 "계약기술"을 실시하여 생산되는 모든

1 / 11

마. 교육 및 지도활용 내역(컨설팅)
: IND 승인을 위한 컨설팅 진행 (메디팁)

바. 사업화

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	코드번호		매출 발생년도	기술 수명
							C-06-10			
							매출액			
국내	국외									
	기술이전-상 품화	상품화	국내	담팔수추 추출물	담팔수추 추출물	(주)제넨 셀	10,000 ,000		2016	

사. 기술 및 제품 인증
: 해당사항 없음

아. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
	인력양성	2011~2016	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			1	13	8		8	14	22				

자. 정책활용 내역
: 산업자원통상자원부 한국건설생활환경시험연구원 이진규 박사에게 천연물신약개발에 대한 ODA 사업에의 정책반영 요청

차. 홍보/전시

(1) 홍보실적
: 영국 런던 / WGP Global _ 대상포진치료소재 홍보

카. 기타

- (1) 국제화 협력성과
: 해당사항 없음
- (2) 타 연구개발사업에의 활용
: 산업자원통상부 / 선학초로부터 C형간염 치료제 개발 / 2015.12.1.~2019.4.30.
- (3) 포상 및 수상 실적
: 해당사항 없음
- (4) 기타활용 (동향/연구보고서)
: 미래농업 신소재로서 자생식물 자원 활용방안 심포지엄_국립농업과학원
- (5) 기술 인증
: GLP기관으로부터 추출물의 안전성 인증 (유전독성, 안전성 완료 증빙제출)
: IND 승인 진행중 (접수증 제출)

마. 사업화 성과 및 매출실적

1) 사업화 성과

: 사업화 과제가 아니므로 해당없음

2) 사업화 계획 및 매출실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2~3			
	소요예산(백만원)	2,000			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	50	300	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	5	30
국외		-	1	5	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	면역증진 건강기능식품 및 기능성 화장품			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	50	300	
	수 출	-	-	100	

바. 연구개발 성과 세부내용

1) 기술적 성과

가) 항바이러스 활성 검출 시스템 구축

- 본 연구개발 과제를 통하여 본 연구팀은 HSV, HCMV, EBV 복제 및 재활성화 검출 시스템을 구축
- 향후 이러한 시스템 개발은 신규의 항바이러스제 개발에 이용될 수 있음

나) 항바이러스제 신약 개발을 위한 가이드라인 제공

- 본 연구팀은 연구개발 과제를 통하여 항바이러스 효능을 나타내는 물질 선별, 후보 물질의 효능평가 방법, 유효성분 규명 및 지표성분 설정, 원료 표준화, 제제/제형 개발, 전임상 안전성 평가 등의 연구를 수행하였으며, 이는 향후 신규 항바이러스 개발에 가이드라인으로 제공할 수 있음

2) 경제적 성과

가) 단일제로써 천연물 신약 개발에 대한 의의

- 현재 의약시장에서의 천연물의약품의 연간 판매액은 400억 US \$에, 매년 평균 15% 이상의 성장률로 발전하고 있는 것으로 그 경제성과 성장가치는 급격하게 상승하고 있음
- 통계 가능한 국내 천연물 시장의 살펴보면 천연물의약품은 약 4,000억원, 천연물공산품 5,000억원 등을 포함하여 건강과 관련된 천연물 소재 시장은 10조원을 상회할 것으로 추산되고 있음
- 2013년 의약품 통계를 집계하는 유비스트 자료에 따르면, 동아ST의 스티렌은 600억원 이상, 안국약품 시네츄라시럽 300억원 이상, 동아ST 모티리톤 180억원 이상, SK케미칼 조인스정 364억원 이상, 녹십자 신바로 67억원 이상, 한국피엠지제약 레일라

정 52억원 이상의 처방 실적을 보였으며, 스티렌과 조인스정의 경우 시장에서 성공적인 천연물신약 제품화 사례를 꼽히고 있음

- 그러나, 대부분 여러 가지 원료들을 혼합한 혼합제로써 안전성은 확보되어 있으나, 의약품으로써 가져야 할 기능성이 부족하다 할 수 있음
- 본 연구개발 과제에서 개발된 원료는 단일제제로써, 국내 원료 기반의 천연물 신약에 해당되며, 제품개발 시 3년안에 1,000억 원 이상의 가치로 평가될 수 있음

Acyclovir series 시장 규모

대상포진+수두치료제	2017	2018	2019	2020
진료환자수(명)	775,974	796,050	816,645	837,773
일평균 약가(원/일)	11,618	11,618	11,618	11,618
일인당 평균급여일수 약가	198,089	205,020	212,193	219,617
시장규모(억원)	1,537	1,632	1,733	1,840
단순헤르페스 치료제	2017	2018	2019	2020
진료환자수(명)	800,550	929,761	981,722	1,036,587
일평균 약가(원/일)	11,618	11,618	11,618	11,618
일인당 평균급여일수 약가	85,606	86,824	88,058	89,310
시장규모(억원)	754	807	864	926
합 계 (억원)	2,291	2,439	2,597	2,766

* 2017년 2,291억원으로 파악되며, 2020년 2,766억원으로 파악됨

* 본 수치는 연도별 병원진료환자수 및 대상포진환자 등의 평균급여일수에 일평균 약가를 적용하여 계산한 수치임

나) 본 기술의 경제적/산업적 파급효과

- 해당 기술이전 한 담팔수 50% 주정추출물 (50% 에탄올 건조엑스)의 우수성 입증

경희대학교 - ㈜제넨셀	기업명	Various company
GNL-NM-001	제품명	아시클로버(Acyclovir)
천연물 추출물에 의한 항바이러스 활성	기술명	acyclic guanosine analogue에 의한 항바이러스 활성
천연물 기반의 항바이러스 활성 추출물	원천기술	acyclic guanosine analogue
단순헤르페스바이러스 1형, 2형과 varicella-zoster 바이러스 및 cytomegalovirus 복제를 선택적으로 억제	치료효능	단순헤르페스바이러스 1형, 2형과 varicella-zoster 바이러스 및 Epstein-Barr 바이러스 등 헤르페스바이러스의 복제를 선택적으로 억제하나 cytomegalovirus 감염에는 효과가 적음
바이러스 DNA 복제 억제, 숙주세포 autophagosome 축진을 통한 virus 유입/사멸	작용기전	바이러스의 polymerase와 DNA 복제 억제
7일 이내이나, 안전성이 높아 최대 4주 가능	치료기간	최대 7일, 심한 환자의 경우 14일까지 투여 허용
전임상 안전성평가 결과 부작용이 거의 없음 - 랫드에서 3,000 mg/kg 이상 - 비글견에서 500 mg/kg 이상	장단점	급성신부전, 간장애, 위염, 관절통, 배뇨장애 등 부작용 발생 가능 약리 지속 시간이 짧음

- 이에 대한 수입의약품 대체는 물론 제네릭 위주의 의약품에서 신약도출이 가능해졌으며, 해당 소재를 이용한 타제품 개발, 원료의 공급을 통한 연구활성화 등이 가능함
- 해당 기술은 (주)제넨셀에 기술이전을 완료하였으며, 국내 글로벌 제약회사의 유통망을 활용하기 위해 현재 중외제약과 CDA를 맺고 위탁판매 등의 조건으로 협상예정임
- 또한, 해당 기술의 해외 홍보 (영국 런던 / WGP Global _ 대상포진치료소재 홍보)를 통하여 영국 IPO 등과의 투자유치를 통해 해당 기술의 수출이 가능함

Partnership Letter



- 미국, 영국, 일본을 비롯한 해외 제약사 및 대학으로 표준원료 무상공급
 - 대상포진을 비롯한 다양한 학술적 성과 및 산업적 성과기대

나) 국내 신규의 항바이러스제 개발

- 2015년 세계보건기구(WHO)가 전 세계 37억 인구가 허피스 바이러스에 감염됐다는 보고서를 공개해, 질환에 대한 경각심이 부각됨
- 현재로서는 항바이러스제로 바이러스 관련 증상을 억제하는 정도까지만 치료가 가능하며, 국내에서는 아직 개발된 사례가 없으므로 전량 수입 의약품에 의존하고 있음
- 허피스 바이러스는 다른 바이러스에 비해 훨씬 많은 유전자와 단백질을 보유하고 있어 인간의 면역체계를 교묘하게 혼란시키기 때문에 이에 대한 치료제 개발이 어려운 실정임
- 이러한 상황에서 국내 천연소재로 항허피스바이러스제를 개발할 경우 그 파급효과는 수천억에 이를 것으로 전망되고 있음

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
목 표	내 용		달성도 (%)
허피스바이러스 치료용 소재 선	- 항허피스바이러스제 탐색, 선정, 선정자료조사		100

정연구 및 작용기전 및 유효성분 규명	- 항바이러스 작용기전 규명(in vitro)	
최적원료선정 및 원재료 기시법 개발	- 원료분석 및 표준화 - 지표물질, 유효물질의 확보	100
최적추출공정 및 대량추출공정 개발	- 원료생산업체 선정, 추출/농축/건조방법연구 - 원료표준공정 및 시험생산	100
전임상 유효성평가, 설치류안전성 평가	- 전임상 효력시험 평가 - 전임상 안전성(설치류 단회, 반복)	100
비설치류 안전성 평가	- 안전성 약리시험 평가 / 기타 안전성 시험 - 약리독성 및 작용기전 규명	100
- 제제, 제형개발, QC 및 추가성분 규명	- 임상제제 연구 - 용량/용법 선정 및 완제 formulation - 완제품 제조공정연구/규격, 분석법 개발 - 완제 기시법확립/밸리데이션 - 배치별 안정성시험 완료	100
- 임상프로토콜개발	- 임상프로토콜개발	100
- 임상계획승인	- IND filing - 원료자료집/문헌 생산 - 식약처 임상시험승인 신청	100

4-2. 관련분야 기여도

가. 기술적 기대성과

- 1) 기존 항바이러스제의 문제점인 내성 및 부작용 등을 극복한 천연물 기반 항바이러스제의 개발이 기대됨.
- 2) 새로운 항바이러스 인자의 발굴과 기능을 밝힘으로써, 세계수준의 논문과 바이러스 제어 기술 확보가 가능할 것임.

나. 경제적 기대성과

- 1) 천연물 기반 항바이러스 개발을 통해 새로운 고부가가치의 항바이러스 시장을 창출할 수 있음.
- 2) 항바이러스제에 대한 특허를 창출하여 원천기술을 확보하여 바이오 의약품 시장에서 국가경쟁력을 강화할 수 있음.
- 3) 국내외 항바이러스 시장이 급속도로 증가하는 추세임. 향후 항바이러스 시장의 대체효과를 발휘하여 국가적 경제성을 증가시킬 것으로 예상됨. 허피스바이러스 치료제가 전체 항바이러스제 시장에서 차지하는 부분 (~47%)을 감안하면 후보과제의 성공적인 수행을 통해 개발된 항바이러스제 및 연관 기술의 경제적 가치는 사업종료시점 (2017년) 기준으로 30~40억 달러로 추산됨
- 4) 국내자원식물을 이용한 항바이러스제 개발은 농가소득향상에 이바지 할 것으로 기대됨.

다. 사회적 파급효과

- 1) 바이러스 감염 질병은 현대화, 고령화 및 기후변화 등에 의해 지속적으로 출현될 바이러스 감염 질병에 대한 효과적인 치료방법 제시로 국민적 불안 해소에 기여할 것으로 예상된다.
- 2) 다양한 바이러스 제어 원천기술 확보로 예상되지 않던 바이러스 감염성 질병의 증가 또는 신규 바이러스 유입에 신속하게 대응할 수 있을 것으로 기대됨.
- 3) 신속하고 정확한 바이러스 진단 및 치료법 개발을 통해 국민보건수준의 향상을 촉진할 것으로 기대됨.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>가. 대상포진 치료제 제품화 / 산업화 활용방안 : <u>약 300억원/년 이상 매출기대</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 국내 제약업체를 통한 유통전략 수립 2) 해외 기술이전 및 수출 : 미국, 유럽 및 동남아 등 해외 수출 <p>나. 후보물질의 수집, 자원평가 및 생산체계확립은 환경변화에 대응한 자생식물자원 보존 및 확대방안에 활용함</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 본 연구결과는 식물자원분야 기초 및 응용학문분야의 발전에 활용함 2) 후보 천연자원의 재배단지 조성을 통해 농업생산성 확대가 가능함 3) 자원특성판별 및 식물기원정립을 위한 연구결과는 산업화 자원가치가 높은 농산물의 식의약 소재 개발 및 산업화에 활용할 수 있음 <p>다. 천연자원의 다양성 항바이러스 효능을 검증함으로써 다양한 바이러스 치료제로 개발 가능</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 많은 국민이 소비하고 있는 식의약 원료를 이용한 제품을 개발하여 효능을 부여하므로 소비자의 니즈를 충족 2) 면역개선 등의 건강기능식품 개별 인정과 신약후보물질로 창출에 기여할 수 있음 3) 천연자원의 항바이러스 효능을 과학적으로 검증함으로써 소비자들의 신뢰도를 높임과 동시에 식의약 소재를 확보하여 식품 및 의약품 개발 분야에서 국제적인 경쟁력을 갖추 <p>라. 해당 개발원료인 담팔수 등은 국내에서 자생 및 재배하고 있는 천연자원이며, 소비자들에 게도 잘 알려져 있는 자원이므로 식의약품을 출시하였을 때 소비자들의 선호도를 높일 수 있을 것으로 기대</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 특히 근래 급성장 하고 있는 식의약품 시장은 다양하고 새로운 천연소재의 개발을 필요로 하고 있다는 점에서 경제 산업적 활용성을 가짐 2) 천연물 자원 특히, 국산 식물자원의 개발에 기여할 수 있으며, 신약 및 기능성 식품의 개발에 의한 유효물질의 개발로 원료 약품의 수입대체 효과를 기대할 수 있음 <p>마. 의료비 증가에 따른 국가 부담가중, 노령화 사회 진입, 소비자의 건강관심 고조, 식의약품 산업계의 신제품 개발 방향 등을 고려할 때 식의약품의 수요는 지속적으로 증가될 것으로 전망되고 있으며, 특히 항바이러스제의 수요는 급속히 증가할 것으로 예상된다</p>	

- 바. 본 과제 수행 중 얻어지는 핵심 특허를 관련 산업체에 라이선싱 아웃함으로써 국내 판매권과 원료 공급권을 확보한다면 국내 관련 산업의 획기적인 성장에 기여할 수 있음
- 1) 수입대체 및 수출 효과 측면에서는 식의약품 원료 수입에 대한 대체 효과 발생하며, 식의약품 원료의 해외 의존도는 1996년을 제외하고 15% 내외의 수준이므로 국내의 원료가 확충됨에 따라 이들 에 대한 국내 생산 및 수입대체 효과가 빠르게 이루어질 수 있을 전망임
 - 2) 국내 농림자원을 활용하여 생산하므로 농림업간의 활성화는 물론, 크게는 한국 전통을 부각하는 해외 수출업 활성화에서도 영향을 줄 수 있을 것으로 기대됨

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>가. 특허분석 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 고려대학교 송문정 등은 2009년부터 감마허피스바이러스 재활성 유도 효능을 나타내는 천연물에 대하여 연구하였으며, 천오, 파두 및 감수 등을 이용하여 각각의 감마허피스 바이러스 재활성 유도 특허를 출원 ○ 문치웅 등은 맨드라미 추출물을 함유하는 바이러스 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 특허를 출원하였으며, 각각의 바이러스가 감염된 세포주를 이용하여 그 효능을 나타냄 ○ 한국생명공학연구원의 권두한 등은 식물 추출물을 포함하는 항바이러스 조성물에 관한 특허를 출원하였으며, 그 내용으로는 바나바, 세이지, 라벤더, 로즈마리 추출물의 배합이 코로나바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 방법을 제시 ○ 가톨릭대학교 박용일 등은 낙엽진흙버섯으로부터 추출한 항바이러스 활성을 갖는 약학조성물에 대한 특허를 출원하였으며, 이 조성물이 인플루엔자, 엔테로바이러스, 허피스 바이러스에 의한 세포 감염을 억제한다는 내용을 제시 ○ 이러한 기존 특허를 통합적으로 분석한 결과 국내에서는 천연물 추출물에 대한 효능 평가에 치중되어 있고, 신소재 발굴 및 소재 특성, 유효성분 규명 등의 연구가 미흡 <p>나. 논문분석 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Mostafa 등은 HSV-1 immediate-early protein 인 ICP0의 phosphorylation에 관한 연구를 하였으며, 세 군데의 major region으로 인해 복제와 재활성화가 약해진다는 논문을 발표 ○ Eide 등은 peptide-conjugated morpholino oligomer가 세포와 설치류 모델에서 HSV-2의 복제를 줄여준다는 논문을 발표 ○ Kuo 등은 수염가래꽃의 성분들을 분리하여 항바이러스 및 항염증 효능을 연구하였으며, 그 중 scoparone와 lobechine의 효능이 우수하다는 논문을 발표 ○ Leiva 등은 HSV-1의 UL24 gene에 대해 연구하였으며, HSV-1의 복제와 재활성화에 		

의해 UL24 subfamily gene들이 차이를 나타낸다는 논문을 발표

- Li 등은 중국 전통 한약재인 Yi-Fu-Qing이 급성 호흡계 감염에 작용하는 바이러스에 효능이 있다는 논문을 발표
- 이도승 등은 약용버섯을 이용하여 항바이러스 효능 탐색을 연구하였으며, 그 중 *Phellinus linteus*를 이용하여 HIV 효능 연구를 진행

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호

D-09

「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음 (일반과제)

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

: 해당사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

- 실험실 안전교육 이수 및 안전관리
 - 본 연구에 참여하는 모든 과제책임자 및 연구원 대상 기관 내 안전교육 이수 완료 (신입 인력의 경우, 해당 기관에서 시행하는 안전교육 이수 예정)
 - 매년 연구기관별 정기 안전점검 실시
 - 연구기관별 정기적인 자체 실험실 안전 점검을 통한 위험요소 제거
- 바이러스, 세포 및 동물 등의 인체 노출 위험요소 제거
 - 사용 후 바이러스, 세포 및 실험동물에 노출된 모든 실험기기는 멸균 후 폐기 처리하여 2차 감염 미연 방지
 - 실험 안전관리 도구(실험복, 마스크, 장갑, 보안경 등)을 적극 활용하여 실험자의 안전성 최우선 확보
 - 실험동물 윤리교육 및 사용자 교육 습득
- 추출 등의 연구 조작 시 유해한 용매 사용 등으로 인체 노출 위해 가능성 최소화
 - 연구실 안전 장비 확보 (유기용매침투방지용 보호장갑 등)
- 연구실안전관리비 예산 책정 및 마련으로 안전사고에 대한 금전적 손실 방안 확보
 - 연구실 연구인원 보험가입 실시

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	antiviral activity of angelicin against gammaherpesviruses	고려대학 교	교신저 자	Antibiral Research	3.685	2013.07.15	중복	SCI
2	논문	The extract of Tamarindus indica L. suppresses IKKb activity and NF-kB dependent lymphoblastoid cell line survival	가천대학 교	교신저 자	Mollecular cellular toxicology	0.72	2013.08.20	단독	SCI
3	논문	Lupeol is one of active components in the extract of chrysanthemum indicum linne that inhibits LMP1-induced NF-kB activation	가천대학 교	교신저 자	PLOSoone	3.73	2013.11.04	중복	SCI
4	논문	The extract of Elaeocarpus sylvestris inhibits human cytomegalovirus immediate early gene expression and replication in vitros	가천대학 교	교신저 자	Molecular medicine reports	1.17	2013.11.22	단독	SCI
5	논문	Acetylation changes at lysine 5 of histone H4 associated with lytic gene promoters during reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	동국대학 교	교신저 자	Acta Virologica	1.47	2014.07.30	중복	SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
○ 바이오의약품 기술개발 동향 (항바이러스 치료제를 중심으로). 국가생명공학정책연구센터	

- 이은소. 2008. 단순헤르페스 감염의 약물치료. *Pharmacotherapeutics*. 51(10), 942-948.
- Wilcox et al., 1997. The Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein ICP0 Is Necessary for the Efficient Establishment of Latent Infection. *JOURNAL OF VIROLOGY* Sept. 71(9), 6777-6785.
- Julie et al., 2005. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 diffuses out of infected rabbit corneas. *Journal of General Virology*. 86, 2979-2988.
- MIDAS Sales Data, IMS Health Market Prognosis. 2007
- De Leo et al., 2012. Resveratrol inhibits Epstein Barr Virus lytic cycle in Burkitt's lymphoma cells by affecting multiple molecular targets. *Antiviral research*. 96(2), 196-202.

주 의

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