

11-15430
00-00259
3-01

사
군
자
추
출
물
을
이
용
한
남
성
비
뇨
생
식
기
건
강
기
능
성
식
품
소
재
개
발
최
종
보
고
서

2019

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

공개(), 비공개(v) 발간등록번호(11-1543000-002593-01)

농생명산업기술개발사업 제 3차 연도 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-002593-01

사군자 추출물을 이용한 남성 비뇨생식기 건강 개선용 기능성 식품소재 개발 최종보고서

2019. 03. 28.

주관연구기관 / (주)휴온스
협동연구기관 / 충남대학교

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “사군자 추출물을 이용한 남성 비뇨생식기 건강 개선용 기능성 식품소재 개발”(개발기간 : 2016.09.05 ~ 2018.12.31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 03. 28.

주관연구기관명 : ㈜휴온스 (대표자)

협동연구기관명 : 충남대학교 산학협력단 (대표자)

엄기안 (인)

이영석 (인)



주관연구책임자 : 임중환

협동연구책임자 : 권효정

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116078-3	해 당 단 계 연구 기 간	2016.09.05. ~2018.12.31	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	해당 없음			
	세부 과제명	사군자 추출물을 이용한 남성비뇨생식기 건강 개선용 기능성 식품소재 개발			
연구 책임자	임종환	해당단계 참여연구원 수	총: 21명 내부: 21명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:700,000천원 민간:466,667천원 계:1,166,667천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 21명 내부: 21명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:700,000천원 민간:466,667천원 계:1,166,667천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)휴온스/중앙연구소			참여기관명 충남대학교	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

1. 사군자 원생약 및 원료의 규격연구
2. 사군자추출물의 대량생산공정 기반 연구
3. 사군자추출물에 대한 비임상 독성시험
4. 인체적용시험 및 건강기능식품 개별인정형 원료 인증 신청
5. 사군자 유래 분획물에 대한 in vitro/in vivo 효능 검증
6. 전립선 유래 세포주 및 전립선비대증 동물모델을 이용한 작용기전 연구
7. 전립선 이완효능 및 하부요로증상 개선 효능 평가
8. 발기부전 효과 탐색 및 효능 평가
9. 남성갱년기 (탈모, 호르몬 불균형, 성기능 감소 등)관련 개선 효능평가

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구과제의 목표는 ① 사군자 추출물을 이용하여 남성 비뇨생식기 질환 (전립선비대증, 생식능력저하, 발기부전)에 개선 효과가 있는 고부가가치 건강기능성 식품 소재를 개발함으로써 ② 국내 재배 농가 및 기업의 소득증대와 더불어 국민 보건에 기여하여 사회전반에 걸친 시너지효과를 창출하는 것을 목적으로 함</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>기술실시 2건, 특허 16건, 논문 1건, 학술대회 발표 9건, 홍보실적 71건, 연구인력활용/양성 9건</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미래원천기술 확보 <ul style="list-style-type: none"> • 남성 비뇨생식기 질환에 대한 신규 복합 치료제 개발을 위한 원천기술 확보 • 생기능 개선 효과가 알려진 다른 천연물 소재와의 combination therapy의 유효성 연구로 확대 - 연구과제 종료 후 활용 방안 <ul style="list-style-type: none"> • 본 과제 수행을 통해 구축된 인적, 물적 연구 인프라를 기반으로 관련 분야 연구를 위한 산학 연구 협의체 구성 • 천연물 또는 식물자원 활용을 통한 신약기술개발 확립 및 산업화 <p>2. 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> • 기존 전립선비대증 치료제의 문제점인 낮은 효과 발현과 성욕감퇴를 개선하면서, 동등 이상의 효능을 가진 새로운 전립선비대증 개선 기능성 식품 소재 개발 • 다른 남성 비뇨생식기계 질환의 치료 및 진단, 예방 방법 개발에 응용 가능 • 남성 비뇨생식기계 질환과 관련된 임상의학의 기초자료로 활용 가능 - 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> • 노년을 보다 여유롭고 행복하게 보내고 싶어 하는 환자들에게 보다 안전하면서 치료효과가 좋은 새로운 천연물 제재를 제공하여 환자의 만족도 향상 • 원재료 생산을 위한 자생식물 재배로 농가 소득의 증대 • 새로운 기능성 식품생산을 통한 의약품 수입 대체효과 및 수출 증대효과를 기대 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>사군자</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>남성 비뇨생식기</p>	<p>전립선비대증</p>	<p>발기부전</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Male urogenital tract</p>	<p>Benign Prostatic Hyperplasia</p>	<p>Erectile Dysfunction</p>	<p>Sexual Dysfunction</p>	<p>Quisqualis Indica Linne</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
1.1. 연구개발 목적	1
1.2. 연구개발 대상의 국내·외 현황	2
1.3. 국내·외 지식재산권 현황	8
1.4. 향후 전립선비대증 치료제 대한 국내·외 산업 동향	9
2. 연구수행 내용 및 결과	11
2.1. 주관연구기관 (휴온스)	11
2.1.1. 산지별, 채취시기별 원생약 규격화	11
2.1.2. 최적 추출 조건 설정	13
2.1.3. Bioassay-guided fraction/isolation을 통한 분획 및 성분 연구	15
2.1.4. 지표/유효 성분 설정 및 분석법 연구	17
2.1.5. 공정연구 진행 및 원료 표준화 방안	21
2.1.6. 원료 생산단가	24
2.1.7. 기준 및 시험법 설정 및 데이터 확보	24
2.1.8. 사군자주정추출분말(quisqualic acid) 시험법 검증	35
2.1.9. 사군자주정추출분말 안정성(유통기한설정) 연구	44
2.1.10. 중장기적 원료 확보 계획 및 국산화 전략	48
2.1.11. 최종 기능성 원료에 대한 비임상 독성시험	49
2.1.12. 인체적용시험	58
2.2. 협동연구기관 (충남대학교)	67
2.2.1. 사군자 추출물에 대한 in vitro 효능 탐색	67
2.2.2. 사군자 추출물에 대한 in vivo 효능 검증	68
2.2.3. 전립선 유래 세포주를 이용한 in vitro 작용기전 연구	73
2.2.4. 전립선비대증 동물모델을 이용한 in vivo 작용기전 연구	74
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	90
3.1. 목표	90
3.2. 목표 달성여부	92
3.3. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책	93
4. 연구결과의 활용 계획 등	94
4.1. 본 연구과제를 통한 미래원천기술 확보	94
4.2. 연구과제 종료 후 활용 방안	94
4.3. 향후 마케팅 및 사업화 계획	94
4.4. 기대효과	95

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

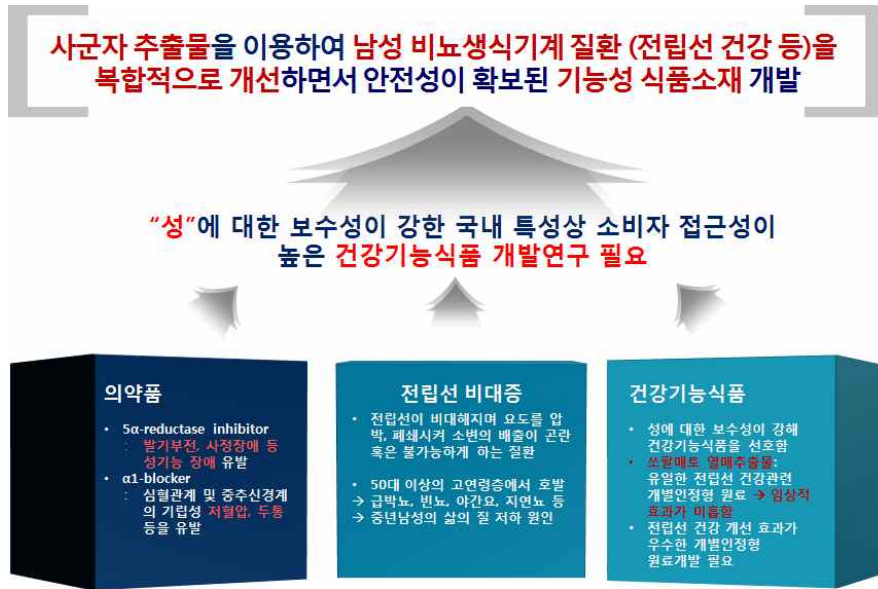
<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

1.1. 연구개발 목적

(1) 연구개발 개요

: 본 연구과제의 목표는 ① 사군자 추출물을 이용하여 남성 비뇨생식기 질환 (전립선비대증, 생식능력저하, 발기부전)에 개선 효과가 있는 고부가가치 건강기능성 식품 소재를 개발함으로써 ② 국내 재배 농가 및 기업의 소득증대와 더불어 국민 보건에 기여하여 사회전반에 걸친 시너지효과를 창출하는 것을 목적으로 함



(2) 연구개발의 주요 내용

<1차년도>

- 사군자 원료 규격 연구 및 표준화 (주관연구기관, 휴온스)
 - 국내외 산지별, 채취 시기별 원생약 규격화
 - 지표/유효 성분 설정 및 분석법 연구
- 사군자 추출물로부터 전립선비대증 개선효과를 가진 활성물질 탐색 (협동연구기관, 충남대)
 - 전립선비대 상피세포주 및 간질세포주를 이용 사군자 추출물에 대한 *in vitro* 효능 탐색
 - 안드로젠 유도 전립선비대 동물모델을 이용 *in vitro* 효능 확인
 - 세포증식, 세포자멸사, 염증 및 oxidative stress 관련인자 평가
 - 전립선 평활근에서의 알파차단 효과를 통한 전립선 이완효능 검증
 - 요도내압 측정법을 통한 하부요로증상 완화 효과 검증

<2차년도>

- 사군자 추출물을 이용한 제품화 기반 구축 (주관연구기관, 휴온스)
 - 공정연구 진행 (Pilot, Scale-up 생산 포함 3 LOT)
 - 기준 및 시험법 설정 및 데이터 확보
 - 분석법 validation
 - 원료의 안정성시험 (6개월 가속 등)

- 최종 기능성 원료에 대한 비임상독성시험
 - 제형연구 및 기능성 원료 시제품 개발
- 사군자 추출물에 대한 전립선비대증 치료 기전 규명 (협동연구기관, 충남대)
 - 전립선 유래 세포주를 이용한 *in vitro* 작용기전 연구
 - 전립선비대증 동물모델을 이용한 *in vivo* 작용기전 연구
 - 알파차단효과로 인한 심혈관계 부작용 평가
 - 발기부전 부작용 극복을 위한 후보물질의 음경해면체 평활근 이완 효과 평가

<3차년도>

- 전립선 건강 기능성 원료에 대한 인체적용시험 및 개별인정 신청 (주관연구기관, 휴온스)
 - 최종 기능성 원료에 대한 인체적용시험
 - 다양한 식품 제형연구 및 안정성 평가
 - 개별인정신청 구비서류 준비 및 전립선 건강에 도움을 줄 수 있는 기능성 원료 개별인정 신청
- 사군자 추출물에 대한 전립선비대증 치료기전 규명 (협동연구기관, 충남대)
 - 전립선 유래 세포주를 이용한 *in vitro* 작용기전 연구
 - 전립선비대증 동물모델을 이용한 *in vivo* 작용기전 연구
 - 사군자 추출물의 기존치료제 대비 부작용 억제 효능연구
 - 사군자 추출물의 남성갱년기 관련 효능 (탈모, 호르몬 불균형 등)평가

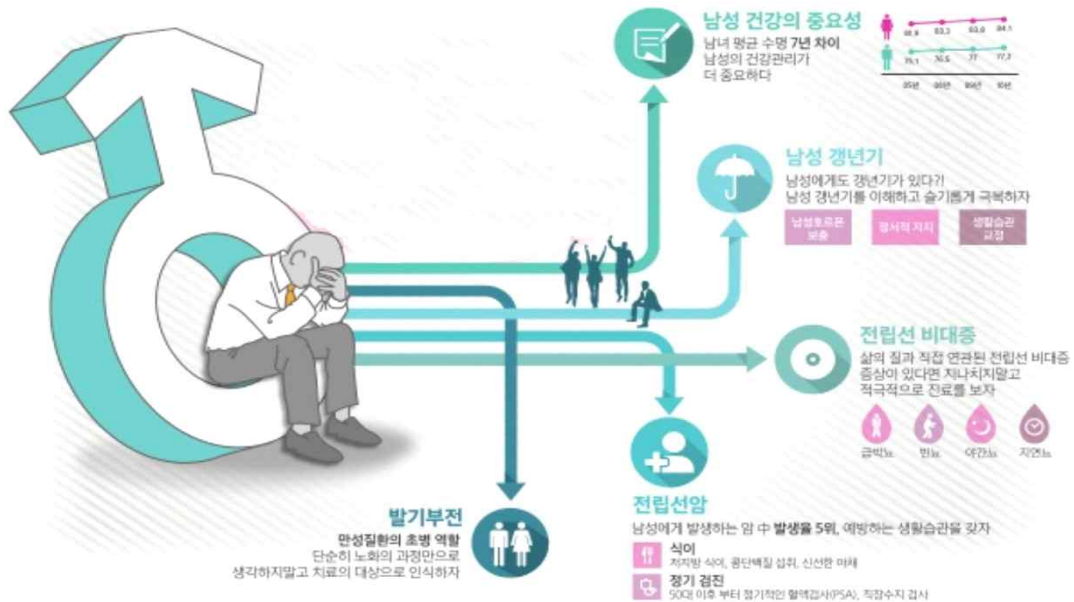
1.2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

(1) 남성 비뇨생식기 질환에 대한 국내·외 현황

(가) 고령화에 따른 남성 비뇨생식기 질환의 증가

- 한국의 노령인구 비율은 노령인구는 2005년에 437만 명으로 전체인구의 9.3%를 차지하고 있었으나 2015년 현재 총 인구의 15.7%를 차지하여 인구 10명중 1명이 노인인구로 나타났음. 향후 2030년에는 24.1%로 고령사회에서 2050년에는 37.3%가 되어 초(超)고령사회에 도달할 것으로 전망됨
- 최근 고령화가 사회적인 이슈로 대두됨에 따라 노인의 건강한 삶에 대해 관심이 높아지고 있으며, 이에 따른 남성 갱년기 질환에 대한 관심이 증가하고 있음
- 여성 대부분이 50세를 전후해 생식선 기능의 갑작스러운 감퇴와 함께 갱년기를 겪는 반면, 남성은 중년 이후 남성호르몬이 매년 1% 이상씩 감소하여 남성 호르몬 결핍에 의한 다양한 증상들이 서서히 나타나는 것으로 알려져 있음
- 남성의 노화 현상이 나타나면 전반적으로 호르몬분비가 감소하면서 ① 생식능력이 저하되고 ②성기능이 역시 감소되며 이와 동시에 ③ 근력감소, ④ 골다공증 및 ⑤ 복부비만 등의 체형변화와 ⑥ 당뇨, 고지혈증과 같은 대사성 질환과 함께 ⑦ 전립선비대증과 같은 비뇨기계 이상이 생길 수 있음

<남성 갱년기 질환 - 전립선비대증과 성기능 장애>



(2) 전립선비대증에 대한 국내·외 현황

(가) 국내·외 기술 수준 및 시장 현황

① 노령인구 증가에 따른 전립선비대증 환자의 증가

㉞ 전립선비대증이란 (Benign Prostatic Hyperplasia; BPH)?

- 한국표준질병사인분류 (KCD-7) 비뇨생식계통의 질환 (N00-N99) N40 전립선증식증
- 전립선이 비대해지며 요도를 압박, 폐쇄시켜 소변의 배출이 곤란 혹은 불가능하게 하는 질환임
- 증상으로는 빈뇨, 잔뇨, 세뇨, 요도폐쇄로 인한 배뇨 불능 등이 있음

㉟ 노령화 사회에서 발생하는 남성질환

- 전립선비대증은 중년 이후의 남자, 특히 50대 이상의 남성에서 발생하는 가장 흔한 양성 종양의 하나로 가장 큰 유발인자는 연령 증가임
- 50대 이상 남성이 전체 전립선비대증 진료인원의 90.5%를 차지
 - 2010년을 기준으로 40대 8.4%, 50대 23.3%, 60대 34.0%, 70세 이상 33.2%로 50대 이상의 고연령층이 90.5%를 차지
 - 따라서 고령화로 인한 노인 전립선비대증 환자 계속 증가할 것으로 예측

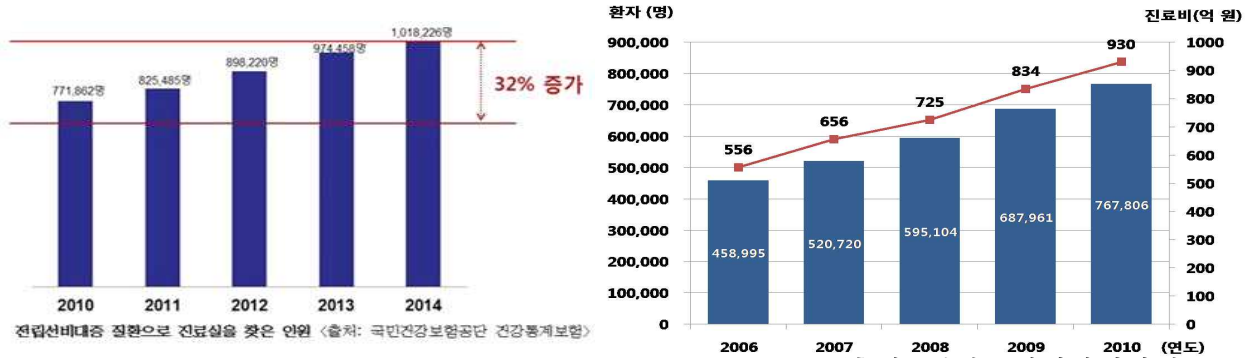
㊱ 전립선비대증 환자 및 진료비 현황

- 최근 5년간 전립선비대증 환자는 32%나 증가하였음
 - 2010년 전립선비대증으로 병원을 찾은 환자는 771,862명이었으며, 연평균 7.2%씩 늘어나

2014년 현재 약 100만명에 달함

- 건강보험심사평가원이 최근 5년간의 심사결정 자료를 이용하여 전립선의 증식증 (=전립선 비대증, N40)에 대해 분석한 결과를 보면
 - 진료인원은 2006년 458,955명에서 2010년 767,862명으로 5년간 약 308,851명이 증가 (67.3%)하였고, 연평균 증가율은 13.7%이었음
 - 총진료비는 2006년 555억원에서 2010년 930억원으로 5년간 약 375억원이 증가 (67.4%)하였고, 연평균 증가율은 13.8%임

<전립선비대증 진료인원 및 총 진료비 추이 (2006~2010년)>



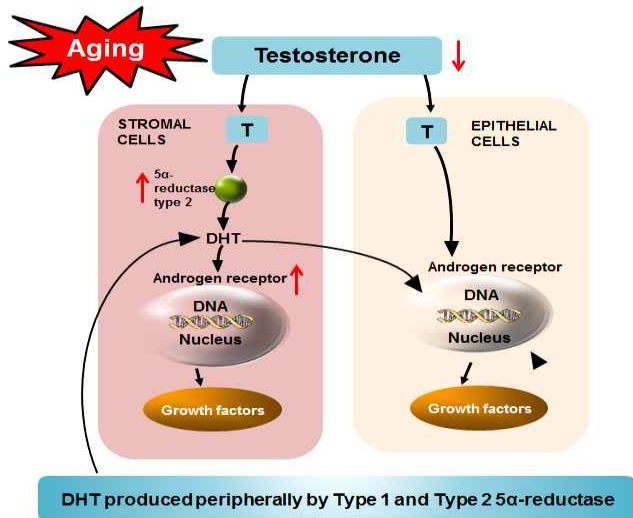
(출처: 건강보험심사평가원, 2011)

(3) 국내·외 전립선비대증 치료제 기술 수준 및 시장 현황

(가) 전립선비대증 치료제 기술 수준

① 전립선비대증의 발병 원인

- 정상적으로 남성에게서 분비되는 호르몬은 testosterone과 dihydrotestosterone (DHT)의 두가지 형태로 존재
- 고환에서 분비된 testosterone은 전립선 내에서 5 α -환원효소 (reductase)에 의해 5 α -디하이드로테스토스테론 (DHT)로 전환
- DHT는 전립선 상피와 간질세포의 핵내에 존재하는 androgen receptor와 결합하여, EGF, FGF 등의 다양한 growth factor를 분비하고 수용체와 결합하여 전립선의 증식을 유도
- 노년기가 되면 5 α -환원효소의 활성이 증가되어 테스토스테론에서 DHT로의 전환이 증가



<전립선비대증의 원인>

- 또한 테스토스테론이 감소하면서 전립선 세포의 androgen receptor가 증가
- 이에따라 DHT가 더 많은 androgen receptor에 결합하여 전립선의 증식을 유도하는 성장인자들을 지속적으로 더욱 자극함으로써 전립선 비대가 유발

② 전립선비대증 치료제 현황

- 5 α -reductase 저해제 : 대표적인 전립선비대증 치료제
 - 남성 호르몬 작용을 나타내는 testosterone에는 영향을 주지 않고 DHT의 생성을 선택적으로 억제
 - 항안드로젠 효과를 발현시켜 부작용 없이 비대해진 전립선 축소 및 배뇨장애 완화
 - 안전하고 근본적인 치료가 가능한 치료제로 인식
 - 5 α -reductase의 작용을 저해하여 조직중의 DHT 생성을 억제하는 피나스테라이드 (finasteride)나 두타스테라이드 (dutasteride)와 같은 화합물이 전립선비대증 치료제로 사용되고 있음
- 알파1 차단제 (α 1-Blocker) : 전립선비대증의 증세를 경감시켜주는 효과
 - 아드레날린 수용체는 알파와 베타 수용체로 구분되며 전립선에는 알파1, 알파2 수용체 모두 분포하나 기능적으로는 주로 알파1 아드레날린 수용체를 통해 전립선평활근의 수축을 유발
 - 전립선 비대를 감소시켜 주는 역할이 아니라 전립선이나 방광의 근육조직을 이완시켜 증상을 완화
 - 테라조신 (terazosin), 독사조신 (doxazosin), 탐스로신 (tamsulosin), 알푸조신 (alfuzosin)과 같은 화합물이 여기에 해당

<전립선비대증 치료제 현황>



(나) 국내·외 전립선비대증 치료제 (전문 의약품) 기술 수준 및 시장 현황

- 2010년 주요 선진국들의 전립선비대증 치료 시장 규모는 2010년 32억 달러를 기록하였으며, 향후 연평균 성장률 6.4%를 기록하여 2018년에는 52억 달러에 이를 것으로 예상

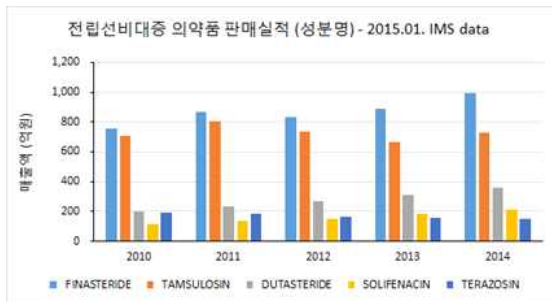
① 미국의 전립선비대증 치료제 시장 현황

- 미국의 전립선비대증 치료제 시장은 2010년 매출액 기준으로 약 20억 달러에 달하며, Alpha-Blocker 계열의 Tamsulosin (물질명) 5-Alpha reductase 계열의 Avodart가 전체 미국 시장의 50% 이상을 점유하고 있음
- 특히 2006년부터 2009년까지 미국시장의 63.9%를 점유한 Tamsulosin은 2009년 특허가 만료됨에 따라 제네릭 의약품들이 출시되었으며 이에 따라 Flomax (Tamsulosin의 오리지널 제품)의 시장점유율이 급감하는 반면, Tamsulosin 및 Finasteride 등의 제네릭 의약품의 시장점유율이 점차 상승하는 추세를 보임

② 국내 전립선비대증 치료제 시장 현황

- 국내 전립선비대증 치료제 시장 규모는 13년도 기준 약 2,200억원으로 추정
- 2011년 기준, 주요 전립선 비대증 치료제 매출액 순위는 하루날디, 카두라XL, 자트랄XL, 하이트린, 트루패스, 플리바스 순
- 국내 치료제의 성분별 판매실적을 보면 2014년 현재 finasteride가 1,000억원으로 판매 1위를 차지하고 있으며, tamsulosin, dutasteride, solifenacin 및 terazosin의 순으로 나타남

<전립선비대증 치료제 성분별 매출량>



성분명	질환분류	약효 분류	투여경로
FINASTERIDE	비노생식기계/피부	전립선비대증/탈모	경구
TAMSULOSIN	비노생식기계	전립선비대증	경구
DUTASTERIDE	비노생식기계	전립선비대증	경구
SOLIFENACIN	비노생식기계	배뇨장애(전립선비대증)	경구
TERAZOSIN	비노생식기계/순환기계	배뇨장애(전립선비대증)/고혈압	경구

(출처: IMS Data, 2015)

- 2012년 2분기 기준으로 국내 제약사에서 출시한 치료제 (하이트린, 트루패스)가 해외 제약사의 카두라 XL과 자트랄 XL의 매출액을 초과
- 2012년 일괄적인 약가 인하 영향으로 하이트린, 카두라 XL, 자트랄 XL의 가격이 30%하락
- 2012년 신규 진입한 동아팜텍의 플리바스는 시장점유율을 빠르게 높여가고 있으며, 2012년 2분기 매출액이 2012년 1분기 대비 6.2배 증가

③ 국내·외 전립선비대증 관련 건강기능식품의 기술 수준 및 시장 현황

- 의약품 외 전립선비대증 치료 전체 시장은 800억대이며, 이중 생약 및 건강기능식품 시장은 200억대를 형성하고 있음
- 건강기능식품으로 CJ제일제당 (전립소 쏘팔메토)가 약 100억으로 50% 이상을 점유하고 있음 (2015년 기준). 지난 8년 연속 판매 1위 (식약처 쏘팔메토 생산실적 기준)를 기록하며 누적 매출 800억원을 돌파
- 그밖에도 보령제약, JW중외제약 등 국내 30여개 제약사에서 전립선비대증 관련 건강기능식품을 판매중이나 쏘팔메토를 주성분으로 하는 시장이 가장 큼
- 쏘팔메토
 - 아메리카 대륙에서 자라는 톱야자수 열매 추출물
 - 항남성호르몬작용, 항증식작용, 항염증작용 3가지의 메커니즘을 통해 효과를 나타냄
 - 2008년 식약청에서 기능성 원료로 허가된 성분으로 현재 22개사에서 60여개 품목이 생산되어 200억대 시장을 형성
 - '04 ~11년 건강기능식품 기능성 원료의 개별 인정 현황을 보면 쏘팔메토 열매 추출물인 총 16건으로 4위를 차지하고 있음



(4) 국내·외 경쟁기관 현황

(가) 국내 전립선비대증 치료제 (전문 의약품) 및 건강기능식품 경쟁업체 현황

- 전립선 평활근을 지배하는 신경조절 장애를 조절해 배뇨증상을 개선하는 알파1 차단제 약물에선 일양 하이트린 (일양약품)과 트루패스 (JW중외제약)의 자리변동 외에는 전년 순위를 유지
- 트루패스는 1월 특허만료 영향을 받아 일양 하이트린에 2위 자리를 내주었으나 전년 동기 대비 15.9% 하락한 26억 원을 기록, 30% 약가인하분을 감안하면 선전했다고 판단됨
- 트루패스 뒤로 폴리바스 (동아ST), 자트랄엑스엘 (한독) 순이며 1위는 계속해서 하루날 (아스텔라스), 1위부터 6위까지 오리지널, 그 뒤부터 제네릭이 랭크됨
- 직접적으로 전립선의 크기경감을 도모하는 5α-reductase 저해제 (5알파환원효소억제제) 약물에서는 아보다트(GSK)가 특허만료로 전년 동기 대비 22.4%나 하락했음에도 1위를 유지했는데, 트루패스처럼 30% 약가인하에 비하면 하락률이 큰 편이 아닌 것으로 판단
- 올해 1월 2개의 대형약물이 특허 만료된 전립선비대증치료제 시장에서 여전히 오리지널 강세가 지속되고 있으며, 아보다트와 트루패스는 특허만료에 따른 약가인하와 제네릭 진입으로 하락세를 보임
- 업체는 종합병원에서 오리지널 선호도가 높은데다 특허만료 1년 후면 오리지널과 제네릭 가격차이가 없어진다는 점이 이런 현상을 만들고 있다고 분석
- 한미약품, JW중외신약 등 이 시장 강자들이 신제품을 내놓은 상황으로 경쟁구도에 변화가 생길지 주목되고 있음

[알파1 차단제 1분기 원외처방액 현황 (2015년-2016년)]

(단위: 백만원, %)

성분명	제품명	제약사	2015. 1Q	2016. 1Q	증감
탐스로신	하루날	아스텔라스	14,420	16,075	11.5
테라조신	일양 하이트린	일양약품	3,055	3,365	10.1
실로도신	트루패스	JW중외제약	3,154	2,654	-15.9
나프토피딜	폴리바스	동아ST	2,125	2,511	18.2
알푸조신	자트랄 엑스엘	한독	1,872	1,982	5.8
독사조신	카두라 엑스엘	화이자	1,632	1,580	-3.2
탐스로신	유로날	경동제약	1,152	1,153	0.0
탐스로신	한미 탐스	한미약품	773	797	3.2
탐스로신	유로탐스	일동제약	664	711	7.1

자료원 : 유비스트, 데일리팜 재인용

[5α-reductase 저해 제제 1분기 원외처방액 현황(2015년-2106년)]

(단위: 백만원, %)

성분명	제품명	제약사	2015. 1Q	2016. 1Q	증감
두타스테리드	아보다트	글락소스미스클라인	9,892	7,645	-22.4
피나스테리드	프로스카	엠에스디	3,578	3,940	10.1
피나스테리드	피나스타	JW중외제약	1,728	1,879	8.7
피나스테리드	피로이드	JW중외신약	1,546	1,310	-15.3

자료원 : 유비스트, 데일리팜 재인용

- 건강기능식품인 쏘팔메토는 2008년 식약청에서 기능성 원료로 허가된 성분으로 현재 22개사에서 60여개 품목이 생산되어 200억대 시장을 형성
- '04 ~11년 건강기능식품 기능성 원료의 개별 인정 현황을 보면 쏘팔메토 열매 추출물인 총 16건으로 4위를 차지하고 있음

1.3. 국내·외 지식재산권 현황

(1) 전립선비대증 관련 선행논문 및 특허 분석

- 연구 논문 및 특허 검색 데이터베이스인 PubMed 및 KIPRIS 등을 활용하여, 전립선비대증 (Benign prostatic hyperplasia)을 각각 key word로 하여 검색
- 국내외 전립선비대증 관련 논문은 주로 미국, 독일, 영국 및 캐나다를 중심으로 이루어졌으며, 대표적인 연구기관은 미국의 University of Texas로 총 2,174편의 논문을 보고
- 국내외 전립선비대증 관련 특허는 주로 미국, 유럽, 일본, 중국 및 한국에서 출원되었으며, 대표적인 출원/등록기관은 The Regents of the University of California로 총 481건의 특허를 보유

<국내외 전립선비대증 관련 논문 및 특허 현황>

구분	논문	특허
국가	전립선 질환관련 주요 연구는 미국 (31,403편), 독일 (3,883편), 영국 (3,575편), 캐나다 (3,146편) 등을 중심으로 이루어짐	2000년 이후 미국 (3,330건), 유럽 (Europe Patent 592건), 일본 (92건), 중국 (66건) 및 한국 (33건)이 출원됨
연구기관 (출원인)	대표적인 연구기관으로는 University of Texas (2,174편), National Cancer Institute (1,615편), Harvard University (1,549편), Memorial Sloan-Kettering (1,179편), University of California in San Francisco (1,108편), University of Michigan (1,097편) 등에서 주로 연구를 수행	이후 대표적인 출원/등록기관으로는 The Regents of the University of California (481건), Merck&Co Inc (114건), Genetech Inc (66건), Acuson Corporation (44건), Corixa Corporation (36건), Abbott Laboratories (32건), Agensys Inc (31건) 등이 있음
연구자	대표적인 연구자는 Epstein JJ (369편), Scardino PT (325편), Partin AW (119편), Schroder FH (298편), Carroll	이후 대표적인 연구자로는 Nestor JJ (11건, Syntrex Inc)가 있음

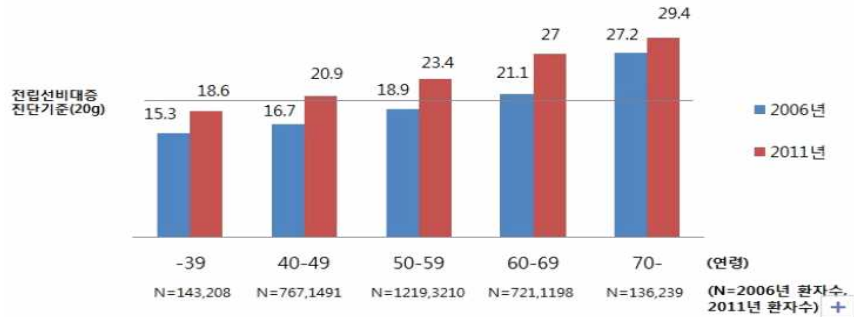
	PR (297편), Catalona WJ (273편), Walsh PC (271편), Mou; JW (263편), Bostwick DG (254편) 등임	
--	---	--

1.4. 향후 전립선비대증 치료제 대한 국내·외 산업 동향

(1) 점점 커지는 한국 남성의 전립선

- 대한비뇨기학회가 지난 2006년부터 2011년까지 성인 남성의 전립선 크기를 분석한 결과 30대 이상 남성의 평균 전립선 크기는 2006년 19.1g에서 2011년 23.6g으로, 23.5% 더 커짐
- 또한 40대 남성들의 평균 전립선 크기는 5년전 16.7g으로 전립선비대증으로부터 안전지대에 속했지만 2011년에는 평균 20.9g으로 전립선비대증 진단이 내려지는 수준으로 커짐

<한국 남성의 전립선 크기 변화. 2006 ~ 2011년>



(2) 남성 전문 약품 시장이 강력한 마케팅에 힘입어 향후에도 안정적으로 성장할 전망

- 남성 전문약 시장은 현재 전립선비대증, 야뇨 및 요실금, 전립선 및 고환암 (testicular cancer) 등 부분에서 새로운 치료제가 계속 개발되고 있음
- 특히, 고령인구의 증가 등으로 전립선비대증 치료제 시장은 두 자리 수의 성장을 보이고 있음

(3) 향후 전립선비대증 치료제 대한 국내·외 산업 동향

(가) 고령화에 따른 성기능 장애 관련 시장의 성장

- 남성불임 치료 및 예방제에 대한 국내외 시장은 불임치료 중 남성불임환자수의 증가와 함께 시장이 성장하고 있으며, 해마다 큰 폭으로 남성불임환자수가 증가하는 추세이므로 그 시장전망은 매우 크다고 예측됨

<남성 불임 치료제 시장에 대한 향후 전망>

구분	관련제품/서비스	시장규모(단위 : 억원, 억\$)					성장률 CAGR(%)
		2009	2012	2013	2014	2017	
국내 시장	불임치료시장	170	350	364	396	429	4.2%
	합 계	170	350	364	396	429	4.2%
세계 시장	불임치료시장	14.1	-	-	-	16.9	2%
	합 계	14.1	-	-	-	16.9	2%

※출처 Women's Infertility (2012) Pipelin Assessment and Market Forecast to 2017

- 비아그라는 출시 이후 5년간 전 세계에서 2,000만명이 복용, 연간 2조 5,000억원의 매출을 올리고 있음
- 제약 전문가들은 미국 성인남자 3,000만명이 발기부전 증세를 가지고 있으며, 그중 3분의 1이 비아그라를 복용해 본 적이 있다고 밝힘
- 발기부전 환자는 세계적으로 다음 20년간 3억 2,200만명의 2배 이상에 이를 것으로 기대되고 있음
- 현재 시장의 비아그라, 시알리스의 특허가 만료되고 제네릭 제품들이 잇달아 출시되면서 발기부전치료제에 대한 관심이 오히려 높아져 향후 시장규모는 더욱 커질 것으로 전망

2. 연구수행 내용 및 결과

2.1. 주관연구기관 (휴온스)

2.1.1. 산지별, 채취시기별 원생약 규격화

가. 국내 유통 사군자와 중국 사천성산 사군자 비교 분석

- 입고된 시기별 사군자 (*Q. indica*)는 긴 타원형 원뿔모양의 세로주름이 있는 흑갈색 열매 형태였음. 이는 대한약전에 제시된 사군자 성상과 동일함



그림 1. 국내 유통 사군자, 중국 사천성산 사군자 사진

- 원생약 20 g을 70 % EtOH 400 mL로 1시간 동안 환류 냉각 추출을 3회 실시하여, 국내 유통 사군자 추출물 7.14 g (수득률 35.7 %), 중국 사천성산 사군자 추출물 6.44 g (수득률 32.2 %) 수득하였음
- 사군자 원생약의 TLC 및 HPLC pattern 분석을 통하여 입고된 사군자 원생약의 규격 기준에 적용하여 규격화를 검증함
- HPLC 분석 조건
 - 검액: 추출액을 여과하여 사용함
 - 주입량: 20 uL
 - 유속: 1.0 mL/min
 - 이동상: gradient 조건 (이동상 A: D.W., 이동상 B: ACN)
 - 이동상 조건:

표 1. HPLC 이동상 조건

시간 (분)	이동상 A	이동상 B
0	97	3
5	97	3
20	70	30
40	0	100
42	0	100
45	97	3
50	97	3

- 칼럼 온도: 30 °C
- 분석 파장: 280nm
- 분석 칼럼: Inertsil® ODS-3 (5mm, 4.6×250mm)

- 분석 기기: Agilent 1260 Infinity

- HPLC 분석 결과

- 국내 유통 사군자

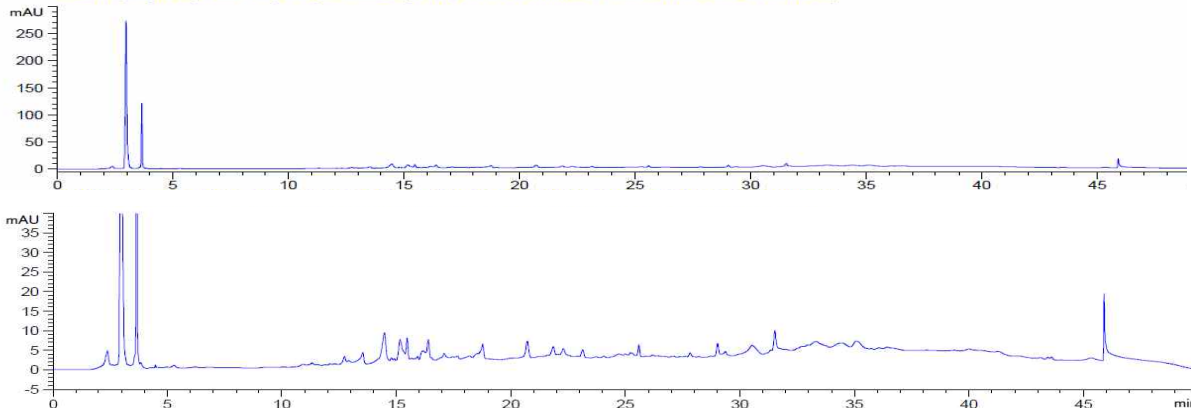


그림 2. 국내 유통 사군자 크로마토그램 (위: 본래 scale, 아래: 확대 scale)

- 중국 사천성산 사군자

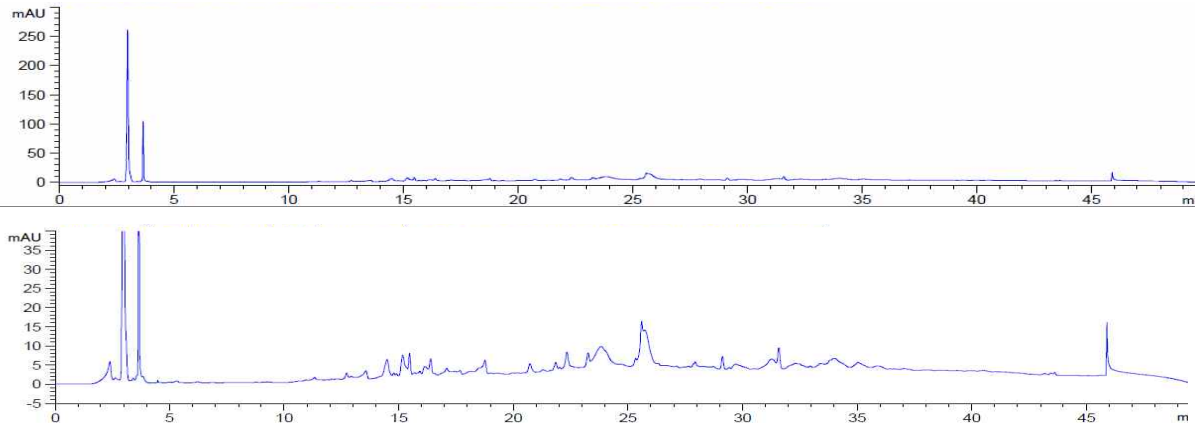


그림 3. 중국 사천성산 사군자 크로마토그램 (위: 본래 scale, 아래: 확대 scale)

- TLC 분석

- TLC 종류: Silicagel
- 전개 용매: N-butanol, glacial acetic acid and water (3:1:1, v/v)
- Spray reagent: 2% ninhydrin, 10% H₂SO₄

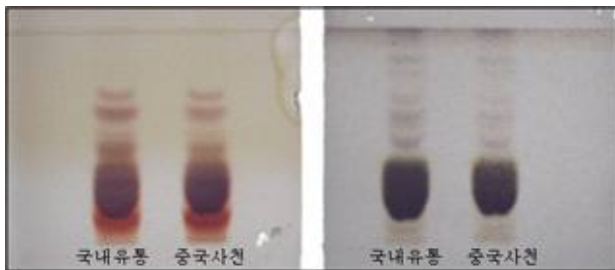


그림 4. 국내 유통, 중국 사천성산 사군자 TLC 결과

2.1.2. 최적 추출 조건 설정

가. 추출 방법 실험

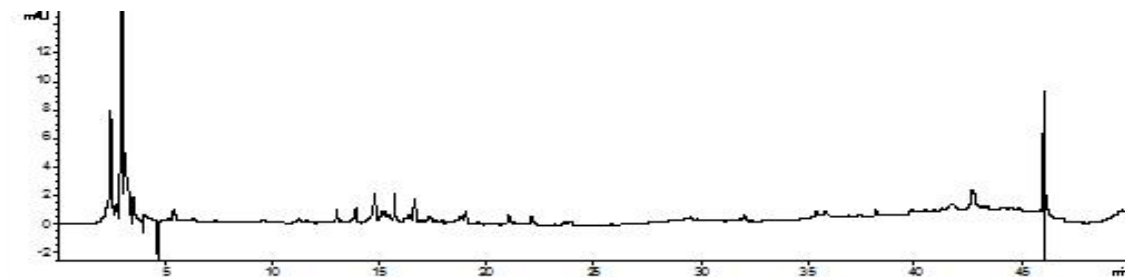
- 최적의 추출 방법 정립을 위하여 초음파 추출과 환류냉각추출 시행 후 비교 분석을 진행함
- 초음파 추출
 - 분쇄 사군자 100 g을 10배수 (1 L) 70 % 에탄올에 투입 후 1시간 동안 초음파 추출을 3회 진행하여 37.77 g의 추출물을 수득함 (수득률 37.77 %)
- 환류냉각 추출
 - 분쇄 사군자 50 g을 10배수 (500 mL) 70 % 에탄올에 투입 후 1시간 동안 초음파 추출을 3회 진행하여 22.17 g의 추출물을 수득함 (수득률 44.34 %)
- HPLC 분석
 - 검액: 추출액을 여과하여 사용함
 - 주입량: 20 uL
 - 유속: 1.0 mL/min
 - 이동상: gradient 조건 (이동상 A: D.W., 이동상 B: ACN)
 - 이동상 조건:

표 2. HPLC 이동상 조건

시간 (분)	이동상 A	이동상 B
0	97	3
5	97	3
20	70	30
40	0	100
42	0	100
45	97	3
50	97	3

- 칼럼 온도: 30 °C
- 분석 파장: 280nm
- 분석 칼럼: Inertsil® ODS-3 (5mm, 4.6×250mm)
- 분석 기기: Agilent 1260 Infinity

- HPLC 분석 결과 (초음파 추출, 환류냉각 추출)



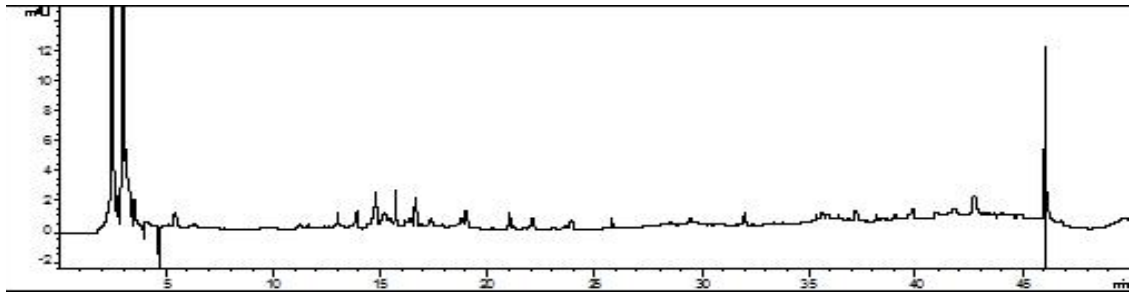


그림 5. 사군자 초음파 추출 (위), 환류냉각 추출 (아래) 크로마토그램

- 초음파 추출과 환류냉각 추출의 크로마토그램은 유사하나 수율은 환류냉각추출이 더 높으므로 환류냉각 추출이 적합함

나. 추출 용매 실험

- 추출방법은 환류냉각추출로 정립 되었으므로 추출 용매를 종류 별로 추출 후 비교 분석을 진행함
- 30% 에탄올 추출
 - 분쇄 사군자 50 g을 10배수 (500 mL) 30 % 에탄올에 투입 후 1시간 동안 초음파 추출을 3회 진행하여 22.80 g의 추출물을 수득함 (수득률 45.60 %)
- 50% 에탄올 추출
 - 분쇄 사군자 50 g을 10배수 (500 mL) 50 % 에탄올에 투입 후 1시간 동안 초음파 추출을 3회 진행하여 22.04 g의 추출물을 수득함 (수득률 44.08 %)
- 70% 에탄올 추출
 - 분쇄 사군자 50 g을 10배수 (500 mL) 70 % 에탄올에 투입 후 1시간 동안 초음파 추출을 3회 진행하여 22.17 g의 추출물을 수득함 (수득률 44.34 %)
- HPLC 분석
 - 검액: 추출액을 여과하여 사용함
 - 주입량: 20 μ L
 - 유속: 1.0 mL/min
 - 이동상: gradient 조건 (이동상 A: D.W., 이동상 B: ACN)
 - 이동상 조건

표 3. HPLC 이동상 조건

시간 (분)	이동상 A	이동상 B
0	97	3
5	97	3
20	70	30
40	0	100
42	0	100
45	97	3
50	97	3

- 칼럼 온도: 30 °C
 - 분석 파장: 280nm
 - 분석 칼럼: Inertsil® ODS-3 (5mm, 4.6×250mm)
 - 분석 기기: Agilent 1260 Infinity
- HPLC 분석 결과 (30% 에탄올, 50% 에탄올, 70% 에탄올 추출)
- 각각의 크로마토그램은 유사하며 수율도 유사하므로 원방법인 70% 에탄올 추출이 가장 적합하며, 70% 에탄올 환류냉각 추출을 최종 추출 방법으로 확립함

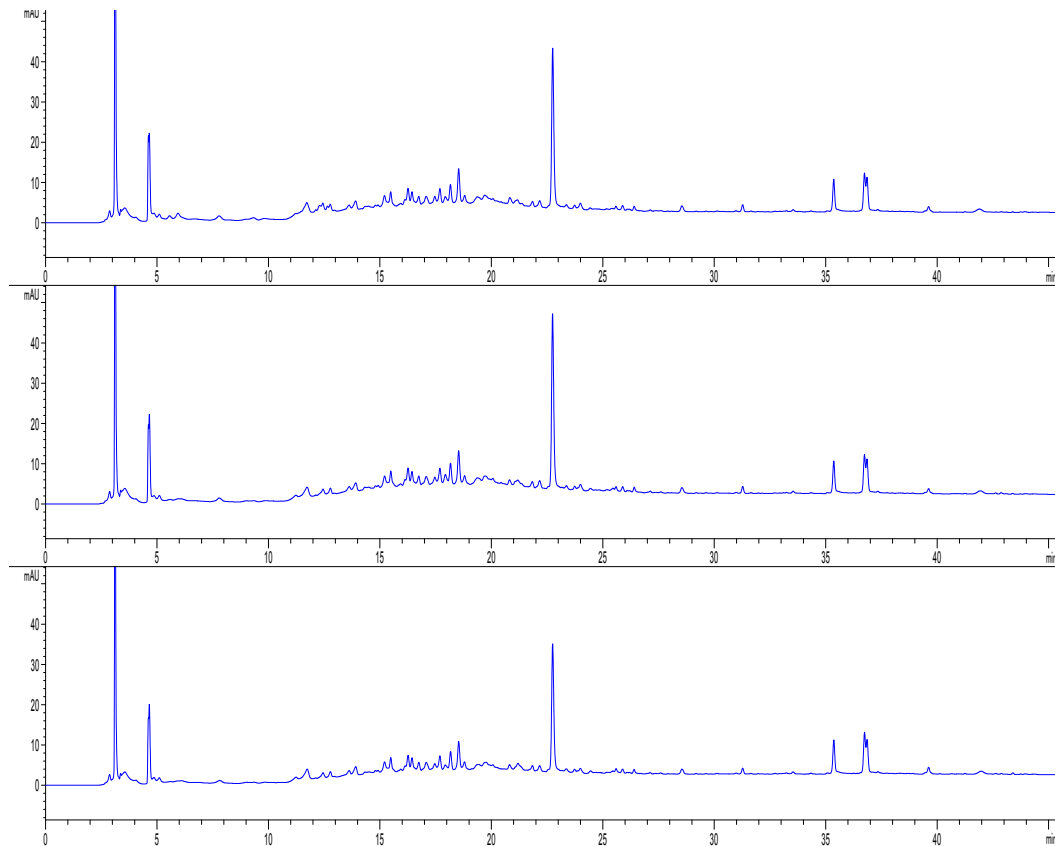


그림 6. 30% (위), 50% (가운데), 70% (아래) 에탄올 추출물 크로마토그램

2.1.3. Bioassay-guided fraction/isolation을 통한 분획 및 성분 연구

가. 사군자 용매 분획 및 성분 연구

- 용매 분획

- 사군자 70% 에탄올 환류냉각 추출물 147 g에 10배수 증류수 (1.5 L)를 투입하여 현탁, 동량의 헥산 (1.5 L) 투입 및 용매 분획 3회 실시 후 감압 농축 (8.42 g 수득), 수층에 동량의 클로로포름 (1.5 L) 투입 및 용매 분획 3회 실시 후 감압 농축 (1.60 g 수득), 수층에 동량의 초산에칠 (1.5 L) 투입 및 용매 분획 3회 실시 후 감압 농축 (0.16 g 수득), 수층에 동량의 수포화부탄올 (1.5 L) 투입 및 용매 분획 3회 실시 후 감압 농축 (4.73 g 수득), 수층 감압 농축 (115 g 수득)

- 시료 전처리 (OPA 전처리법)

- 표준품 (quisqualic acid, glutamic acid, arginine, asparagine)을 50 % 메탄올로 12.5 ppm으로 맞춰 여과 후 표준액으로 사용하며, 각 시료 5 mg을 정밀하게 칭량하여 50% 메탄올에 녹여 정확하게 1 mL로 하여 검액으로 사용하며, 표준액과 검액 200 μ L에 OPA solution 400 μ L 섞은 후 10분 이내 분석함

- HPLC 분석

- 주입량: 10 μ L
- 유속: 1.0 mL/min
- 이동상: gradient 조건 (이동상 A: 0.01M Sodium acetate buffer solution (pH 4.3), 이동상 B: MeOH)
- 이동상 조건:

표 4. HPLC 이동상 조건

시간 (분)	이동상 A	이동상 B
0	80	20
5	80	20
30	50	50
33	0	100
35	0	100

- 칼럼 온도: 30 $^{\circ}$ C
 - 분석 파장: 338 nm (reference 390.20 nm)
 - 분석 칼럼: Eclipse Plus C18 (5mm, 4.6 \times 250mm)
 - 분석 기기: Agilent 1200 Infinity
- HPLC 분석 결과 (사군자 추출물, 수층, 수포화부탄올층, 초산에칠층, 클로로포름층, 헥산층)

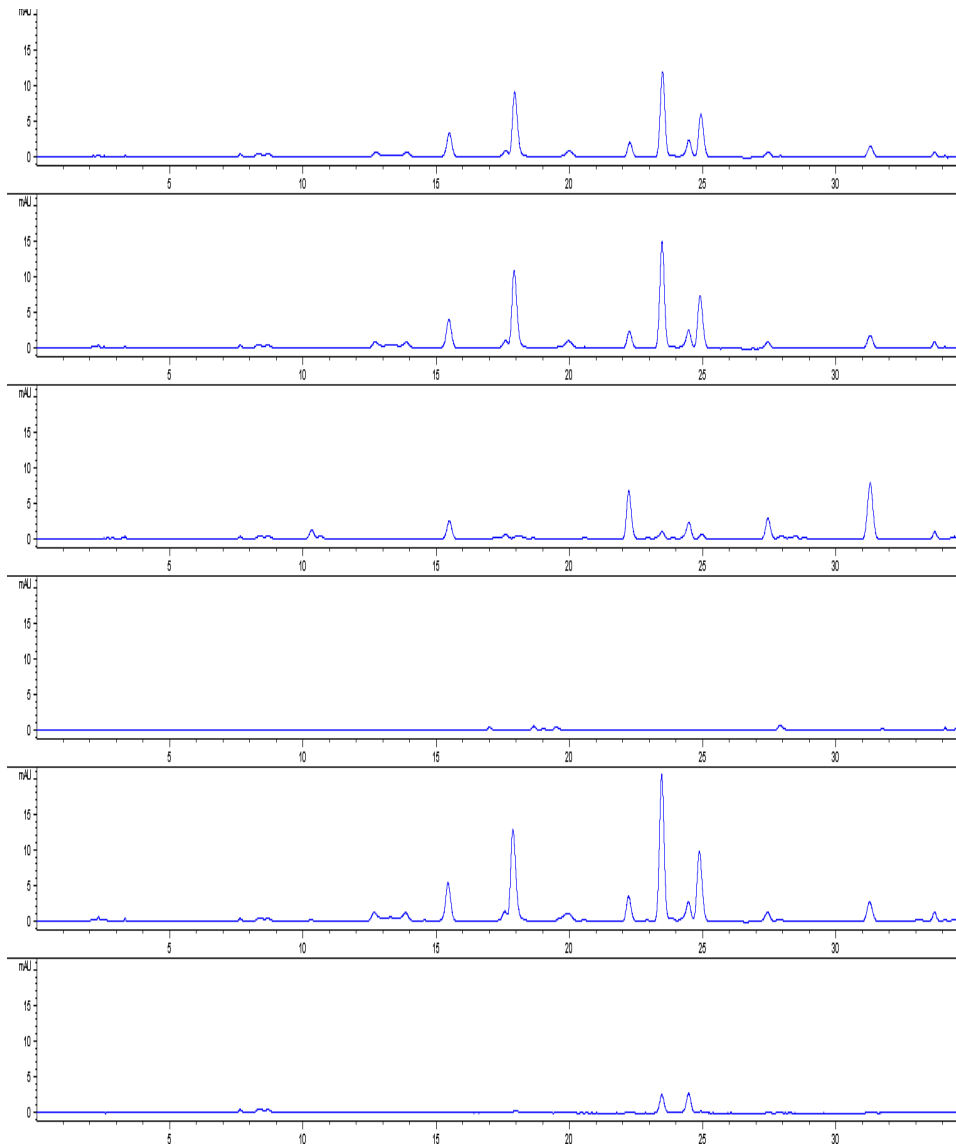


그림 7. 사군자 추출물, 수층, 수포화부탄올층, 초산에칠층, 클로로포름층, 헥산층 (위에서부터) 크로마토그램

- 수층은 추출물과 매우 유사하며 수포화부탄올층에는 asparagine이 이행했으며 초산에칠층에는 별다른 성분의 이행이 없었으며 클로로포름층은 수층과 매우 유사하며 이는 용매 분획시 수층이 이행되었기 때문으로 사료되며 헥산층에 glutamic acid가 이행되었음

2.1.4. 지표/유효 성분 설정 및 분석법 연구

가. 지표 성분 설정

- 사군자에 quiscalic acid 및 asparagine, arginine, glutamic acid 등의 아미노산이 함유되어있음을 문헌에서 검색했으며, 이에 아사의 사군자 추출물에 이 성분들의 함유 여부를 실험했으며 지표 성분을 설정함
- 시료 전처리 (OPA 전처리법)

- 표준품 (quisqualic acid, glutamic acid, arginine, asparagine)을 50 % 메탄올로 100 ppm으로 맞춰 여과 후 표준액으로 사용하며, 각 시료 5 mg을 정밀하게 칭량하여 50% 메탄올에 녹여 정확하게 1 mL로 하여 검액으로 사용하며, 표준액과 검액 200 μ L에 OPA solution 400 μ L 섞은 후 10분 이내 분석함

- HPLC 분석

- 주입량: 10 μ L
- 유속: 1.0 mL/min
- 이동상: gradient 조건 (이동상 A: 0.01M Sodium acetate buffer solution (pH 4.3), 이동상 B: MeOH)
- 이동상 조건:

표 5. HPLC 이동상 조건

시간 (분)	이동상 A	이동상 B
0	80	20
5	80	20
30	50	50
33	0	100
35	0	100

- 칼럼 온도: 30 $^{\circ}$ C
- 분석 파장: 338 nm (reference 390.20 nm)
- 분석 칼럼: Eclipse Plus C18 (5mm, 4.6 \times 250mm)
- 분석 기기: Agilent 1200 Infinity

- HPLC 분석 결과 (표준품, 사군자 추출물)

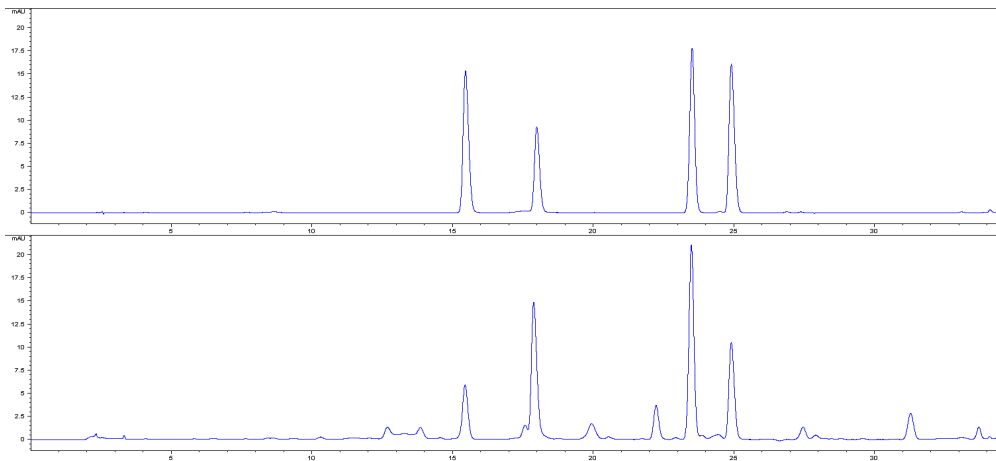


그림 8. 표준품 (asparagine, quisqualic acid, arginine, glutamic acid)과 사군자 추출물 크로마토그램

- 문헌 조사와 마찬가지로 사군자 추출물에는 asparagine, quisqualic acid, arginine, glutamic acid이 함유 되어 있었으며, 이중 quisqualic acid만 사군자에서 검출되는 특이적인 화합물이며 나머지 asparagine, arginine, glutamic acid는 일반적인 아미노산이므로, quisqualic acid를 지표 성분으로 설정함

나. 지표성분 기준 규격 설정 (원생약)

- 사군자 원생약 적합유무를 판단 할 수 있는 QC 기준설정을 제시하고자 용매와 온도간 초음파 추출을 진행하여 적합한 온도 및 용매조건을 설정함
- 추출 용매 50 % MeOH, 1 g/200 mL, 온도 50 °C, 1시간일 때, 지표성분 Quisqualic acid 함량 범위는 13.225 ~ 13.813 mg/g로 설정
- 원생약 규격화 QC 분석법, 증명서, 확인서를 지속적으로 관리하면 사군자 제조에 사용되는 원재료의 교차 혼입 우려가 없을 것으로 사료됨
- 위와 같은 결과를 통하여, 사군자에 사용되는 원생약 (quisqualis indica)의 지표성분을 quisqualic acid로 설정하는데 충분한 타당성이 있다고 판단됨

- 추출 용매별 지표성분 함량

용매조건	Quisqualic acid (Area)	시험용액농도 (ug/ml)	시료량 (mg)	희석용량 (ml)	표준품 순도 (%)	함량 (%)	mg/g
water	183.3	54.60	519	100	98	1.031	10.310
50%MeOH	203.9	60.73	515	100	98	1.156	11.557
70%MeOH	173.3	51.62	522	100	98	0.969	9.691
100%MeOH	76.9	22.91	521	100	98	0.431	4.309

- 추출 온도별 지표성분 함량

온도조건	Quisqualic acid (Area)	시험용액 농도 (ug/ml)	시료량 (mg)	희석용량 (ml)	표준품 순도 (%)	함량 (%)	mg/g
30°C	200.9	59.84	506	100	98	1.159	11.590
40°C	200.3	59.66	515	100	98	1.135	11.353
50°C	243.7	72.59	515	100	98	1.381	13.813
60°C	199.1	59.30	515	100	98	1.129	11.285

- 추출 시간별 지표성분 함량

시간	Quisqualic acid (Area)	시험용액농도 (ug/ml)	시료량 (mg)	희석용량 (ml)	표준품 순도 (%)	함량 (%)	mg/g
1시간	234.5	68.53	503	100	98	1.335	13.351
2시간	229.7	67.13	505	100	98	1.303	13.027
3시간	225.8	66.00	510	100	98	1.268	12.682

- 추출 시료 농도별 지표성분 함량

추출량	Quisqualic acid (Area)	시험용액농도 (ug/ml)	시료량 (mg)	희석용량 (ml)	표준품 순도 (%)	함량 (%)	mg/g
500mg	247.3	67.74	502	100	98	1.322	13.225
1g	430.9	120.17	1022	100	98	1.152	11.523

다. HPLC 분석법 연구

- 사군자 분석법에 관한 문헌 조사를 진행하였으며, 아미노산 분석법의 일종인 OPA 전처리 분석법을 검색 후 이 방법으로 분석하였으며 분석법 최적화 과정을 통하여 최종 분석 방법으로 아래와 같이 확립함

- 샘플 전처리

- 표준품 (quisqualic acid, glutamic acid, arginine, asparagine)을 50 % 메탄올로 용해 및 여과 후 표준액으로 사용하며, 샘플 5 mg을 정밀하게 칭량하여 50% 메탄올에 녹여 정확하게 1 mL로 하여 검액으로 사용하며, 표준액과 검액 200 μ L에 OPA solution 400 μ L 섞은 후 10분 이내 분석함

- HPLC 분석 방법

- 주입량: 10 μ L
- 유속: 1.0 mL/min
- 이동상: gradient 조건 (이동상 A: 0.01M Sodium acetate buffer solution (pH 4.3), 이동상 B: MeOH)
- 이동상 조건:

표 6. HPLC 이동상 조건

시간 (분)	이동상 A	이동상 B
0	80	20
5	80	20
30	50	50
33	0	100
35	0	100

- 칼럼 온도: 30 $^{\circ}$ C
- 분석 파장: 338 nm (reference 390.20 nm)
- 분석 칼럼: Eclipse Plus C18 (5mm, 4.6 \times 250mm)
- 분석 기기: HPLC

- HPLC 분석 결과 (표준품, 사군자 추출물)

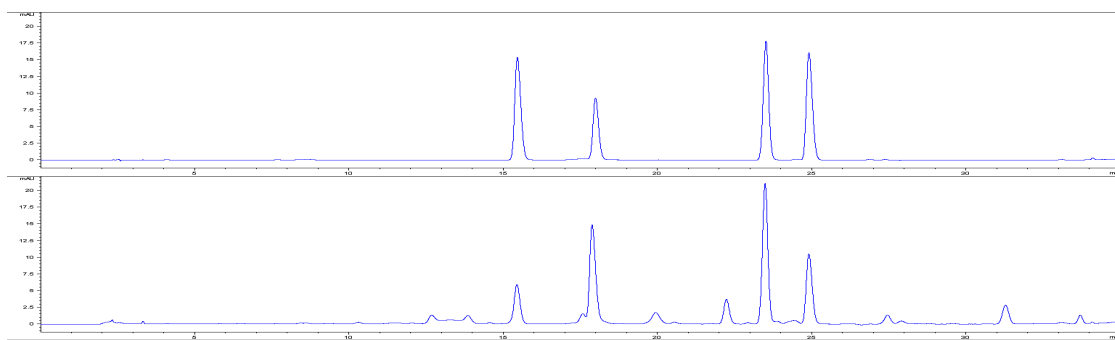


그림 9. 표준품 (asparagine, quisqualic acid, arginine, glutamic acid)과 사군자 추출물 크로마토그램

라. TLC 분석법 연구

- HPLC에 검출되는 이외의 성분 모니터링을 위해 TLC 분석법을 확립함

- TLC 조건

- TLC 종류: silicagel
- 전개용매: N-butanol, glacial acetic acid and water (3:1:1, v/v)
- Spray reagent: 2% ninhydrin, 10% H₂SO₄

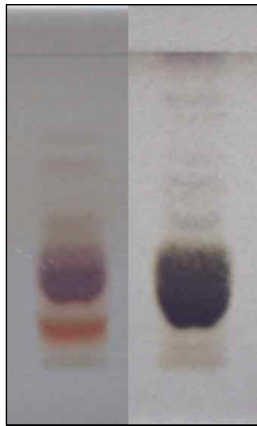


그림 10. 사군자 추출물의 TLC 분석 결과 (좌: 2% ninhydrin, 우: 10% H₂SO₄)

○ 대량생산공정 기반 연구

2.1.5. 공정연구 진행 및 원료 표준화 방안

가. Large scale 생산 및 사군자추출분말 표준화

(1) Large scale 생산 제조공정도 확립

- GMP 공장시설((주)대호양행)을 이용하여 총 3 batch의 대량생산 원료를 생산함



그림 11. Scale-up 제조 공정 과정(대호양행)

- 사군자 50kg 대량생산을 3회 이상 완료하였으며, 기존 Pilot scale에서의 결과와

비교하였을 때 최종 product 값이 유사하게 나왔음 (Pilot 최종값 : 10.88 mg/g. Large scale 최종값 : 10.43 mg/g). 최종 단계에서 분무건조와 동결건조 효율을 비교했을 때, 지표성분 함량이 0.5 mg/g차이 미만으로 나타남. 추가적으로 식품의약품안전처의 공인시험기관인 (사)한국건강기능식품협회 3 LOT에 대한 각각의 지표성분 시험성적서를 확보하였음

- 이를 통해 최종 사군자추출분말 원료의 지표성분 규격을 10 mg/g으로 설정하였으며 원료 기준 규격범위 80 ~ 120 %내에 표준화된 사군자추출분말 생산이 가능함

제조공정도-50kg

제조공정	식품, 식품첨가물	조건	고형분(%)	지표성분 함량 (mg/g)	수율 (kg)
원재료	사군자 종자	50 kg			50
↓					
1) 1차 추출	70% 주정 (원재료 중량의 10배)	80℃±5, 6시간	4.5±0.5%	0.7mg/g	
↓					
2) 여과		5 µm cartridge filter			
↓					
3) 2차 추출	70% 주정 (원재료 중량의 10배)	80℃±5, 6시간	1.8±0.5%	0.26mg/g	
↓					
4) 여과		5 µm cartridge filter			
↓					
5) 농축		고형분 25±2% 25±2 Brix	25% 25 Brix	4.7mg/g	83
↓					
6) 여과		80 mesh			
↓					
7) 배합		고형분 무게 대비 1:1 텍스트린 첨가	30~35 Brix		
↓					
8) 분무건조		송풍170℃±5, 배풍75℃±5			
↓					
9) 여과		60 mesh			
↓					
10) 포장				10.43mg/g	36

그림 12. 사군자주정추출분말 대량생산 표준 제조공정도

제 D2018032012 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	사군자주정추출분말(HU-033)	제조일자 (유통기한)	2017-08-18	
의뢰인	업체명	(주)유온스네츄얼	성명	권정은
	주소	충청북도 진천군 이원면 진광로 700-104		
제조번호	Lot 1.	접수년월일	2018-03-23	
검사의뢰목적	채출용	접수번호	D2018032012	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2018-04-13

시험·검사 책임자 : 이철구

검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Quisqualic acid(%)	1.11%(1.11, 1.11, 1.12)	김지미

분석법-업체제공

- * 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- * 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과관은 별지로 작성 가능합니다.

2018년 4월 13일

한국기능식품연구원 장



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031)287-1401, (031)287-1628-0400-1



KHSI



2.1.6. 원료 생산단가

가. 사군자추출분말 제조 원가

- 사군자 원생약 단가 9,500원, 주정 70 % 추출로 원생약 200 kg 기준 5 batch 연속 생산 적용시, 사용된 주정 약 60 % 회수 후 재사용 반영

사군자추출분말(200kg) * 5 batch 생산				
내역	상세내역	금액(원)	단가(원)	수량
재료비	사군자원생약	9,500,000	9,500	1,000 kg
	주정	12,012,000	1,650	7,280 L (회수율 60% 반영)
	덱스트린	400,000	1,000	
	재료비 합/kg	29,216		
가공비	외주가공비 및 제조경비/kg	16,667	예상 생산 원료량 750kg 기준	
합계		45,883	사군자추출분말 kg당	

나. 경쟁 제품과의 가격 경쟁력

- 전립선 건강 관련 주요 제품으로는 쏘팔메토 추출물 제품이 독점적 시장 형성
- 쏘팔메토 제품 온라인 판매가 22,000~36,000원으로 형성
- 사군자추출분말은 현재 복용량 1, 2g으로 각각 임상시험 진행중으로 1g은 13,700원 대, 2g은 27,500원대로 경쟁 제품 쏘팔메토와 가격 경쟁력을 확보 할 수 있을 것으로 사료됨

3개월분 기준	제품가격(원)	구분
전립소 쏘팔메토(CJ)-500mg(단독)	22,000	온라인판매가
전립소 쏘팔메토(CJ)-800mg(복합)	36,000	
쏘팔메토 파워업(일약약품) -1,000mg(복합)	26,000	
사군자추출분말(200kg) * 5 batch 생산		
3개월 기준	원료가(원)	예상 제품가(원)
복용량 2g/day	8,258	27,527
복용량 1g/day	4,129	13,763

2.1.7. 기준 및 시험법 설정 및 데이터 확보

가. 규격항목에 대한 공인시험 분석

- 건강기능식품의 기준규격 (기능/지표성분, 유해물질)에 대한 적합성을 판단하고자함.
식품의약품안전처의 공인시험기관인 (사)한국건강기능식품협회를 통하여 사군자추출분말 규격을 검증하였음

(1) 유해물질 규격 설정에 관한 자료

- 사군자추출물분말의 중금속 실험을 진행한 결과, 납 최대 0.0307 mg/kg, 카드뮴 최대 0.0432 mg/kg, 총비소 최대 0.0464 mg/kg로 검출되었고 총 수은은 0.0010 mg/kg으로 검출되었음. 또한, 대장균군은 실험결과 원료에서 음성임이 확인되었고, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 따라 대장균군의 규격을 음성으로 설정하였음

(2) 기준규격설정

- 본 연구 결과 사군자주정추출분말의 기준 규격은 다음과 같음

표 7. 사군자주정추출분말 기준규격

시험항목		실측값	제안규격
성상		이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 노란색~황갈색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 노란색~황갈색의 분말
Quisqualic acid 함량		10.43mg/g	10.0mg/g의 80~120%
중금속	납	0.0307 mg/kg	1.0mg/kg 이하
	카드뮴	0.0432 mg/kg	1.0mg/kg 이하
	총비소	0.0464 mg/kg	1.0mg/kg 이하
	총수은	0.0010 mg/kg	1.0mg/kg 이하
미생물	대장균	음성	음성

제: D2018051464 호
문서파일

시험·검사성적서

배출장	사군자주정추출분말(HU-033)	제조일자 (유통기한)	2017-08-18	
외뢰인	업체명	(주)유온스비유림	성명	김정순
	주소	충청북도 천원군 이회면 김정로 709-104		
제품번호	Lot 1	접수년월일	2018-05-17	
인사내외목적	제품용	접수번호	D2018051464	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일: 2018-05-25

시험·검사 책임자: 이정규

검사관련 총 책임자: 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
검상	어미, 이취가 없고 고유취 향미가 없는 조면 노란색 -활활성의 분말	한아름
대용균군	음성	고민희

- ※ 귀 기관은 외뢰된 시험·검사 항목만큼 이상으로 판·정합니다.
- ※ 검역이 우측일 경우 시험·검사 및 검사안은 별지로 발송 가능합니다.

2018년 5월 25일

한국기능식품연구원



100한국기능식품시험협회 무궁 한국기능식품연구원 <http://www.kfsri.co.kr> 전화번호 031-828-0400-1

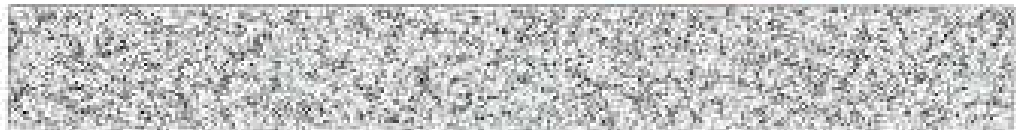


그림 13. 사군자주정추출분말의 기능성 원료 건강기능식품 규격항목 공인시험 분석

제 D2018032012 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	사군자주정추출분말(HU-033)	제조일자 (유통기한)	2017-08-18	
의뢰인	업체명	(주)유온스네츄얼	성명	권창운
	주소	충청북도 진천군 이원면 진광로 709-104		
제조번호	Lot 1.	접수년월일	2018-03-23	
검사의의목적	제출용	접수번호	D2018032012	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2018-04-13

시험·검사 책임자 : 이철구

검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Quisqualic acid(%)	1.11%(1.11, 1.11, 1.12)	김지미

분석법-업체제공

- * 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- * 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.

2018년 4월 13일

한국기능식품연구원 장



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031) 8282-100 / FAX (031) 8282-0400-1



KHSI



그림 14. 사군자주정추출분말의 기능성 원료 건강기능식품 규격항목 공인시험 분석

제 D2018032014 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	사군자주정추출분말(HU-033)		제조일자 (유통기한)	2017-09-11
의뢰인	업체명	(주)휴온스네츨린	성명	전청운
	주소	충청북도 진천군 이월면 진광로 709-104		
제조번호	Lot 3.	접수년월일	2018-03-23	
검사의뢰목적	제출용	접수번호	D2018032014	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2018-04-13

시험·검사 책임자 : 이정구

검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Quisqualic acid(%)	1.09%(1.08, 1.10, 1.08)	김치미

분석법-업체제공

※ 위 관청은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2018년 4월 13일

한국기능식품연구원장



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.kfsri.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX (031)628-0400-1



그림 15. 사군자주정추출분말의 기능성 원료 건강기능식품 규격항목 공인시험 분석

제 D2018032013 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	사군자주정추출분말(HU-033)	제조일자 (유통기한)	2017-09-01	
의뢰인	업체명	(주)유온스내츄얼	성명	한창운
	주소	충청북도 진천군 이월면 진광로 709-104		
제조번호	Lot 2.	접수년월일	2018-03-23	
검사의뢰목적	제품용	접수번호	D2018032013	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2018-04-13

시험·검사 책임자 : 이경구

검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Quisqualic acid(%)	0.94%(0.93, 0.96, 0.92)	김지미

분석법-업체제공

※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 적분이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.

2018년 4월 13일

한국기능식품연구원 장



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031)528-2401 FAX (031)528-0400-1



KHSI



그림 16. 사군자주정추출분말의 기능성 원료 건강기능식품 규격항목 공인시험

제 D2017110198 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	사군자주정추출분말(HU-033)	제조일자 (유통기한)	2017-08-18	
의뢰인	업체명	(주)유온스내츄얼	성명	원정은
	주소	충청북도 진천군 이월면 진광로 709-104		
제조번호		접수년월일	2017-11-01	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2017110198	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2017-11-14

시험·검사 책임자 : 이정구

검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
열량(Kcal/100g)	330.60 Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	70.62%	한아름
조단백질(%)	8.70%	김정숙
조지방(%)	1.48%	이수경
나트륨(mg/100g)	33.38mg/100g	김수희

* 위 결과는 의뢰인 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

* 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2017년 11월 14일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfsr.or.kr> 전화번호 (031) 825-7000 FAX 11628-0400-1



그림 18. 사군자주정추출분말의 기능성 원료 건강기능식품 규격항목 공인시험 분석

제 D2017110197 호
문서화인

시험·검사성적서

제품명	사군자주정추출분말(HU-033)	제조일자 (유통기한)	2017-08-18	
의뢰인	업체명	(주)휴온스내츄럴	성명	천청운
	주소	충청북도 진천군 이원면 진광로 709-104		
제조번호		접수년월일	2017-11-01	
검사의뢰목적	제출용	접수번호	D2017110197	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일: 2017-11-07

시험·검사 책임자: 이정구

검사관련 총 책임자: 김진희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Diazinon(mg/kg)	불검출	김용수
DDT(mg/kg)	불검출	김용수
Dicofol(mg/kg)	불검출	김용수
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김용수
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미
BHC(mg/kg)	불검출	김용수
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	김용수
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김용수
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	0.0000mg/kg	이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출	김용수
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수
Endosulfan(mg/kg)	불검출	김용수
Imazalil(mg/kg)	불검출	김용수
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	김용수



KHSI



그림 19. 사군자주정추출분말의 기능성 원료 건강기능식품 규격항목 공인시험 분석

시험 - 검사 항목	시험 - 검사 결과	시험 - 검사 한
Iprodisone(mg/kg)	불검출	검출수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이전미
Carburethion(mg/kg)	불검출	이전미
Captan(mg/kg)	불검출	검출수
Quintozone(mg/kg)	불검출	검출수
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	검출수
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	검출수
Chlorpyrifos - methyl(mg/kg)	불검출	검출수
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	검출수
Toletofen - methyl(mg/kg)	불검출	검출수
Triadimefon(mg/kg)	불검출	검출수
Triazophos(mg/kg)	불검출	검출수
Triflumizole(mg/kg)	불검출	검출수
Triflumuron(mg/kg)	불검출	검출수
Thiamectoxam(mg/kg)	불검출	이전미
Parathion(mg/kg)	불검출	검출수
Parathion - methyl(mg/kg)	불검출	검출수
Permethrin(mg/kg)	불검출	검출수
Fenarimol(mg/kg)	불검출	검출수
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	검출수
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	검출수
Phenthoate(mg/kg)	불검출	검출수
Fenpropathrin(mg/kg)	불검출	검출수
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이전미
Phosmet(mg/kg)	불검출	검출수
Procymidone(mg/kg)	불검출	검출수
Prochloraz(mg/kg)	불검출	검출수
Profenofos(mg/kg)	불검출	검출수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	이전미
Flufenoxuron(mg/kg)	불검출	이전미
Pyraclorobin(mg/kg)	0.0001mg/kg	이전미
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	이전미



그림 20. 사군자주정추출분말의 기능성 원료 건강기능식품 규격항목 공인시험 분석

시험 - 검사항목	시험 - 검사 결과	시험-검사원
Pirimicarb(mg/kg)	불검출	김용수
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Fluthiasecoll(mg/kg)	불검출	김용수
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김용수

- * 이 편에는 오히려 시험 - 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- * 식량이 부족한 경우 시험 - 검사 및 검체량은 별지로 확인 가능합니다.

2017년 11월 7일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부산 분회/한국기능식품연구원 <http://www.kfsri.or.kr> 전화번호 051-709-11001-1 11029-11001-1



그림 21. 사군자주정추출분말의 기능성 원료 건강기능식품 규격항목 공인시험 분석

2.1.8. 사군자주정추출분말(quisqualic acid) 시험법 검증

가. 개요

- Quisqualic acid는 아미노산의 일종으로 천연에서는 Quisqualis 종의 종자에 함유되어 있는 특유 아미노산으로 분류되며, 사군자주정추출분말 중 Quisqualic acid를 분석하는데 있어 주어진 분석조건으로 전처리 하고 HPLC를 이용하여 분리, 정량하는 시험법의 유효성을 검증할 목적으로 함. 시험법의 유효성을 검증하기 위해서 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀도(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토함

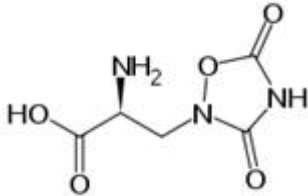
표 8. 사군자주정추출분말 시험법 검토항목 및 평가기준

항목		평가방법	설정값
특이성 (Specificity)		○ HPLC분석 시 머무름 시간 (Retention time) 과 λ_{max} 및 Peak의 간섭현상 유무 확인으로 검토	○ 검출시간: 약 15~16분대에 peak 검출 ○ λ_{max} : 338 nm (reference 390.2 nm) ○ Peak 간섭현상 발생 안 함
직선성 (Linearity)	표준용액	○ 표준용액 7개 농도로 3반복 ○ 직선성 확인, $R^2 > 0.99$	○ 표준용액 5 mg/100 mL을 기준으로 25 ~ 800 % ○ R^2 평균값 > 0.999
	시료	○ 시료 6개 농도로 3반복 ○ 직선성 확인, $R^2 > 0.99$	○ 시료량 2g/100mL을 기준으로 25 ~ 400% ○ R^2 평균값 > 0.99
정확성 (Accuracy)		○ 표준용액 3개 농도로 3반복, 회수율 검토 ○ 회수율 범위 98.0 ~ 102.0 % 이내에 들어와야 함	○ 추가표준용액 농도 2.5~20 ug/mL 범위 ○ 회수율(%): 98.661~101.108 %RSD: 0.70 ~ 0.93 %
정밀도 (Precision)		○ 4차 간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀도 평가 ○ 상대표준편차가 2.0 이하여야 함	○ 분석결과 - 함량평균: 11.174 mg/g, - SD 0.187 mg/g - %RSD: 1.673 %
범위 (Range)		○ 범위, 정확성, 재현성 검토	○ 12.5 ~ 400 ug/mL

나. 지표성분 및 시험방법

- 분석 물질

표 9. 분석물질(Quisqualic acid)의 정보

No.	점검 항목 (Check Feature)	내용 (Description)	비고 (Remark)
1	원 료 명	사군자주정추출분말	-
2	분석물질	퀴스쿠알산 (Quisqualic acid) CAS Number : 52809-07-1 Chemical formula : C ₅ H ₇ N ₃ O ₅ Molecular weight : 189.12 	-
3	성상	이미·이취가 없는 흰색을 띄는 분말	-
4	시험 기준	자사 기준	-

- 표준액 조제

: 퀴스쿠알산 표준품 약 8 mg 을 정밀하게 달아 20 mL 정용플라스크에 50 % 메탄올을 넣고, 50℃에서 30분 동안 초음파 추출 후 방냉하여 50% 메탄올로 정용한 뒤 희석하여 표준용액으로 사용

- 시험용액 조제

: 검체 2 g을 정밀하게 달아 200 mL 정용플라스크에 50 % 메탄올을 넣고, 50℃에서 30분 동안 초음파 추출 후 방냉하여 50 % 메탄올로 정용한다. 0.45 um PTFE 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 사용

- 유도체화(OPA법)

: 제조된 표준용액 및 시험용액을 10 uL 프탈다이알데하이드 시약(Phthaldialdehyde Reagent; OPA시약) 50 uL 부피로 혼합하여 6분간 반응을 진행한 후 주입하여 분석
: Agilent 1260 series system에 sampler injector program을 사용하여 유도체화 반응에 적용

1) 표준용액 및 시험용액에서 10uL를 취함

- 2) 프탈다이알데하이드 시약(OPA시약)에서 50 uL를 취함
 - 3) 60 uL를 최대속도로 10번 혼합
 - 4) 6분간 반응
 - 5) 60 uL 주입
- 분석조건

표 10. 시험기기의 분석조건

유 량	1.0 mL/분																											
칼 럼 온 도	30 °C																											
검 출 기	광다이오드어레이검출기 (전체스펙트럼 스캔 200~400nm, 측정파장338 nm, reference 390.2 nm)																											
칼 럼	Eclipse Plus C18 안지름 4.6 mm, 길이 약 250 mm, 5 um 혹은 이와 동등한 것																											
주 입 량	60 uL (시험용액 10 uL + OPA 시약 50 uL)																											
이 동 상 A	0.2 mol/L 아세트산 51.0 mL 와 0.01 mol/L 아세트산나트륨 49.0 mL을 넣고 물을 넣어 1000 mL로 한다. - 0.2 mol/L 아세트산 조제법 : 11.4 mL 아세트산에 1000 mL 물을 넣는다 - 0.01 mol/L 아세트산나트륨 조제법 : 16.4 g 아세트산나트륨에 1000 mL 물 을 넣는다																											
이 동 상 B	MeOH																											
이 동 상 조 건	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간 min</th> <th>A %</th> <th>B %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>38</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>43</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table> <p>Post time : 3min</p>	시간 min	A %	B %	0	80	20	5	80	20	14	70	30	30	50	50	35	0	100	38	0	100	40	80	20	43	80	20
시간 min	A %	B %																										
0	80	20																										
5	80	20																										
14	70	30																										
30	50	50																										
35	0	100																										
38	0	100																										
40	80	20																										
43	80	20																										

다. 시험법 검증 결과

- 특이성

- 사군자주정추출분말 중 Quisqualic acid의 Retention Time과 Peak 분리도 확인
Quisqualic acid의 표준물질과 사군자주정추출분말을 위의 분석법으로 분석한 결과,
검출된 Quisqualic acid Peak가 동일 시간대인 약 15분대에 검출되어 동일 물질임을

확인함. 또한 시험용액에서 Quisqualic acid이 단일 Peak로 다른 Peak와 완전히 분리됨을 확인하였으며 표준용액 및 시험 용액의 크로마토그램은 아래와 같음 <그림 22>

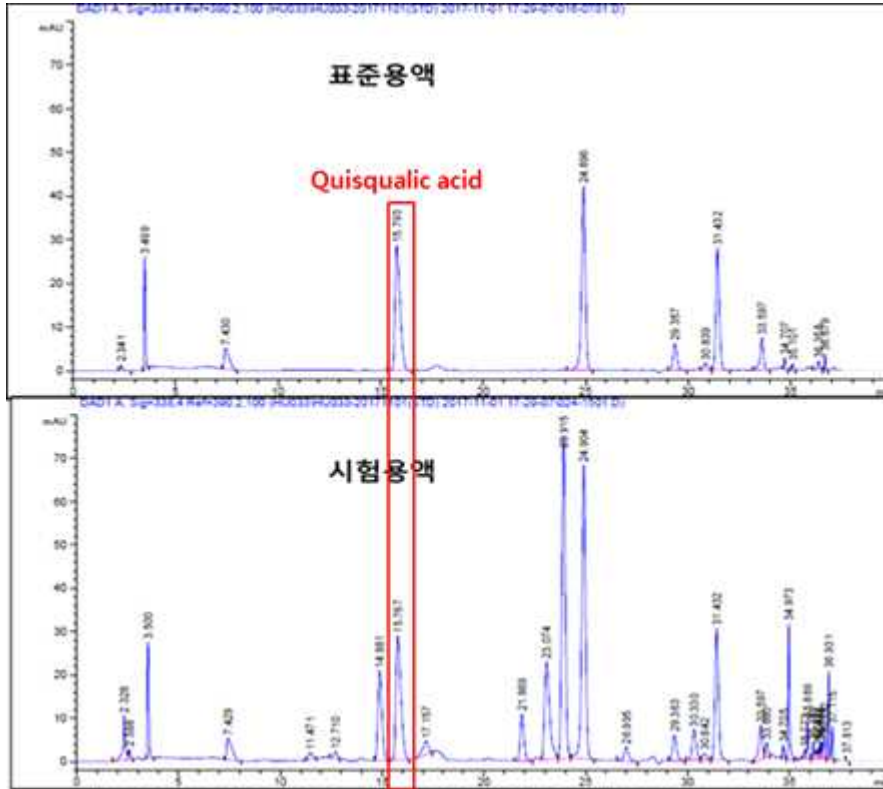


그림 22. 표준용액과 시험용액 중 Quisqualic acid의 Chromatogram

- 사군자주정추출분말 중 Quisqualic acid의 Spectrum과 peak purity 확인
표준용액 Quisqualic acid와 시험용액에서 검출된 Quisqualic acid의 스펙트럼을 확인한 결과 그림. 22와 같이 동일한 패턴의 스펙트럼을 가짐을 확인 할 수 있었으며, λ_{max} 는 338 nm임을 확인함. 또한 표준용액의 농도를 2.5~400 ug/mL의 peak를 확인한 결과도 동일한 패턴이었으며, 시험용액 중 Quisqualic acid peak의 5점 purity 또한 일치하여 단일 물질임을 확인함 (그림 23~25)

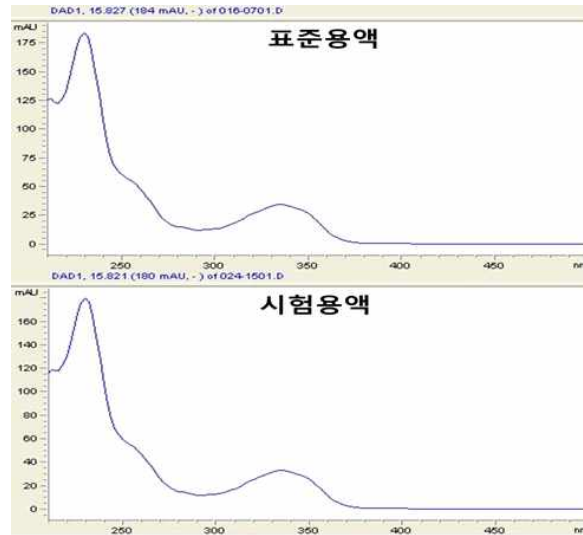


그림 23. 표준용액과 시험용액 중 Quisqualic acid의 UV Spectrum

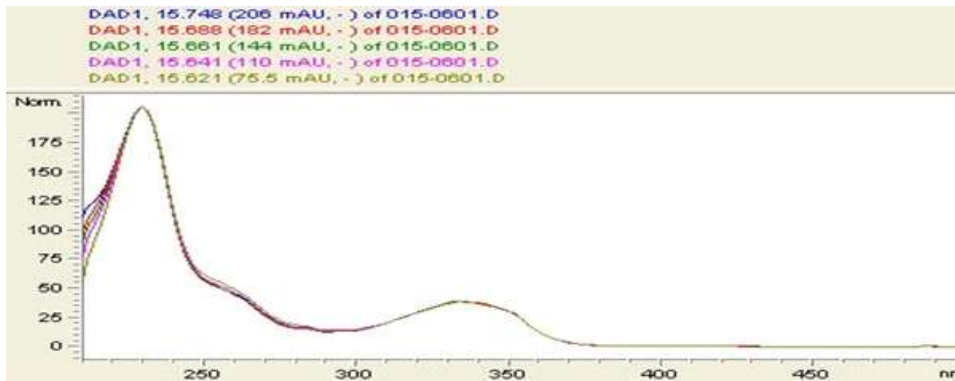


그림 24. 표준물질 농도 100, 150, 200, 250, 400ug/mL에서 Quisqualic acid의 UV Spectrum

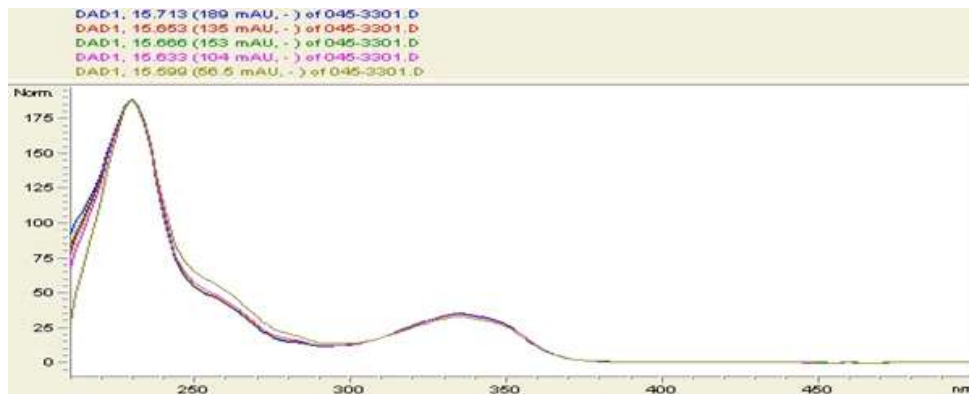


그림 25. Peak purity test Quisqualic acid peak 5점의 Spectrum

- 직선성(Libearity)

- 표준용액 중 Quisqualic acid 직선성 확인(Standard Linearity)

표준물질을 농도별로 제조하여 3회 분석한 결과로 직선성을 평가하였으며, 약 100ug/mL의 농도를 목적농도 100%로 설정하여 12.5%~400% 범위에서 평가한 결과 Quisqualic acid은 약 0~400ug/mL에서 직선성이 확인되었고, 이때 직선의 상관계수

는 해당농도범위에서 평균 $R^2 = 0.9978$ 로 나타남 <표 11~13>

표 11. Quisqualic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성(1회 실험)

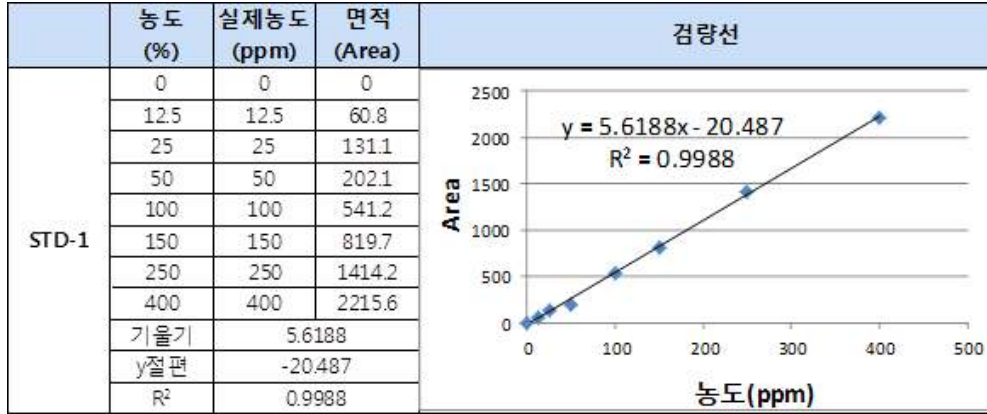


표 12. Quisqualic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성(2회 실험)

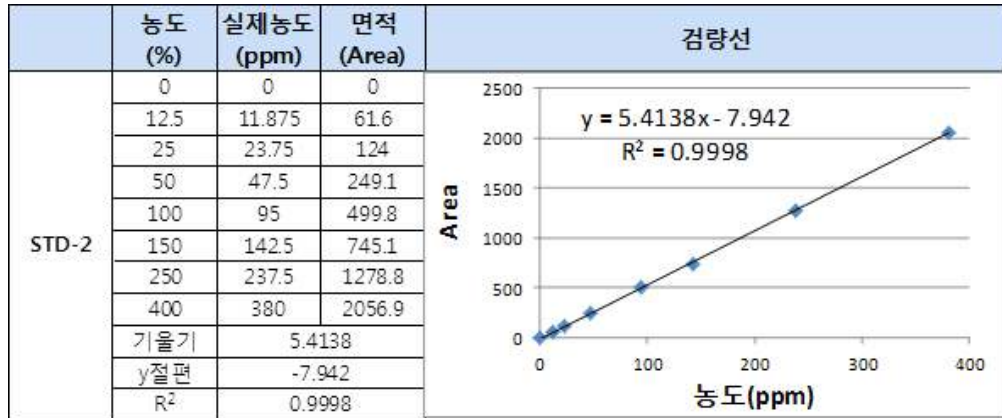
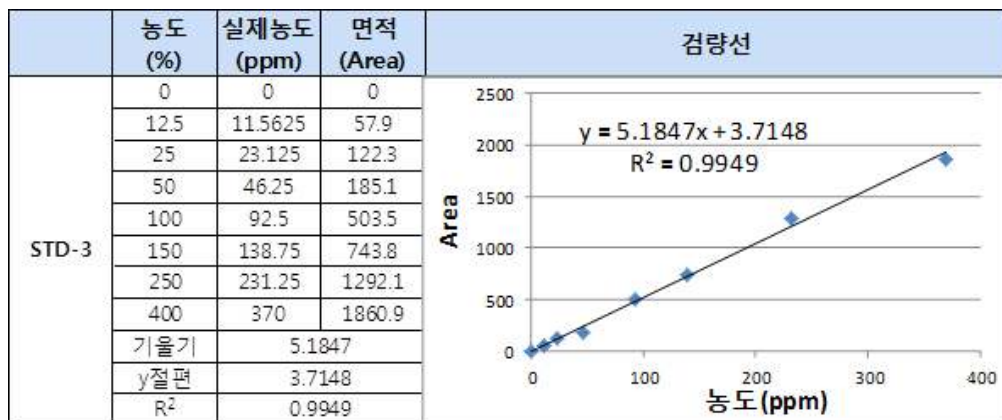


표 13. Quisqualic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성(3회 실험)



- 시료 중 Quisqualic acid 직선성 확인(Sample Linearity)

시료를 농도별로 제조하여 3회 분석한 결과로 직선성을 평가하였으며, 시험용액 농도 약 10 mg/mL의 농도를 목적농도 100%로 설정하여 25%~200% 범위에서 평가한 결과 Quisqualic acid의 시료는 약 2.5~20 mg/mL에서 시료의 직선성이 확인되

었고, 이때 직선의 상관계수는 해당농도범위에서 평균 R2=0.9983로 나타남 (표 14~16)

표 14. 시료 중 Quisqualic acid에 대한 검량선 작성(1회 실험)

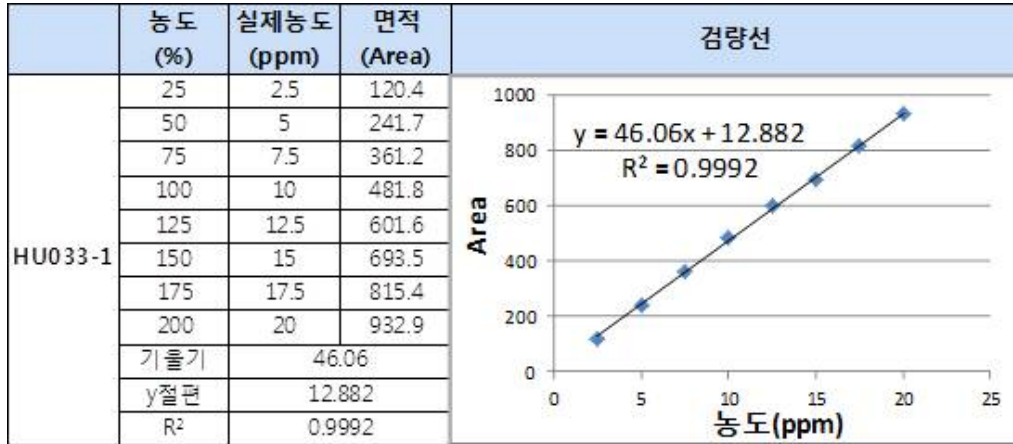


표 15. 시료 중 Quisqualic acid에 대한 검량선 작성(2회 실험)

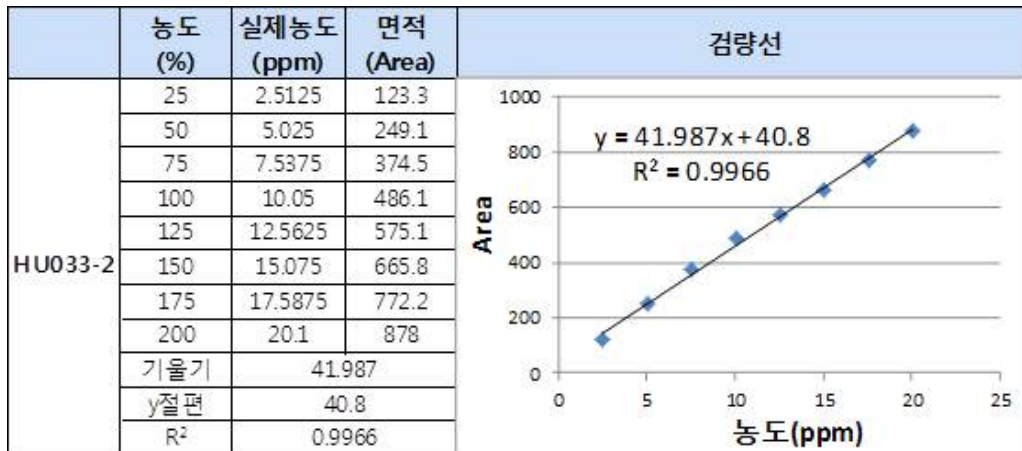
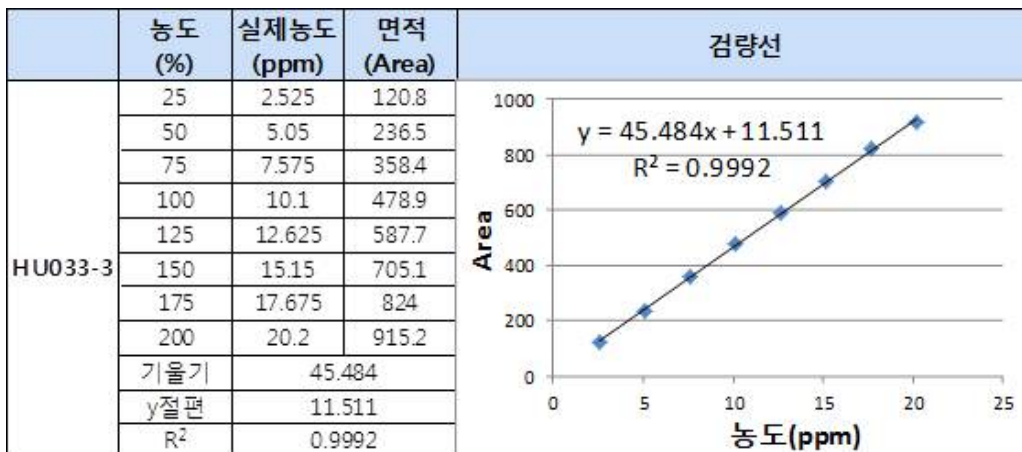


표 16. 시료 중 Quisqualic acid에 대한 검량선 작성(3회 실험)



- 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery)

- 시험방법의 정확성을 측정하기 위하여 사군자주정추출분말 약 2 g을 취한 후 표준 용액 약 2.5, 10, 20 ug/mL의 농도를 50 % 메탄올을 넣어 전처리를 한 후 200 mL로 정용하여 그 회수율을 측정함 (최종농도 : 500 ug/200 mL, 2000 ug/200 mL, 4000 ug/200 mL). 표준용액 약 2.5, 10, 20 ug/mL 농도에서 전체 회수율 평균은 100.3 %로 나타냄

표. 17. Quisqualic acid의 농도별 정확성, 회수율 확인

STD conc. (ug/mL)	원료(mg)	추가된 Quisqualic acid 함량(ug)	검출된 Area	시료 중 Quisqualic acid 농도(ug/mL)	원료 2g당 Quisqualic acid 농도(ug/mL)	평균 (ug/mL)	회수율(%)	평균(%)	RSD(%)
HU033①	2001.15	-	559.34949	100.71874	100.66086	100.33780	-		
HU033②	2000.10		558.22864	100.52385	100.51882				
HU033③	2000.01		554.26257	99.83421	99.83372				
19.6098	2001.15	3921.96	671.90924	120.29095	100.38543		101.508	100.995	0.703
	2001.65		670.56110	120.05653	100.41051	100.185			
	2001.50		671.76636	120.26610	100.40299	101.292			
9.8000	2000.08	1960.00	612.27997	109.92244	100.33176		97.864	98.661	0.926
	2000.03		612.60175	109.97840	100.32925	98.461			
	2000.05		613.28265	110.09679	100.33025	99.659			
24520	2000.02	490.39	571.47510	102.82718	100.32875		101.895	101.108	0.809
	2001.15		571.69830	102.86599	100.38543	101.166			
	2001.08		571.55066	102.84032	100.38192	100.263			

- 정밀성(Precision)

- 반복성 및 분석 재현성(Reproducibility, Intermediate precision) 시험을 위해 분석 장비 및 분석자, 분석일자를 달리하여 분석을 진행함. <표. 18~21~>의 결과와 같이 10 mg/mL의 농도를 6회 반복 실험하여 측정치를 비교한 결과 평균함량은 11.174 mg/g(1.1174%)이었으며, SD값은 0.187 mg/g, %RSD값은 1.673 %로 확인됨. 사용한 실험장비는 Agilent 1260 infinity (관리번호 R-B-040) 와 Agilent 1200 infinity (관리번호 R-P-035) 두 장비를 사용하였고 컬럼은 Eclipse Plus C18 (5 um, 4.6 × 250 mm)를 사용하였으며, 분석자는 천연물신약팀의 두 명의 시험자가 분석하였으며, 분석일자를 달리하여 분석함 <표. 18.>참조
- 분석장비간의 검토결과는 <표.19.>와 같으며, 분석자간의 검토 결과는 <표.20.>와 같고, 분석일자별 검토 결과는 <표. 21.>와 같음

표. 18 분석장비, 분석자, 분석일자간 분석 재현성 요약

	일자	기기	분석자	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1차	2017-11-15	Agilent 1260	A	11.086	11.174	0.187	1.673
2차	2017-11-16	Agilent 1260	B	11.113			
3차	2017-11-17	Agilent 1260	A	11.045			
4차	2017-11-24	Agilent 1200	B	11.451			

표. 19. 분석장비간 검토결과, Agilent HPLC 1260, Agilent HPLC 1200

분석장비	Area	Concentration (ug/mL)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
Agilent 1260 (2차)	536.43848	114.17281	11.188	11.113	0.082	0.735
	531.18884	113.06767	11.080			
	535.70355	114.01809	11.172			
	536.41730	114.16835	11.188			
	529.77728	112.77051	11.051			
	527.09973	112.20684	10.996			
Agilent 1200 (4차)	621.04248	116.94578	11.449	11.451	0.015	0.127
	621.83502	117.09425	11.465			
	621.63727	117.05721	11.461			
	620.40131	116.82566	11.437			
	619.91309	116.73420	11.430			
	621.80560	117.08874	11.462			

표. 20. 분석자간 검토결과, 분석자A, 분석자B

분석자	Area	Concentration (ug/mL)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
A (1차)	577.59912	114.34866	11.205	11.086	0.079	0.713
	574.46747	113.73077	11.144			
	569.40204	112.73134	11.047			
	570.41559	112.93132	11.066			
	565.85455	112.03140	10.978			
	570.89532	113.02597	11.076			
B (2차)	536.43848	114.17281	11.188	11.113	0.082	0.735
	531.18884	113.06767	11.080			
	535.70355	114.01809	11.172			
	536.41730	114.16835	11.188			
	529.77728	112.77051	11.051			
	527.09973	112.20684	10.996			

표 21. 분석일자별 검토결과

분석일자	Area	Concentration (ug/mL)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
2017. 11.15 (1차)	577.59912	114.35	11.205	11.086	0.079	0.713
	574.46747	113.73	11.144			
	569.40204	112.73	11.047			
	570.41559	112.93	11.066			
	565.85455	112.03	10.978			
	570.89532	113.03	11.076			
2017. 11.17 (3차)	527.00464	112.25773	11.001	11.045	0.082	0.740
	526.46558	112.23226	10.999			
	536.00531	114.27437	11.198			
	525.26343	111.97492	10.972			
	528.11359	112.58503	11.033			
	529.72339	112.92964	11.066			

- 범위

- 사군자주정추출분말 중 Quisqualic acid 분석법의 정량 범위는 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성을 고려할 때 12.5~400 ug/mL의 범위로 설정함

2.1.9. 사군자주정추출분말 안정성(유통기한설정) 연구

가. 개요

- 사군자 종자를 원재료로 사용하였으며, 원재료를 칭량하고, 70% 주정과 혼합하여 추출·농축한 후 170~75℃의 온도에서 분무건조 적용(GMP인정업체 생산). 생산된 사군자주정추출분말은 분무건조 온도에서 안정성이 뛰어난 원료이며, 지표물질(Quisqualic acid)의 녹는점은 187~188℃에 해당. 분무 건조된 사군자주정추출분말은 알루미늄박에 밀봉하여 박스포장하고 직사광선이 들지 않는 지정된 저장 창고에 실온 보관함
- 사군자주정추출분말의 영양성분은 열량 330.60Kcal/100g, 탄수화물 70.62%, 조단백질 8.70%, 조지방 1.48%, 나트륨 33.38mg/100g. 검체는 사군자 종자 원물 50kg을 추출·건조하여 약 35kg의 사군자주정추출분말을 제조하여 실험에 사용하였고, 그 중 35kg을 밀봉하여 검체 보관 창고에 실온 보관하였음

나. 실험방법

- 사군자주정추출분말을 방습 포장하여 3대의 인큐베이터에 각각 저장조건 25±2℃와, 대조구로 하여 40±2℃, 45±2℃로 하여 실험 샘플을 각각 300g씩 넣어서 준비함. 1회에 약 50g씩을 채취하여 3반복 실험하였으며(수분 3g×3회, 지표성분함량 1g×3회, 대장균군 25g×1회 = 총 37g), 초기 시험을 실시하고, 2개월부터 6개월까지 1개월마다, 총 6회 분석실험을 실시함

(1) 가속시험결과 해석

(가) 품질지표별 반응속도상수(K) 산출

$$-\frac{dA}{dt} = KA^n$$

dA/dt : 시간 변화에 따른 품질지표 A의 변화

A : 품질지표

t : 저장기간

K : 온도, 습도, 산소, 빛과 같은 저장환경에 영향 받는 반응속도 상수

N : 반응차수

· 0차 반응식

품질의 저하속도가 품질 특성에 관계없이 일정한 반응을 나타내는 경우

$$-\frac{dA}{dt} = KA^n \text{에서 } (n=0) \rightarrow -\frac{dA}{dt} = K \text{을 적분} \rightarrow At = A_0 - Kt \rightarrow t = \frac{A_0 - A_t}{K}$$

· 1차 반응식

품질 저하속도가 품질 특성에 따라 지수적으로 감소하는 반응을 나타내는 경우

$$-\frac{dA}{dt} = KA^n \text{에서 } (n=1) \rightarrow -\frac{dA}{dt} = KA \text{을 적분} \rightarrow \ln At = \ln A_0 - Kt$$

$$\rightarrow t = \frac{\ln A_0 - \ln A_t}{K}$$

A0: 품질지표의 최소측정값

At: 품질지표의 t시간 경과 후 측정값

K : 반응속도상수

t : 저장기간

(나) 온도에 대한 품질지표의 활성화 에너지(Ea) 산출

- 성분 변화에 대한 온도의존성을 설명하기 위해 시간과 반응속도상수로서 표현되는 많은 화학반응식이 제안 되었으나, 현재까지는 다음에 표현된 아레니우스반응식 (Arrhenius equation)이 가장 널리 사용되고 있음

$$K = Ae^{-Ea/RT} \text{(자연로그로 전환)} \rightarrow \ln K = -\left(\frac{Ea}{R}\right) \times \left(\frac{1}{T}\right) + \ln A \rightarrow \ln K = \frac{S}{T} + I$$

K : 반응속도상수

A : 아레니우스 상수

Ea : 활성화에너지(kcal/mol)

R : 기체상수(1.987 cal/mol)

T : 절대온도

S : 기울기(-Ea/R)

I : 절편(LnA)

- 활성화에너지란 물질이 반응을 일으키는데 필요한 최소한의 에너지를 말하며, 아레니우스 반응식으로부터 구한 K의 자연로그값인 lnK를 Y축으로 1/T를 X축으로 하여 선형회귀분석한 후, 얻어진 직선의 기울기로부터 선정된 품질지표의 Ea를 구함

(결과는 최소 3개의 가속온도로부터 구한 값이 요구)

(다) 유통기간 산출(유통온도가 정해지지 않은 제품)

- 실험제품이 1년간 우리나라 실온에 유통된다고 가정한다면, 현재 실험한 온도구간 (25, 40, 45℃)은 우리나라 1년 유통온도를 모두 반영한 것이 아니므로, 품질지표의 연간 변화량을 산출하기 위해서는 우리나라 월평균 온도를 기준으로 대표성을 갖는 온도 구간을 정하고, 그 온도구간에서의 온도 유지일수를 산출하여 시험하지 않은 구간에 대한 반응속도 상수 산출이 필요함
- 국내 유통온도에서 품질지표성분의 연간 변화량을 산출하기 위하여 2015~2017년도 기상청 자료를 참조하여 서울과 6개 광역시, 강원도 1개 지역과 제주시의 월평균기온을 조사하여 유통기간 산출온도의 근거로 함. 조사 결과 1월, 2월, 3월, 11월, 12월 (5개월 : 151일)의 평균기온은 10.0℃이하였으며, 4월은 13.9℃(1개월 : 30일), 5월과 10월(2개월 : 62일)은 16.3~19.0℃, 6월과 9월(2개월 : 60일)은 21.6~22.0℃, 7월과 8월 (2개월 : 62일) 25.7~26.2℃인 것으로 나타남. 이에 따라 실온 유통시 1년간 온도별 예상 유통일수는 10℃(5개월 : 151일), 15℃(1개월 : 30일), 20℃(2개월 : 62일), 25℃ (2개월 :60일), 30℃(2개월 : 62일)로 하여 유통기간 산출의 근거로 사용함
- 실험하지 않은 구간의 반응속도상수(K), 연간변화 반응속도상수(K')으로부터 유통기간 산출

$$\ln K = -\left(\frac{E_a}{R}\right) \times \left(\frac{1}{T}\right) + \ln A \rightarrow \ln K = \frac{S}{T} + I \rightarrow K = e^{\left(\frac{S}{T} + I\right)}$$

- 연간변화 반응속도상수(K') 산출
 $\Sigma [\text{해당온도유통일수}(A) \times \text{해당온도 반응속도 상수}(K)] = K'$

- 0차 반응식으로부터 유통기한 예측

$$t = \frac{A_0 - A_t}{K} \rightarrow t = \frac{A_0 - A_t}{e^{\frac{S}{T} + I}}$$

- 1차 반응식으로부터 유통기한 예측

$$t = \frac{\ln A_0 - \ln A_t}{K}$$

(라) 특정저장시점에서의 품질지표 감소량 예측

- 품질지표별 예측이 적합한 것으로 검정된 0차 또는 1차 방정식으로부터 특정저장시점 (t)에서 품질지표 감소량 예측방법을 개발함. 성분별 감소량에 따라 초기농도에서 한 계점에 이르는 시간을 예측할 수 있으며, 제조자는 각 성분별 감소 특성에 따라 초기 배합량을 예측할 수 있어 일관성 있는 품질관리에 활용이 가능함
- 0차 반응식으로부터 t 저장시점에서의 품질지표 감소량 또는 증가량 예측

$$t = \frac{A_0 - A_t}{K} \rightarrow t = \frac{A_0 - A_t}{e^{\frac{S}{T} + I}} \rightarrow A_0 - A_t = t \times e^{\left(\frac{S}{T} + I\right)}$$

- 1차 반응식으로부터 t 저장시점에서의 품질지표 감소량 또는 증가량 예측

$$\ln A_t = \ln A_0 - Kt \rightarrow t = \frac{\ln A_0 - \ln A_t}{K} \rightarrow Kt = \ln A_0 - \ln A_t$$

$$\ln A_t = \ln A_0 - Kt \rightarrow A_t = e^{(\ln A_0 - Kt)}$$

(마) 품질한계

- 표준물질 분석을 위한 기준시험법과 동일하게 각 표준물질의 stock solution을 0.40 mg/mL로 조제한 뒤, 단계희석을 통해 0.40, 0.30, 0.20, 0.10, 0.05, 0.025, 0.0125 mg/mL로 7개의 농도구간을 준비함. 이 때, 직선성 검토구간은 시료에 함유된 표준물질의 분석범위가 포함되도록 하며, 각각 3회씩 반복 실험한 결과 검량선의 R2값은 모두 0.99이상으로 나타나 본 구간에서 직선성이 확보됨을 확인함

다. 결론

- 사군자주정추출분말은 실험결과에서 수행기간(0~6 개월)동안 수분함량은 변화가 적었으며, 대장균군 확인결과 검출되지 않았음. 그러므로 고온다습하지 않고 직사광선이 들지 않는 저장 공간에 보관하면, 제품의 수분함량 및 대장균군의 오염은 유통기한 설정에 영향을 미치지 않을 것임
- 지표물질(Quisqualic acid)의 함량은 시간이 지남에 따라 다소 감소하였으나, 수행기간(0~6 개월)동안 기준규격으로 설정한 8.0~12.0 mg/g의 범위 내에 포함되었다. 25℃로 저장한 제품은 36개월에서 1.4123 mg/g의 감소로 품질규격 범위 내에 포함되었음
- 품질지표 중 결정계수가 가장 높은 지표성분 0차반응식을 근거로 상온에서 유통되는 사군자주정추출분말의 유통기한은 72.56개월로 산출되었으며, 여기에 유통과정 중의 안정성을 고려하고자 안정성계수 0.8을 곱하여 최종 유통기한을 58개월로 설정하였음
- 이에 유통기한을 36개월로 정하는데 무방할 것으로 사료되며, 기간 내에 품질을 보증하는데 문제점이 없을 것이라고 판단됨

실 험 결 과	요약	
	유통기한 가속시험 결과	
	품질지표	0차 유통기한
	지표성분(Quisqualic acid)	2206.99일 (72.56개월)
	실험에의한품질한계일 : 2206.99일 (72.56개월)	
	$\frac{\text{최종유통기한} : 2206.99 \times 0.8 = 1765.59 \approx 1765\text{일}}{72.56 \times 0.8 = 58.05 \approx 58\text{개월}}$	
	유통기한을3년(36개월)으로 설정	

2.1.10. 중장기적 원료 확보 계획 및 국산화 전략

가. 사군자 원생약 중장기 확보 계획

- 향후 5년간 국내·외 한약재 유통·수입 전문 도매업체로부터 (송림무약) 연간 5톤~10톤 가량의 사군자 원생약을 공급받고자 협의·진행 중임. 본 과제에 사용된 중국산 사군자 원생약은 전량 해당업체로부터 공급 받았으며, 사군자 수급가능성을 논의한 결과, 연간 5~10톤 정도의 공급이 문제없음을 확인함. 따라서 2020년에는 해당 업체로부터 원생약 5톤 공급받을 예정이며, 2021년부터 2024년도까지 연간 10톤(총 45톤) 가량 공급 및 확보할 예정임

나. 국산화 전략

- 사군자 원생약은 현재 국내 일부 한약 처방 이외 매우 낮은 수요로 국내 재배가 이루어지지 않고 전량 중국 수입에 의존하고 있는 실정임
- 최근 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서는 건강식품 및 한약의 주재료인 지황에 대한 개량 품종 11종을 개발한 바 있으며 중국에서 수입을 대체할 수 있는 품종 토강, 다강, 고강 등을 농가 보급을 통하여 소득 향상을 시킨바 있음
- 본 과제를 통해 도출된 전립선 건강 기능성을 가지는 사군자 원생약에 대해 장기적으로 농촌진흥청 국립원예특작과학원의 「국제 경쟁력 제고를 위한 원예특작 신품종 육성 및 보급」과 같은 공동 연구를 통하여 신품종 개발, 재배 및 농가 보급 연구 수행
- 이를 통하여 중국 수입을 대체하고 안정적이며 고품질의 사군자 품종을 지역 약용 작물로 승격 및 대단위 계약재배를 통하여 사군자 원생약의 국산화 및 재배 농가의 소득 증대로 이어질 수 있을 것으로 사료됨

株 式 會 社 松 林 貿 藥

TEL)02-402-4673 FAX)02-2178-9259

송림 : 제190319호

수신 : (주)휴온스

참조 : 윤 지수님 費下

제목 : 사군자 물량 공급 가능 여부건

귀사의 일익 번창 하심을 기원드리며, 사군자(사천성) 5년간 물량 공급 가능 여부 아래와 같이 확인 합니다.

-아 래-

년도	물량	산지
2020년	5톤	사천성
2021년	10톤	사천성
2022년	10톤	사천성
2023년	10톤	사천성
2024년	10톤	사천성

2019년 3월 19일

(주)송림무약

서울특별시 松林區 良才大路 02동 19

(株)松林貿藥
代表理事 林 慶



그림 26. 송림무약 사군자 물량 공급 가능 여부건

2.1.11. 최종 기능성 원료에 대한 비임상 독성시험

가. 랫드를 이용한 2주간 반복 경구투여 DRF 독성시험

- 암수 Sprague-Dawley 랫드에 2주간 반복 경구 투여시 나타나는 독성반응과 그 안정성을 평가하여 추후 13주 반복 경구투여 시험에서 독성 용량을 설정하기 위한 시험 수행
- 시험물질

- 제조원 : 대호양행
- 외관 : 이미, 이취가 없고 특유의 향미가 있는 흐린 갈색의 분말
- 함량 : 11.82 mg/g (지표성분 quisqualic acid 기준)

보관조건 : 차광 실온 보관

- 부형제

- 멸균 생리식염수
- 제조번호 : DAA4011
- 보관조건 : 실온
- 공급원 : JW 중외제약

- 실험계

- 종 및 계통 : Sprague-Dawley 랫드
- 생산자 및 공급원 : (주)오리엔트바이오
- 성별 및 동물 수: 암수 각각 20마리
- 주령: 7주령

- 시험방법

- 암수 Sprague-Dawley 랫드를 체중 순서대로 무작위로 분배하여 군 분리
- 사군자 추출물 투여량은 동일종의 랫드를 대상으로 실시한 단회 경구투여 독성시험의 결과를 근거로 5000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 이를 포함하여 공비를 2.5 및 2 로 설정한 3단계 용량 (1000, 2000, 5000 mg/kg/day)을 투여 용량으로 설정함
- 대조군에는 부형제(멸균 생리식염수)를 투여

표 22. 시험군 구성 및 투여량

군	성별	동물수	동물번호	투여액량(mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1	M / F	5 / 5	1-5/21-25	10	0
G2	M / F	5 / 5	6-10/26-30	10	1000
G3	M / F	5 / 5	11-15/31-35	10	2000
G4	M / F	5 / 5	16-20/36-40	10	5000

- 투여 경로는 임상예상경로를 적용하여 경구투여로 수행하였고, 1회/일, 7일/주로 2주간 투여함
- 투여액량은 측정된 체중을 기준으로 10 mL/kg/day로 산출함

- 시험 결과

- 사망 동물은 관찰되지 않았으며, 시험 물질 투여 1일차, 13일차에 수컷 2000 mg/kg 투여군 일부 개체에서 코 및 입주위 오염 증상이 확인되었으나 다른 개체에서는 어떠한 증상도 관찰되지 않음. 코 및 입주위 오염은 설치류 시험에서 강제 경구투여시에 투여물질의 역류에 의한 증상으로 시험물질의 생체내에서의 독성학적 기전에 의한 변화로 볼 수 없음

표 23. 사망 및 일반증상

Clinical signs					
Days	Signs	Groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1000)	G3 (2000)	G4 (5000)
Male					
1-14	Normal	5 / 5	5 / 5	3 / 5	5 / 5
1	Dirty mouth and nose	0 / 5	0 / 5	1 / 5	0 / 5
13	Dirty mouth and nose	0 / 5	0 / 5	1 / 5	0 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Female					
1-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

- 체중 및 사료섭취량은 모든 물질 투여군에서 부형제 대조군에 비해 유의한 변화는 관찰되지 않음
- 안과학적인 검사 결과 모든 동물에서 어떠한 증상도 나타나지 않음

표 24. 안과학적 검사

Ophthalmological examinations					
Sites	Findings	Groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1000)	G3 (2000)	G4 (5000)
Male					
Left eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Female					
Left eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
Right eye	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

- 혈액학적 검사 결과 수컷 5000 mg/kg 투여군의 MCHC 및 EOS 수치가 부형제 대조군 대비 유의한 증가를 나타내었으며, 암컷 5000 mg/kg 투여군의 BASO%, BASO 수치가 부형제 대조군 대비 유의한 증가를 나타냄. 모두 정상 범위 이내의 경미한 변화였으며, 용량-반응 상관성이 나타나지 않아 의미 있는 변화로 판단하

지 않음

표 25. 혈액학적 검사

		Hematological analysis				MALE
Tests	Units	Groups (mg/kg/day)				
		G1 (0)	G2 (1000)	G3 (2000)	G4 (5000)	
WBC	(x10 ³ cells/ μ l)	9.67 \pm 0.61	11.23 \pm 3.39	10.65 \pm 1.04	12.40 \pm 3.21	
RBC	(x10 ⁶ cells/ μ l)	8.03 \pm 0.48	8.10 \pm 0.54	7.96 \pm 0.45	7.50 \pm 0.34	
HGB	(g/dL)	1.36 \pm 0.49	17.24 \pm 0.78	16.56 \pm 0.73	15.80 \pm 0.35	
HCT	(%)	51.42 \pm 1.77	53.40 \pm 3.73	50.66 \pm 3.42	47.63 \pm 0.40	
MCV	(fL)	64.14 \pm 1.86	65.90 \pm 0.90	63.64 \pm 2.00	63.60 \pm 2.36	
MCH	(pg)	20.40 \pm 0.68	21.32 \pm 0.87	20.80 \pm 0.40	21.13 \pm 0.57	
MCHC	(g/dL)	31.82 \pm 0.43	32.32 \pm 1.15	32.74 \pm 1.34	33.23 \pm 0.47*	
RDW	(%)	11.62 \pm 0.49	11.74 \pm 0.55	11.78 \pm 0.76	12.43 \pm 0.74	
HDW	(g/dL)	2.19 \pm 0.13	2.23 \pm 0.10	2.22 \pm 0.13	2.19 \pm 0.03	
PLT	(x10 ³ cells/ μ l)	1011 \pm 100.08	750.60 \pm 405.02	1041.60 \pm 262.23	1006.33 \pm 100.17	
MPV	(fL)	7.76 \pm 0.26	10.80 \pm 7.21	7.78 \pm 0.55	7.60 \pm 0.10	
PDW	(%)	58.66 \pm 8.12	58.12 \pm 3.77	60.66 \pm 7.95	55.20 \pm 3.21	
PCT	(%)	0.79 \pm 0.07	0.58 \pm 0.28	0.81 \pm 0.19	0.77 \pm 0.07	
%NEU	(%)	16.42 \pm 3.82	18.00 \pm 4.54	18.58 \pm 11.73	12.67 \pm 0.75	
%LYM	(%)	80.06 \pm 4.24	77.92 \pm 4.44	77.90 \pm 11.59	83.80 \pm 1.11	
%MON O	(%)	1.88 \pm 1.06	2.40 \pm 0.96	1.46 \pm 0.38	1.40 \pm 0.60	
%EOS	(%)	0.80 \pm 0.12	0.88 \pm 0.48	1.34 \pm 0.56	1.30 \pm 0.35*	
%LUC	(%)	0.54 \pm 0.17	0.44 \pm 0.11	0.46 \pm 0.15	0.53 \pm 0.12	
%BAS O	(%)	0.30 \pm 0.07	0.36 \pm 0.05	0.28 \pm 0.04	0.33 \pm 0.06	
NEU	(x10 ³ cells/ μ l)	1.60 \pm 0.45	1.99 \pm 0.60	1.99 \pm 1.26	1.56 \pm 0.35	
LYM	(x10 ³ cells/ μ l)	7.72 \pm 0.29	8.79 \pm 2.94	8.28 \pm 1.35	10.41 \pm 2.80	
MONO	(x10 ³ cells/ μ l)	0.18 \pm 0.11	0.25 \pm 0.07	0.16 \pm 0.06	0.16 \pm 0.04	
EOS	(x10 ³ cells/ μ l)	0.08 \pm 0.02	0.11 \pm 0.08	0.14 \pm 0.07	0.16 \pm 0.07*	
LUC	(x10 ³ cells/ μ l)	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	
BASO	(x10 ³ cells/ μ l)	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	
N		5	5	5	5	
Hematological analysis				female		

Tests	Units	Groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1000)	G3 (2000)	G4 (5000)
WBC	(x10 ³ cells/ μ l)	7.66 ± 0.22	7.80 ± 1.73	7.31 ± 2.21	9.77 ± 1.62
RBC	(x10 ⁶ cells/ μ l)	7.33 ± 0.04	7.36 ± 0.52	7.86 ± 0.49	7.71 ± 0.20
HGB	(g/dL)	15.45 ± 0.64	15.64 ± 0.67	16.30 ± 0.70	16.26 ± 0.68
HCT	(%)	44.25 ± 1.20	47.36 ± 3.75	47.68 ± 3.11	48.00 ± 1.37
MCV	(fL)	60.35 ± 1.34	64.38 ± 2.22	60.62 ± 1.52	62.24 ± 2.08
MCH	(pg)	21.05 ± 0.64	21.28 ± 0.73	20.76 ± 0.52	21.06 ± 0.48
MCHC	(g/dL)	34.90 ± 0.42	33.12 ± 1.80	34.24 ± 1.06	33.90 ± 1.12
RDW	(%)	11.30 ± 0.28	11.48 ± 1.29	10.62 ± 0.48	10.98 ± 1.21
HDW	(g/dL)	2.19 ± 0.13	2.24 ± 0.10	2.20 ± 0.15	2.20 ± 0.10
PLT	(x10 ³ cells/ μ l)	526.00 ± 540.23	921.60 ± 303.93	961.80 ± 124.57	1148.00 ± 414.75
MPV	(fL)	8.85 ± 2.33	8.02 ± 2.01	7.36 ± 0.49	7.50 ± 0.23
PDW	(%)	68.90 ± 23.90	56.68 ± 14.89	52.90 ± 4.86	52.88 ± 3.17
PCT	(%)	0.40 ± 0.35	0.70 ± 0.16	0.71 ± 0.07	0.87 ± 0.34
%NEU	(%)	17.20 ± 2.26	19.58 ± 7.37	15.72 ± 3.64	16.30 ± 8.98
%LYM	(%)	79.40 ± 1.56	75.32 ± 9.82	80.54 ± 4.24	80.28 ± 8.84
%MON O	(%)	1.70 ± 0.42	2.82 ± 1.91	1.88 ± 0.45	1.54 ± 0.35
%EOS	(%)	1.15 ± 0.35	1.12 ± 0.36	1.26 ± 0.69	0.98 ± 0.26
%LUC	(%)	0.45 ± 0.07	0.84 ± 0.68	0.40 ± 0.16	0.56 ± 0.23
%BAS O	(%)	0.15 ± 0.07	0.38 ± 0.19	0.18 ± 0.08	0.34 ± 0.09*
NEU	(x10 ³ cells/ μ l)	1.31 ± 0.14	1.60 ± 1.00	1.19 ± 0.55	1.55 ± 0.86
LYM	(x10 ³ cells/ μ l)	6.08 ± 0.29	5.77 ± 0.84	5.84 ± 1.63	7.89 ± 1.84
MONO	(x10 ³ cells/ μ l)	0.13 ± 0.04	0.24 ± 0.22	0.14 ± 0.06	0.15 ± 0.04
EOS	(x10 ³ cells/ μ l)	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.06	0.10 ± 0.03
LUC	(x10 ³ cells/ μ l)	0.03 ± 0.00	0.07 ± 0.07	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.03
BASO	(x10 ³ cells/ μ l)	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01*
N		5	5	5	5

- 혈액 생화학적 검사 결과 수컷 1000 mg/kg 투여군의 CRE 수치, 5000 mg/kg 투여군의 AST, ALT, TP, A/G 수치가 부형제 대조군 대비 유의한 감소를 나타내었

으나 모두 정상범위 이내의 경미한 변화였으며, 용량-반응 상관성이 나타나지 않아 의미 있는 변화로 판단하지 않음

표 26. 혈액생화학적 검사

Biochemistry analysis		Male			
Tests	Units	Groups (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1000)	G3 (2000)	G4 (5000)
AST	(U/L)	73.64 ± 3.66	73.40 ± 5.98	73.62 ± 3.76	58.43 ± 2.37*
ALT	(U/L)	30.36 ± 3.27	35.68 ± 6.50	31.02 ± 7.01	21.73 ± 1.31*
ALKP	(U/L)	823.96 ± 152.40	744.22 ± 65.51	702.22 ± 125.80	782.90 ± 151.53
TG	(mg/dL)	35.78 ± 9.69	34.86 ± 24.54	31.30 ± 16.54	38.53 ± 19.21
TCHOL	(mg/dL)	53.26 ± 6.58	58.90 ± 8.71	52.94 ± 6.15	64.60 ± 5.65
CRE	(mg/dL)	0.80 ± 0.05	0.70 ± 0.06*	0.70 ± 0.09	0.73 ± 0.08
BUN	(mg/dL)	19.44 ± 1.45	17.56 ± 3.18	19.27 ± 3.50	19.75 ± 1.51
ALB	(g/dL)	2.64 ± 0.08	2.72 ± 0.16	2.58 ± 0.12	2.53 ± 0.15
TP	(g/dL)	6.70 ± 0.26	6.73 ± 0.50	6.57 ± 0.21	6.24 ± 0.14*
A/G		0.65 ± 0.02	0.68 ± 0.05	0.65 ± 0.08	0.68 ± 0.04*
TBIL	(mg/dL)	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.02
GLU	(mg/dL)	146.53 ± 4.20	164.30 ± 16.25	148.88 ± 22.44	170.87 ± 8.57
CPK	(U/L)	411.74 ± 57.89	528.22 ± 197.17	489.90 ± 216.08	439.23 ± 127.49
CA	(mg/dL)	10.10 ± 0.24	10.24 ± 0.52	10.27 ± 0.59	9.99 ± 0.23
IP	(mg/dL)	9.67 ± 0.56	10.23 ± 0.49	10.23 ± 1.52	10.32 ± 0.89
N		5	5	5	5
Biochemistry analysis		Female			
Tests	Units	GROUPS (mg/kg/day)			
		G1 (0)	G2 (1000)	G3 (2000)	G4 (5000)
AST	(U/L)	166.82 ± 143.94	83.34 ± 33.86	68.04 ± 10.59	68.96 ± 8.24
ALT	(U/L)	63.06 ± 53.34	29.50 ± 6.19	26.20 ± 5.36	23.48 ± 4.34
ALKP	(U/L)	409.34 ± 68.25	686.02 ± 296.05	441.92 ± 129.25	502.52 ± 105.85
TG	(mg/dL)	23.30 ± 8.75	35.30 ± 12.80	22.26 ± 5.77	22.50 ± 15.42
TCHOL	(mg/dL)	79.38 ± 19.19	85.00 ± 11.97	79.02 ± 16.51	78.42 ± 15.98
CRE	(mg/dL)	0.73 ± 0.07	0.81 ± 0.09	0.78 ± 0.13	0.74 ± 0.07
BUN	(mg/dL)	19.04 ± 1.47	18.69 ± 3.21	20.31 ± 1.54	19.63 ± 6.48
ALB	(g/dL)	2.71 ± 0.15	2.87 ± 0.26	2.89 ± 0.22	2.80 ± 0.15

TP	(g/dL)	6.38 ± 0.41	6.95 ± 0.36	6.75 ± 0.29	6.85 ± 0.34
A/G		0.74 ± 0.03	0.71 ± 0.11	0.75 ± 0.09	0.70 ± 0.08
TBIL	(mg/dL)	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.01
GLU	(mg/dL)	132.77 ± 25.54	105.76 ± 28.41	139.64 ± 25.85	130.36 ± 20.82
CPK	(U/L)	1538.00 ± 1960.54	829.70 ± 1173.50	423.74 ± 153.56	463.48 ± 312.84
CA	(mg/dL)	9.79 ± 0.23	10.41 ± 0.61	10.13 ± 0.32	9.86 ± 0.23
IP	(mg/dL)	9.37 ± 1.38	9.15 ± 2.32	8.79 ± 0.72	9.02 ± 1.06
N		5	5	5	5

- 장기 중량 측정 결과 수컷 1000 mg/kg 투여군의 흉선 상대장기중량, 2000 mg/kg 투여군의 비장 상대장기중량이 부형제 대조군 대비 유의한 증가를 나타내었으며, 암컷 1000 mg/kg 투여군의 심장 상대장기중량, 2000 mg/kg 투여군의 폐, 비장 상대장기중량이 부형제 대조군 대비 유의한 증가 또는 감소를 나타내었으나 용량-반응 상관성이 나타나지 않아 의미있는 변화로 판단하지 않음
- 부검 결과 수컷 2000 mg/kg 투여군의 15번 개체, 암컷 1000 mg/kg 26번 개체, 5000 mg/kg 투여군의 39번 개체에서 흉선 위축소견이 확인되었으며, 그 외 모든 동물에서 어떠한 소견도 관찰되지 않음
- 종합적으로 모든 투여군에서 시험물질에 의한 것으로 판단되는 변화는 관찰되지 않아 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5000 mg/kg 으로 결론

나. 비임상 독성시험 위탁 용역기관 선정 및 시험 수행

- 최종 기능성 원료에 대한 GLP 비임상 독성시험을 수행하기 위해 위탁 용역기관 선정 작업 수행
- ㈜휴온스 비임상시험 수탁기관 점검에 관한 규정 SOP에 따라 국내 비임상 시험 위탁 용역기관 3 곳의 업체 (바이오톡스텍, ㈜캠온, 한국화학융합시험연구원)를 후보로 선정함
- 각 CRO 기관으로부터 비임상 시험 설계 (안)에 따른 시험 제안서를 수령하였고, 이를 바탕으로 가격경쟁력, 시험수행경험, 신뢰도, 서비스, 제안서 질적 수준, 의사소통 수준을 정량적으로 평가함
- 위 평가에 근거하여 바이오톡스텍을 최종 후보기관으로 선정하고 비임상 독성시험을 위한 시험 프로토콜을 작성함
- 식약처고시 '건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정'에 의거, 제 3장 제 14조 제 7호 나목에 해당
- [별표 3]건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도 참고시 본 사업화과제의 소재는 독성시험자료를 제출하여야 한다고 결론

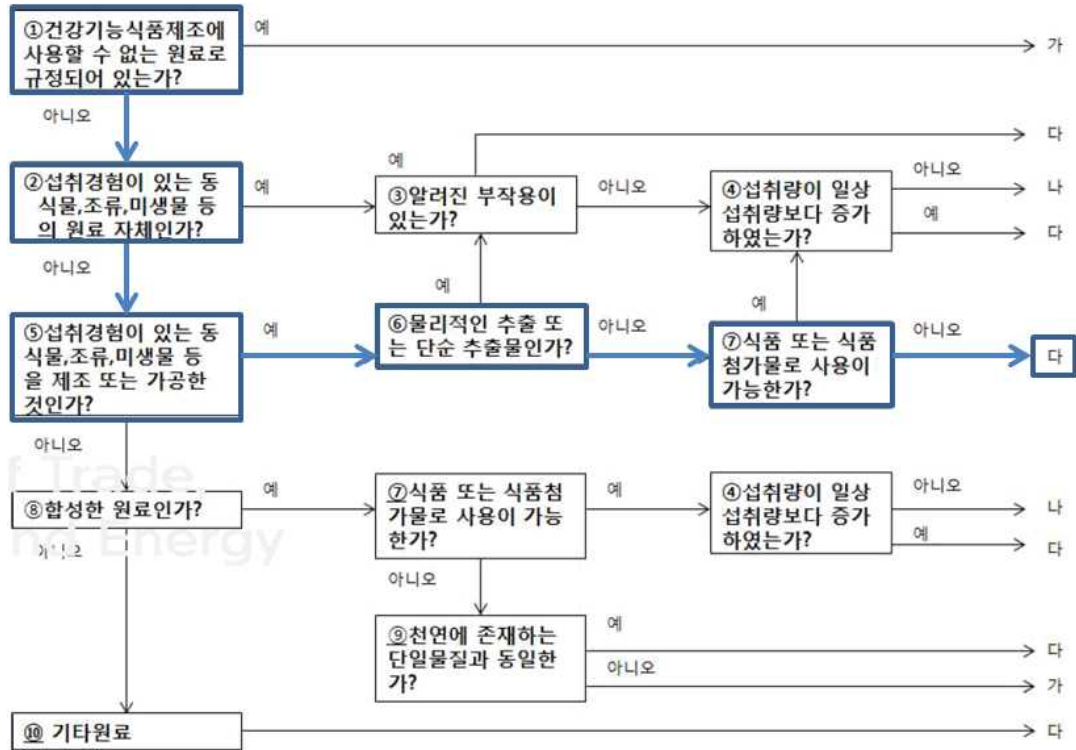


표 27. 비임상 독성시험 시험 프로토콜

시험 항목	사용 동물 투여 용량	측정항목
설치류 (랫드)	단회투여독성시험 SD-rat 군당 암수 각 5마리 대조군 1군, 투여군 1 군 최대용량 5000 mg/kg	사망례 관찰 일반 증상 체중 측정 조직병리검사: 미 실시, 부검시 이상소견 확인 시 추가 실시
	13주 반복투여독성시 험 SD-rat 군당 암수 각 5마리 대조군 1군, 투여군 3 군 최대용량 2000 mg/kg	일반증상 체중 측정 혈액검사, 뇨검사 부검 (조직병리검사 포 함)
비설치류 (비글견)	Increasing-dose tolerance study 단회 용량증가 (DES) 대조군, 투여군 1 대조군 암수 각각 1마 리	일반증상 체중 측정 부검 조직병리검사: 미 실시, 부검시 이상소견 확인 시 추가 실시

		투여군 암수 각각 2마리 최대용량 5000 mg/kg
유전독성	복귀돌연변이시험	예비시험: 3 plate/용량군 본시험: 5개 용량, 3 plate/용량
	염색체이상시험	단시간, S+/-, 연속처리 3개용량 이상, 2 plate/용량
	마우스 소핵시험	예비시험: 5000 mg/kg 본시험: 추후 용량 결정

- 위탁시험 용역 계약에 대한 법률 검토 진행 ((주)휴온스 법무팀)
- CRO 기관과 비임상 독성시험 수행에 대한 계약 체결을 실시함
- 비임상 독성시험 수행
 - 위탁시험 시작일 : 2017년 09월 27일
 - 독성시험 개시일 : 2017년 10월 30일
 - 시험 종료일 : 2018년 07월 26일

① 설치류 단회투여독성시험

- Sprague-Dawley 암수 6주령 랫드에 시험물질 5,000 mg/kg의 용량 및 대조군 (주사용수)의 2 군으로 하고, 군당 암수 각 5마리에 단회 경구투여함
- 투여 후 14일 동안 일반증상 관찰 및 체중측정 실시, 관찰 종료 후 부검
- 사망동물 및 일반증상에서의 이상은 관찰되지 않음
- 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg를 상회하는 것으로 확인

② 설치류 13주 반복투여독성시험

- Sprague-Dawley 암수 6주령 랫드에 시험물질 500, 1,000, 2,000 mg/kg 의 용량 및 대조군 (주사용수)의 4 군으로 하고, 군당 암수 각 10마리에 13주간 1일 1회 반복 경구투여함
- 관찰기간 동안, 일반증상, 체중과 사료섭취량, 안과학적 검사, 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행
- 관찰기간 동안, 일반증상의 이상은 관찰되지 않음
- 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사, 장기 중량 및 부검 소견에서 독성변화는 관찰되지 않음
- 조직병리학적 검사에서 독성변화는 관찰되지 않음
- 시험 결과, 무독성량(NOAEL)은 암수 모두 2,000 mg/kg/day 로 확인

③ 비설치류 최대내성용량시험

- 비글견 대조물질 투여군 암수 각 1마리, 시험물질 투여군 암수 각 2 마리 시험
- 시험 결과, 암수 비글견에 대한 최대내성용량(MTD)는 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 확인

④ 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

- 시험물질의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535, TA1537)과 트립토판 요구성인 대장균 (WP2 $uvrA$ (pKM101)균주)을 이용하여 대사활성화 비존재하 및 존재하의 경우에 대해 각각 시험

균주명	S9 mix	시험용량 (µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 $uvrA$ (pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

- 시험결과, 시험물질의 유전자 돌연변이 유발성은 없는 것으로 확인

⑤ 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험

- 시험물질의 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)을 이용하여 확인

계열	S9 mix	시험용량 (µg/plate)
단시간처리법	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625
연속처리법	-	5,000, 2,500, 1,250, 625

- 시험 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 염색체 이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않음
- 각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가
- 시험물질은 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험에서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 확인

⑥ 마우스를 이용한 소핵시험

- 시험물질의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발유무를 평가하기 위하여 ICR마우스를 이용하여 24시간 간격으로 2회 경구투여하여 확인
- 시험결과, 시험물질군의 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의적인 차이는 확인되지 않음
- 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않음
- 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의적으로 증가
- 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의적인 차이가 확인되지 않음
- 시험물질의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성은 없는 것으로 확인

2.1.12. 인체적용시험

가. 인체적용시험 시험물질 제조

- 사군자추출물을 이용하여 복용편의성이 개선된 정제를 제조하고자 함

(1) 흐름성 개선 연구

- 사군자추출물을 이용하여 타정이 가능한 사군자추출물의 과립을 제조하고자 함
- (가) 실험방법
- 아래 표 1. 의 조성으로 용제에 부형제를 용해시켜 결합액을 제조함
- 결합액을 이용하여 사군자추출물을 연합 및 건조하여 과립 물성을 확인함

표 28. 배합표 (단위 : 중량 mg)

배합목적	원료명	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
주성분	사군자추출물*	500	500	500	500	500	500	500
부형제	히드록시프로필셀룰로스		10	10	10	12.5	15	20
용제	주정		30	60	90	60	60	60

*사군자추출물 : 사군자고형분:덱스트린=1:1

(나) 실험결과

- 적정 결합액 비율은 사군자추출물 : 히드록시프로필셀룰로스 : 주정 = 500 : 10 : 60~500 : 12.5 : 60 임을 확인하였고, 최종과립의 조성은 비율의 중간값인 사군자추출물 : 히드록시프로필셀룰로스 : 주정 = 500 : 11.5 : 60 으로 확인
- 과립을 제조하지 않을 시 (T1) 미립자인 사군자추출물은 타정 불가능
- 적절주정의 양을 확인하는 시험 (T2~T4)결과 사군자추출물에 과립연합시 적정 주정의 양은 60 mg으로 확인
- 과량 투입시(T3) 사군자추출물이 녹아 과립형성 불가능
- 적정 히드록시프로필셀룰로스 양을 확인하는 시험 (T3, T5~T7) 결과, 추출물 500 mg 당 15 mg을 투입하였을 때, 단단하여 연합 및 정립에 문제가 발생
- 적정 히드록시프로필셀룰로스의 구간은 10 ~ 12.5 mg이 적정함
- 따라서 히드록시프로필셀룰로스의 적정량은 그 중간값인 11.5 mg으로 확인

(2) 정제의 방해 연구

- 사군자추출물을 과립 타정시 방해시간 지연이 확인되어 이를 개선하고자 시험 수행
- (가) 실험방법
- 아래 표 29.의 조성으로 과립을 제조, 타정 후 방해연구를 비교 진행함

표 29. 배합표 (단위: 중량 mg)

배합목적	원료명	T8	T9	T10	T11	T12
주성분	사군자추출물*	500	500	500	500	500
부형제	히드록시프로필셀룰로스	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5

용제	주정	60	60	60	60	60
부형제	카복시메틸셀룰로오스칼슘		260	220	180	100
	구연산			15	30	60
	탄산수소나트륨			25	50	100
활택제	스테아르산마그네슘	20	20	20	20	20
부형제	이산화규소	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5

*사군자추출물 : 사군자고형분:덱스트린=1:1

(나) 실험결과

- 흐름성 개선 시험과 동일하게 비율을 사군자추출물:히드록시프로필셀룰로스:주정 = 500:11.5:60으로 하고 봉해에 도움이 되는 카복시메틸셀룰로오스칼슘, 구연산, 탄산수소나트륨의 비율을 조절하여 평균봉해시간을 확인한 결과, 다음 표 3.과 같음

표 30. 봉해시험 결과

원료명	T8	T9	T10	T11	T12
평균봉해시간(분)	63	45	37	28	25

- 상기의 시험결과와 같이 복용편의성을 고려하여 최종 정제 질량을 800 mg으로 설정하고 카복시메틸셀룰로오스칼슘을 투입하였을 때, 봉해시간이 60분에서 45분으로 단축됨
- 봉해시간을 30분 이내로 단축하기 위하여 선정된 부형제 구연산과 탄산수소나트륨의 비율이 구연산:탄산수소나트륨 = 3:5 가 적절한 비율로 확인
- 투입량을 조절하여 봉해시간을 30분 이내로 조절한 시험진행 (T10~T12)
- 시험 결과, 정제 800 mg 중 구연산:탄산수소나트륨 = 60:100 조합에서 봉해시간이 30분 이내로 나타나는 것 확인

(3) 공정연구

- 사군자추출물을 이용한 정제생산의 연구소스케일에서 생산시설의 스케일로의 scale-up 가능여부를 확인하고 문제점을 개선하고자 함

(가) 실험방법

- 아래 표 4.는 앞선 실험을 통해 확인된 조성으로 과립의 제조 및 타정을 진행함

표 31. 배합표 (단위 : 중량 mg)

배합목적	원료명	T12
주성분	사군자추출물*	500
부형제	히드록시프로필셀룰로스	11.5

용제	주정	60
부형제	카복시메틸셀룰로오스칼슘	100
	구연산	60
	탄산수소나트륨	100
활택제	스테아르산마그네슘	20
부형제	이산화규소	8.5

*사군자추출물 : 사군자고형분:덱스트린=1:1

(나)연구방법

- 사군자추출물 500 mg을 기준으로 1정 분량으로 기록하였으며, 주요제조공정인 원료 칭량, 결합액조제, 1차 혼합, 연합, 건조, 2차 혼합, 후혼합, 타정 공정을 연구
 - 공정 1. 원료칭량 : 탄산수소나트륨은 수분에 민감하므로 수분차단을 하여 보관
 - 공정 2. 결합액조제 : 히드록시프로필셀룰로오스는 주정에 한번에 넣으면 뭉침현상이 발생하므로 용해시간에 영향을 줌. 주정을 교반하면서 나누어 투입하면 뭉침현상을 막아 제조시간을 단축할 수 있음
 - 공정 4. 연합 : 결합액 투입시 한번에 투입하게 되면 사군자추출물의 뭉침현상이 발생하여 연합과립의 흐름성이 나빠짐. 결합액을 3회 이상으로 나누어 넣음으로써 뭉침 현상을 막고 안정적인 과립물의 흐름성을 확보할 수 있음
 - 공정 5. 건조 : 소량의 크기(Batch-size : 500 g)로 건조 시, 40℃로 가열되어 있는 챔버에서 건조하였을 때, 문제가 발생하지 않음. 그러나 Scale-Up(Batch-size : 10 kg 이상)시 시간 단축을 위하여 40℃로 가열되어 있는 챔버에서 건조하게 되면 봉해 시간이 지연됨을 확인. 봉해 지연문제를 방지하기 위해 실온의 챔버에 연합물을 넣은 뒤 40℃로 가열하는 것이 바람직함. 최종 건조 조건은 LOD 105℃, 3분간 건조 하였을 때 3.0 % 수준이 적합함. 4.0 % 이상의 건조물은 타정장애(Sticking Caping)발생으로 수율이 떨어짐. 따라서, 적정 LOD의 기준은 4.0 % 미만으로 3.0 % 수준이 적합함
 - 공정 6. 2차 혼합 : 이산화규소 투입시 정진기에 의해서 입자가 뭉쳐지는 현상이 있으므로 타정시 흰색의 이산화규소 점박이가 발생함에 따라서 20 mesh 체로 체과 후, 사용하는 것이 적합함
 - 공정 7. 후혼합 : 활택제인 스테아르산마그네슘 투입 시, 혼합의 균질성이 중요함. 스테아르산 마그네슘은 최종 투입되는 부형제로서 분산이 잘 되지 않으면 정제에서 흰색의 점이 발생. 따라서 20 mesh 체로 체과 후 사용하는 것이 적합함
 - 공정 8. 타정 : 타정속도에 따른 타정영향 평가 결과(표 5), 타정장애는 발생하지 않음. 그러나 타정속도 50 rpm에서 질량편차가 크게 발생함. 적합 기준 800 mg±5% (760~840 mg)에서 벗어나는 값을 나타냄. 적정 타정속도는 40 rpm 이하이며, 이는 연구소에서 확인한 값으로 Scale-Up을 할 수 있는 수치라 사료됨

표 32. 타정속도와 그에 따른 정제에 미치는 영향

타정속도(rpm)	10	20	30	40	50
장애(유/무)	무	무	무	무	무
10정 평균질량(mg) (최소질량~ 최대질량)	800.33 (799.60~ 810.40)	802.01 (796.90~ 813.15)	801.66 (794.19~ 815.80)	798.96. (789.49~ 817.51)	797.61 (748.83~ 829.78)
판정 (적합/부적합)	적합	적합	적합	적합	부적합

(다) 최종공정설정

- 위 연구결과 최종공정은 아래 표 6.과 같이 설정

표 33. 제조공정상세

공정	공정상세
1. 원료칭량	주성분: 사군자추출물 부형제: 히드록시프로필셀룰로스 부형제: 카복시메틸셀룰로오스칼슘 부형제: 구연산 부형제: 탄산수소나트륨 활택제: 스테아르산마그네슘 부형제: 이산화규소 용제: 주정
2. 결합액조제	부형제: 히드록시프로필셀룰로스 색소: 카카오색소 색소: 치자황색소 용제: 주정
3. 1차 혼합	주성분: 사군자추출물 부형제: 텍스트린 부형제: 카복시메틸셀룰로오스칼슘 부형제: 구연산
4. 연합	공정 2의 결합액 공정 3의 반제품
5. 건조	공정 4의 반제품
6. 2차 혼합	공정 5의 반제품 부형제: 이산화규소
7. 후혼합	공정 6의 반제품 활택제: 스테아르산마그네슘
8. 타정	공정 7의 반제품
9. 선별	공정 8의 반제품
10. 포장	공정 9의 반제품

(4) 임상약 제조

(가) 시험식품 I : 사군자추출물 500 mg 정제 (사군자추출물로써 250 mg)

배합목적	원료명	분량(mg)	비고
주성분 ¹⁾	사군자추출물	500	
부형제	히드록시프로필셀룰로스	11.5	
부형제	카복시메틸셀룰로오스칼슘	100.0	
부형제	구연산	60.0	
부형제	탄산수소나트륨	100.0	
활택제	스테아르산마그네슘	20.0	
부형제	이산화규소	8.5	
총량		800.0	

¹⁾사군자추출물 = 사군자고형분:덱스트린 = 1:1

(나) 시험식품 II : 사군자추출물 250 mg 정제 (사군자추출물로써 125 mg)

배합목적	원료명	분량(mg)	비고
주성분 ¹⁾	사군자추출물	250.0	
부형제	덱스트린	232.4	
부형제	히드록시프로필셀룰로스	11.5	
부형제	카복시메틸셀룰로오스칼슘	100.0	
부형제	구연산	60.0	
부형제	탄산수소나트륨	100.0	
활택제	스테아르산마그네슘	20.0	
부형제	이산화규소	8.5	
색소	카카오색소	1.6	
색소	치자황색소	16.0	
총량		800.0	

¹⁾사군자추출물 = 사군자고형분:덱스트린 = 1:1

(다) 대조식품

배합목적	원료명	분량(mg)	비고
부형제	덱스트린	464.8	
부형제	히드록시프로필셀룰로스	11.5	

부형제	카복시메틸셀룰로오스칼슘	100.0	
부형제	구연산	60.0	
부형제	탄산수소나트륨	100.0	
활택제	스테아르산마그네슘	20.0	
부형제	이산화규소	8.5	
색소	카카오색소	3.2	
색소	치자황색소	32.0	
총량		800	

(라)제조방법

공정	500 mg 정제 (시험식품 I)	250 mg 정제 (시험식품 II)	Placebo
1. 원료칭량	주성분: 사군자추출물 부형제: 히드록시프로필셀룰로스 부형제: 카복시메틸셀룰로오스칼슘 부형제: 구연산 부형제: 탄산수소나트륨 활택제: 스테아르산마그네슘 부형제: 이산화규소 용제: 주정	주성분: 사군자추출물 부형제: 텍스트린 부형제: 히드록시프로필셀룰로스 부형제: 카복시메틸셀룰로오스칼슘 부형제: 구연산 부형제: 탄산수소나트륨 활택제: 스테아르산마그네슘 부형제: 이산화규소 색소: 카카오색소 색소: 치자황색소 용제: 주정	부형제: 텍스트린 부형제: 히드록시프로필셀룰로스 부형제: 카복시메틸셀룰로오스칼슘 부형제: 구연산 부형제: 탄산수소나트륨 활택제: 스테아르산마그네슘 부형제: 이산화규소 색소: 카카오색소 색소: 치자황색소 용제: 주정
2. 결합액조제	부형제: 히드록시프로필셀룰로스 색소: 카카오색소 색소: 치자황색소 용제: 주정	부형제: 히드록시프로필셀룰로스 색소: 카카오색소 색소: 치자황색소 용제: 주정	부형제: 히드록시프로필셀룰로스 색소: 카카오색소 색소: 치자황색소 용제: 주정
3. 1차 혼합	주성분: 사군자추출물 부형제: 텍스트린 부형제: 카복시메틸셀룰로오스칼슘 부형제: 구연산	주성분: 사군자추출물 부형제: 텍스트린 부형제: 카복시메틸셀룰로오스칼슘 부형제: 구연산	주성분: 사군자추출물 부형제: 텍스트린 부형제: 카복시메틸셀룰로오스칼슘 부형제: 구연산
4. 연합	공정 2의 결합액 공정 3의 반제품	공정 2의 결합액 공정 3의 반제품	공정 2의 결합액 공정 3의 반제품
5. 건조	공정 4의 반제품	공정 4의 반제품	공정 4의 반제품
6. 2차 혼합	공정 5의 반제품 부형제: 이산화규소	공정 5의 반제품 부형제: 이산화규소	공정 5의 반제품 부형제: 이산화규소
7. 후혼합	공정 6의 반제품 활택제: 스테아르산마그네슘	공정 6의 반제품 활택제: 스테아르산마그네슘	공정 6의 반제품 활택제: 스테아르산마그네슘
8. 타정	공정 7의 반제품	공정 7의 반제품	공정 7의 반제품
9. 선별	공정 8의 반제품	공정 8의 반제품	공정 8의 반제품

10.포장	공정 9의 반제품	공정 9의 반제품	공정 9의 반제품
-------	-----------	-----------	-----------

나. 인체적용시험

- 전립선 증상을 가진 남성을 대상으로 HU033 (사군자 추출분말)을 섭취했을 때 대조 식품 (placebo)과 비교하여 전립선 기능 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하는 인체적용시험을 진행 중에 있음

표 34. 인체적용시험계획서 요약

인체적용시험 제목	전립선 건강에 대한 HU033의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 책임자	문두건 교수 (고려대학교 구로병원 비뇨의학과) 김세웅 교수 (가톨릭대학교 서울성모병원 비뇨기과)
인체적용시험 대상	전립선 증상을 가진 남성
인체적용시험 목적	전립선 증상을 가진 남성을 대상으로 HU033(사군자추출분말)을 섭취했을 때 대조식품 (placebo)과 비교하여 전립선 기능 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위함이다.
인체적용시험 단계 및 디자인	단 계: 기타 (건강기능식품) 디자인: 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험용 식품 섭취기간	12주

표 35. 인체적용시험 대상자 수

	시험군 I	시험군 II	대조군	총 시험대상자 수
최종 평가 레수 (PP Set)	36	36	36	108
Drop-out(20%) 고려예수	45	45	45	135

표 36. 인체적용시험 일정 요약

방문1	방문2	방문3	방문4
~ -2 weeks	Week 0	Week 6	Week 12
스크리닝	베이스라인	6주 방문	12주 방문
Screening (2주)	Treatment		

그림 27. 인체적용시험 방법

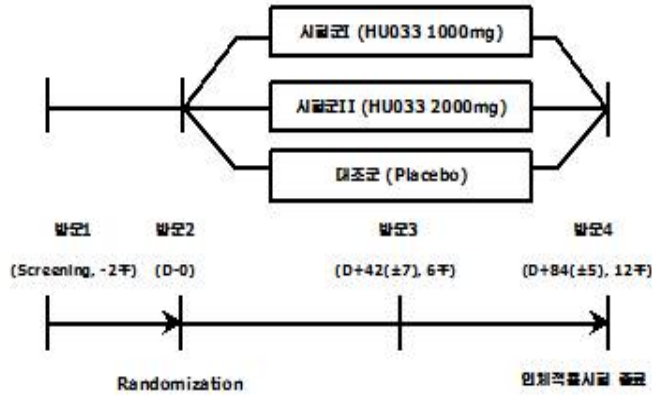


표 37. 인체적용시험 기관별 등록 현황 (2019년 01월 24일 기준)

실시기관	Screened	Screening Failure	Randomized	Active	Dropped out	Completed
고려대학교 구로병원	74	8	66	24	1	41
가톨릭대학교 서울성모병원	78	9	69	39	3	27
합계	141	14	135	60	4	68

표 38. 인체적용시험 기관별 첫 대상자 연구 참여일

	고려대학교 구로병원	가톨릭대학교 서울성모병원
FPI (First Patient In)	2018.06.19	2018.07.19

표 39. 인체적용시험 초기심의 제출 현황

실시기관	심의유형	접수일	심의일	결과	PT	CR F	ICF	IB	승인 유효기간
고려대학교 구로병원	초심의	2018.02.09	2018.02.22	시정 승인	1.0	1.0	01-1.0	1.0	-
	시정승인	2018.03.23	2018.03.29	<u>승인</u>	-	-	01-1.1	-	2018.03.29 ~ 2019.03.28
가톨릭대학교 서울성모병원	초심의	2018.02.23	2018.03.06	시정 승인	1.0	1.0	02-1.0	1.0	-
	시정승인	2018.03.23	2018.04.17	<u>승인</u>	1.1	-	02-1.1	1.1	2018.04.17 ~ 2019.04.16

- 현재 연구참여중인 대상자 및 완료 대상자에게서 발생한 이상반응 (Adverse Event) 및 중대한 이상반응 (Severe Adverse Event)이 확인된 대상자는 없으며, 동의철회로 인한 중도탈락 (고려대학교 구로병원 1명, 가톨릭대학교 서울성모병원 3명)인 경우 이외에 인체적용시험용 식품 섭취 문제로 인한 연구참여가 종료된 경우는 없음
- 총 135명의 목표대상자 등록이 완료되어 연구 진행 중에 있으며, 2019년 4월중으로 마지막 대상자의 최종 방문예정

2.2. 협동연구기관 (충남대학교) : 사군자 추출물로부터 전립선비대증 개선효과를 가진 활성물질 탐색

2.2.1. 사군자 추출물에 대한 *in vitro* 효능 탐색

가. 용매별 분획물에 대한 *in vitro* 효능 검색

(1) 실험방법

- 전립선암 세포주인 LNCaP cell은 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville MD, USA)에서 분양
- 20% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)이 포함된 RPMI-1640 medium (Gibco BRL)에서 배양하고, 각각의 plate에 세포 seeding 전, charcoal-stripped FBS (5%)가 포함된 phenol red-free DMEM을 이용하여 steroid-free 환경에서 일정 시간 배양 후, 실험에 사용. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양, 배지는 2일마다 교체
- 5X10⁵ 개의 LNCaP cell을 6well plate에 도말하고 24시간 배양 후, testosterone 100nM을 control을 제외한 모든 well에 처리
- 용매별 분획물 (증류수, butanol, chloroform, hexane, ethyl alcohol 및 ethyl acetate)을 200, 100 및 50ug/ml로 72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양
- 양성 대조군은 finasteride을 72시간 동안 처리
- 반응이 끝난 후 PBS로 washing 후 LNCaP cell에서 단백질을 분리한 후 androgen receptor (AR) 및 전립선의 상피세포에서 합성되는 단백분해 효소로 전립선암 진단의 종양 표지자인 prostate-specific antigen (PSA)의 발현 정도를 비교하여 추출물의 효능 확인

(2) 실험결과

- 전립선암 세포주인 LNCaP cell에 testosterone을 반응시킨 후 (BPH), AR 및 PSA의 발현을 비교한 결과 control (Ctrl) 과 비교하여 그 발현이 증가함 (그림 1.)
- BPH와 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을시 (Fin), 이러한 발현이 유의적으로 감소함 (그림 28)
- 또한 butanol, hexane 및 ethyl alcohol 분획물 (200ug/ml)에서 BPH와 비교하여 AR 및 PSA의 발현이 유의적으로 감소하여 뛰어난 효능이 관찰됨 (그림 28)

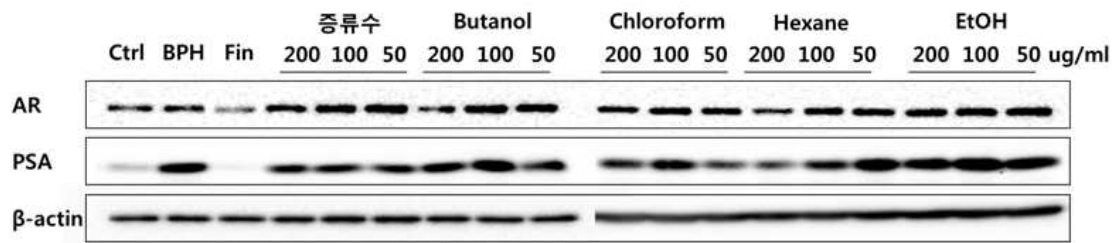


그림 28. 용매별 분획물에 대한 *in vitro* 효능 검색

나. 용매별 분획물에 대한 세포 독성 측정

(1) 실험방법

- 96well plate에 LNCaP cell 1×10^4 개의 세포를 24시간동안 37°C에서 배양
- 용매별 분획물 (증류수, butanol, chloroform, hexane, ethyl alcohol 및 ethyl acetate; 0 ~ 200ug/ml)을 농도별 (0, 50, 100, 200ug/ml)로 세포에 처리하여 72시간 동안 배양 후 EZ Cyttox Assay Kit 10ul/well 을 넣고 2시간 반응
- 450nm에서 흡광도를 측정

(2) 실험결과

- Ethyl acetate 분획물을 제외한 모든 분획물 (증류수, butanol, chloroform, hexane 및 ethyl alcohol)에서 90% 이상의 세포 생존율을 확인

2.2.2. 사군자 추출물에 대한 *in vivo* 효능 검증

가. 전립선 평활근에서의 알파차단 효과를 통한 전립선 이완효능 검증

(1) 실험방법

- 사람의 prostate와 달리 실험동물로부터 적출된 전립샘 근육의 교감신경계 자극은 해부학적 구조에 따라 민감도가 다름
- 특히 arterial lobe에서는 사람과는 상이하게 부교감신경자극에 민감함
- 따라서 ventral prostate를 취하여 교감신경계 자극에 의한 전립선변화 관찰 (그림 29)
- 0.1mM(10⁻⁴M) pheylephrine 전처리 후, 최대 수축기에 시료를 처치하여 이완효능 확인
- 후보물질을 농도별로 전처리하고, Phenylephrine의 농도-반응 비교
- 사군자 추출물에 의해 전립선 평활근의 유의한 이완효과를 관찰: 전립선 조직에서의 α 1-아드레날린 수용체에 차단에 따른 하부요로증상 개선효과를 평가하기 위하여 8주령 백서에서 채취한 전체전립선중 요도부를 둘러싸고 있는 Dorsolateral lobe을 적출하여 50, 100, 200, 400, 600 ug/mL의 농도로 전립선 이완효과를 평가

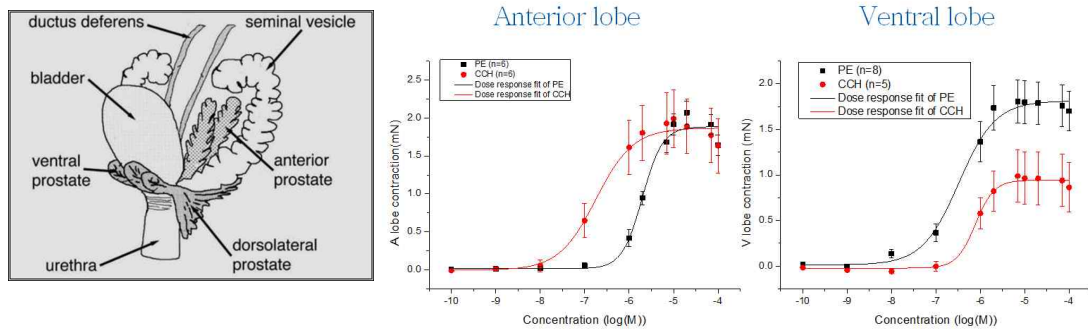


그림 29. Gross anatomy of rat prostate and its orientation with urinary bladder. Each lobe has identical response to sympathetic or parasympathetic stimuli, respectively

(2) 실험결과

- 후보물에 대한 효능 평가를 위한 대조군 (시판중인 알파차단제, Tamsulosin 0.1uM 전처치 후의 백서 ventral lobe의 prostate smooth muscle의 Phenylephrine에 대한 농도-반응곡선을 확보하여, 사군자 및 추출물에 의한 전립선 이완 효능을 평가함 (그림 30)

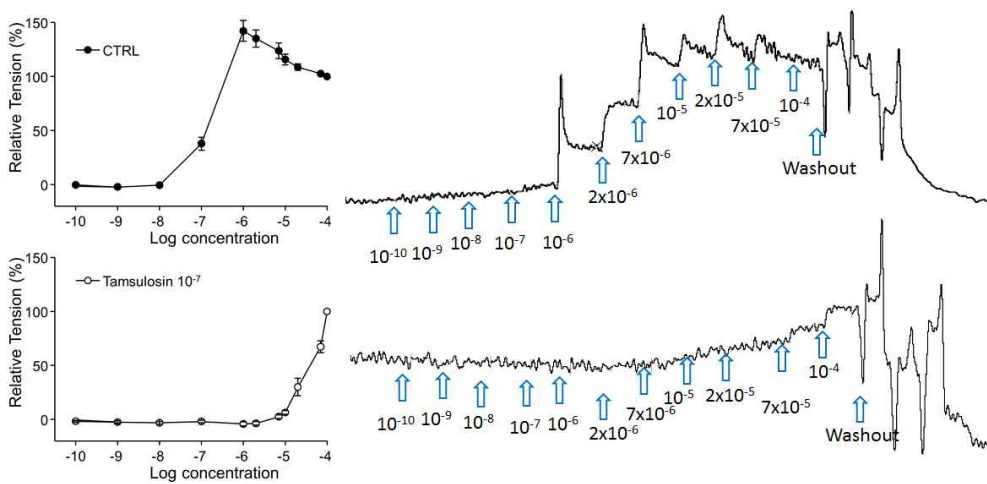


그림 30. 백서 전립선 Ventral lobe에서의 Tamsulosin 0.1uM에 의한 Phenylephrine에 대한 길항 작용을 확인

- 사군자 추출물에 대한 알파 차단 및 전립선 이완 효능 평가, *ev vivo*. Acute 효과를 확인하기 위하여 10uM Phenylephrine으로 유도된 백서의 ventral lobe의 수축에 대한 이완효능을 동량의 vehicle (DMSO)을 처치한 전립선 조직과 비교함
- Phenylephrine에 의해 유도된 전립선 조직의 수축은 DMSO 처치군에서 자발적인 이완을 보여줌. 사군체 추출물을 점증적으로 그 투여량을 증가시키므로써 농도의존적

인 전립선 조직의 이완을 관찰함 (그림 31)

- 추가적인 작용 기전 및 그 분획물에 대한 효능의 작용기전에 관한 연구 수행중

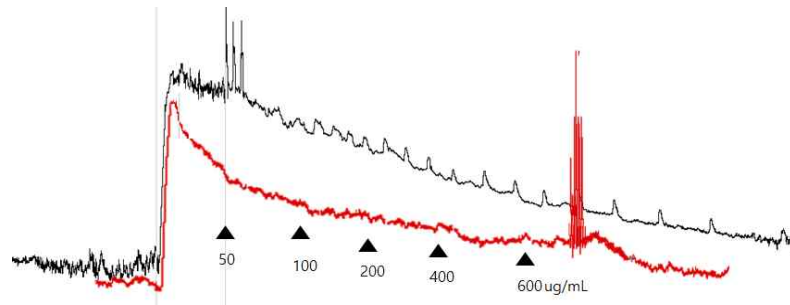


그림 31. 백서 전립선 Ventral lobe에서의 사군자 추출물의 이완효능 평가

나. 혈관 평활근에서의 알파차단효과 및 효능 검증

(1) 실험방법

- 8주령 수컷 SD rat으로부터 분리한 pulmonary intercostal artery을 modified Kreb's solution (조성; NaCl 120mM, CaCl₂.H₂O 2.5mM, MgCl₂ 2mM, Glucose 11mM, NaHCO₃ 25mM, NaH₂PO₄.H₂O 1.2mM, KCl 5.9mM, pH 7.4 with 95%O₂+5% CO₂ mixture gas)에서, Isometric transducer (havard bioscience 52-9503, USA)를 이용하여 측정
- β-와 α₂-adrenergic receptor 효과를 차단하기 위하여, 1μM propranolol과 0.1μM Yohimbine을 각각 처치
- 시료의 α₁-adrenergic receptor 차단효과를 검증하기 위하여, 다양한 농도의 시료를 30분간 전처리하고 phenylephrine 농도-반응 곡선을 기록하여 그 효과 검증
- 알파차단 및 혈관이완효과의 기전을 약리학적 기법을 통하여 탐색

(2) 실험결과

- 알파₁ 차단제인 Tamsulon 0.1μM에 대한 효능과 사군자 추출물 200ug/mL의 알파차단 및 평활근 이완제로서의 효과를 확인
- 사군자 추출물에 의한 혈관 평활근에 대한 알파차단 및 평활근 이완제로서의 효능은 시중의 알파차단제에 비하여 그 효과가 약하거나 없다고 평가 (그림 32)
- 따라서 사군자 추출물을 이용한 전립선 알파차단 및 전립선 비대증 치료제로의 개발 시 혈관계 부작용은 미약할 것으로 평가
- ex vivo에서 확인되었던 혈관계에 대한 안전성은 2년차 과제를 통해서 in vivo 수준에서의 심혈관계 안전성에 대한 평가가 필요함

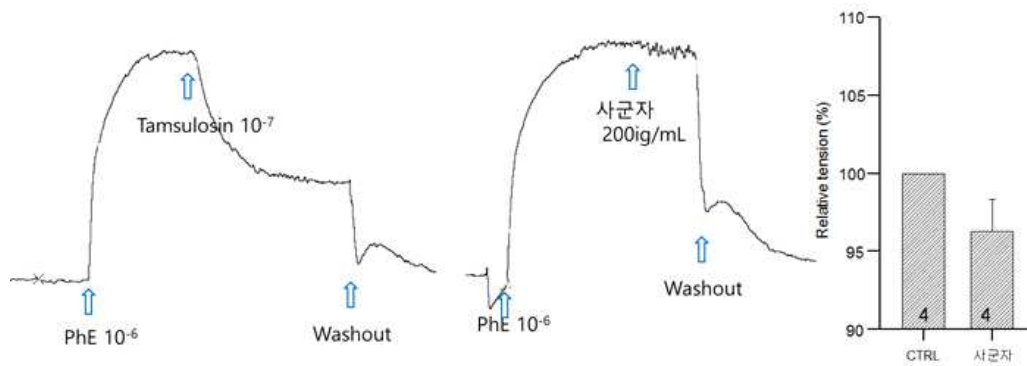


그림 32. 백서 흉대동맥 평활근에서의 1 μ M Phenylephrine에 의한 수축에 대한 길항 효과의 비교, 0.1 μ M Tamsulosin, 200 μ g/mL 사군자 추출물

다. 발기부전 부작용 극복을 위한 후보물질의 음경해면체 평활근 이완 효과 평가

(1) 실험방법

- 해면체 평활근 세포의 이완효과를 통한 발기부전 개선효과 검증
- 체중 3.5 kg 전후의 수컷 New Zealand White 토끼를 마취하에 음경해면체 평활근 조직 (2*2*10 mm)을 분리한 후 Krebs buffer (composition in mmol/l: 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 24.9 NaHCO₃, and 11.1 D - glucose) 조건에서 평활근 조직을 1 시간 동안 안정화
- 내피세포 제거는 해면체 평활근을 비벼 문지름, 이러한 해면체 평활근절편은 phenylephrine (이하 PHE)으로 수축을 유발시키고 acetylcholine (이하 Ach)에 의한 이완효과의 유무로 내피세포의 존재여부를 확인
- 10⁻⁵ M/L phenylephrine (PE)을 투여하여 평활근의 수축을 유도하고 다양한 농도의 시료를 각각 처리한 후 농도-장력 변화 곡선 기록 (그림 33)
- 각각의 약물 반응을 관찰한 후 다음 실험까지는 3회 이상 생리용액으로 씻고 약 20 분 이상 안정상태를 유지한 후 진행

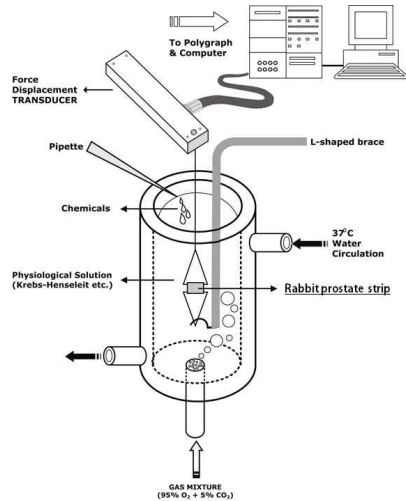


그림 33. Diagram of organ bath system for myograph (*Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery* <http://dx.doi.org/10.5772/54723>)

(2) 실험결과

- 동량의 vehicle (DMSO)을 처치한 대조군에서 유의한 수준의 이완이 관찰되었고, 사군자 추출물에 의한 음경해면체 평활근의 이완을 관찰하였으나 통계적으로 그 차이가 없음 (그림 34.)
- 사군자 추출물 단독으로는 음경해면체 이완을 통한 성기능 개선의 효능이 크지 않을 것으로 판단
- 사군자 추출물 이외에 과제를 위해 확보한 후보 시료군에서 음경해면체 평활근 이완의 효능을 보이는 후보물질을 도출하여 그 작용 기전에 관하여 연구를 수행 중
- 추가적인 실험 및 사군자 및 국내 자생 천연물 후보군으로부터 음경해면체에 효능을 보이는 물질을 탐색할 예정

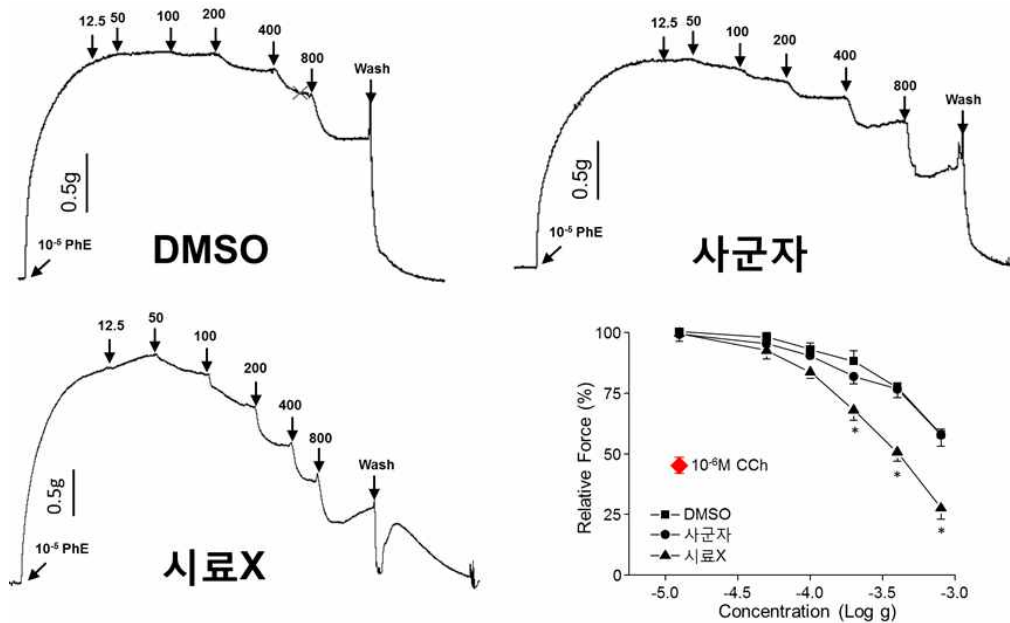


그림 34. 사군자 및 유효 시료에 대한 가토의 음경해면체 평활근 이완 효능 평가

2.2.3. 전립선 유래 세포주를 이용한 *in vitro* 작용기전 연구

가. Androgenic receptor 발현평가

(1) 실험방법

- 전립선암 세포주인 LNCaP cell는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville MD, USA)에서 분양
- 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)이 포함된 RPMI-1640 medium (Gibco BRL)에서 배양하고, 각각의 plate에 세포 seeding 전, charcoal-stripped FBS (5%)가 포함된 phenol red-free DMEM을 이용하여 steroid-free 환경에서 일정 시간 배양 후, 실험에 사용. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양, 배지는 2일마다 교체
- 5X10⁵ 개의 LNCaP cell을 6well plate에 도말하고 24시간 배양 후, testosterone 100nM을 normal control (NC)을 제외한 모든 well에 처리
- 사군자 추출물을 10, 25 및 50ug/ml로 72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양
- 양성 대조군은 finasteride을 72시간 동안 처리
- 반응이 끝난 후 PBS로 washing 후 LNCaP cell에서 단백질을 분리한 후 androgen receptor (AR)의 발현 정도를 비교하여 추출물의 효능 확인

(2) 실험결과

- 전립선암 세포주인 LNCaP cell 세포에 testosterone을 반응시킨 후 (TP), AR의 발현을 비교한 결과 정상 대조군 (NC) 과 비교하여 그 발현이 증가함 (그림 35)
- testosterone을 반응시킨 그룹 (TP)와 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을시 (TP+Fina), 이러한 발현이 유의적으로 감소함 (그림 35)
- 또한 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 BPH와 비교하여 농도 상관성으로 AR의 발현이 유의적으로 감소하여 뛰어난 효능이 관찰됨 (그림 35)

나. Prostate-specific antigen 발현평가

(1) 실험방법

- 5X10⁵ 개의 LNCaP cell을 24시간 배양 후, testosterone 100nM을 normal control (NC)을 제외한 모든 well에 처리
- 사군자 추출물 10, 25 및 50 ug/ml 또는 finasteride을 72시간 동안 처리
- PBS로 washing 후 LNCaP cell에서 단백질을 분리한 후 전립선의 상피세포에서 합성되는 단백분해 효소로 전립선암 진단의 종양 표지자인 prostate-specific antigen (PSA)의 발현 정도를 비교하여 추출물의 효능 확인

(2) 실험결과

- 전립선암 세포주인 LNCaP cell 세포에 testosterone을 반응시킨 후 (TP), PSA의 발현을 비교한 결과 정상 대조군 (NC) 과 비교하여 그 발현이 증가함 (그림 8)
- testosterone을 반응시킨 그룹 (TP)와 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을시 (TP+Fina), 이러한 발현이 유의적으로 감소함 (그림 8)
- 또한 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 BPH와 비교하여 농도 상관성으로 PSA의 발현이 유의적으로 감소하여 뛰어난 효능이 관찰됨 (그림 8)

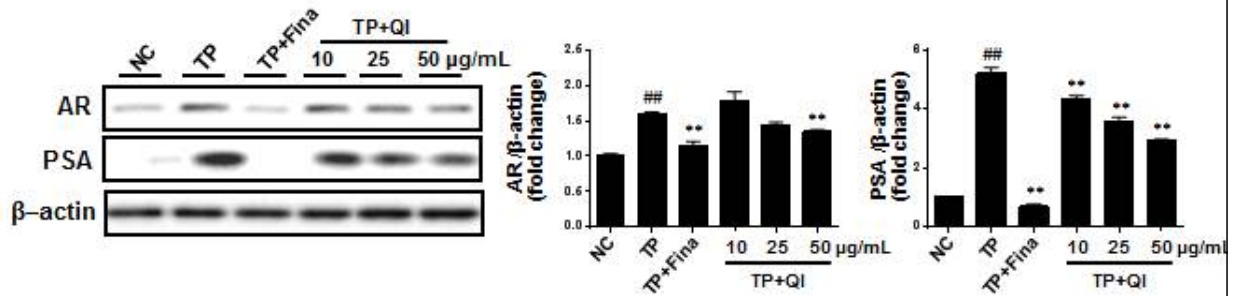


그림 35. AR 및 PSA의 발현에 대한 사군자 추출물의 *in vitro* 평가

2.2.4. 전립선비대증 동물모델을 이용한 *in vivo* 작용기전 연구

가. 전립선비대로 유발된 내피세포의 증식 조절 여부 확인 및 관련 signal 분석

(1) 실험방법

- 전립선비대증 동물 모델 유발: SD rat을 이용하여 testosterone을 매일 피하주사 하여 전립선 비대증 유발
- 전립선 조직에서의 hematoxylin and eosin 염색: 전립선조직을 파라핀 포매 후 절편을 만들고 헤마톡실린 (hematoxylin)과 에오신 와이 (Eosin Y; ThermoShandon, USA)로 염색하고 곧 이어 봉입액으로 봉입하며, 염색과 봉입이 끝난 슬라이드는 광학현미경으로 검경하여 전립선 상피세포의 두께를 비교
- 전립선 조직에서 면역화학염색: 전립선 조직에서 cell proliferation을 확인하기 위해 전립선 조직을 10% 중성완충-포르말린으로 24시간 고정한 후 파라핀 포매 (embedding)를 실시하며, 포매 조직은 4 μm 두께로 절단하여 절편을 만들고, 파라핀 제거후 ABC kit를 이용해 PCNA에 대해 면역염색 실시하여, DAB로 발색 후, 양성 세포를 카운팅 하여 비교
- 단백질 발현(western blotting) 비교: : lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail)을 이용하여 단백질 분리. Bradford 법에 따라 단백질 정량 후 20 μg을 SDS-PAGE gel 상에 전기영동. PVDF 또는 nitrocellulose membrane으로 단백질을 transfer 한 다음, 5% skim milk/0.1% TBST에서 실온, 1시간 blocking. anti-PCNA antibody (Ab) 및 anti-cyclin D1 Ab (1:1000 in blocking solution)와 4°C, 12-16 시간, HRPO-conjugated anti-mouse 또는 rabbit secondary Ab (1:2000 in TBST)와 실온, 1 시간 반응. ECL Westsern blotting detection substrate solution을 membrane에 가한 후 1분간 반응. Bio-Rad 사의 Gel Doc system을 이용하여 단백질 발현 검출

(2) 실험결과

- 정상 SD rat (NC)와 비교하여 testosterone을 투여하여 전립선비대증을 유발한 군 (TP)에서 전립선 상피세포의 두께가 유의적으로 증가함 (그림 36)
- 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을

- 시 (TP+Fina), 전립선 상피세포의 두께가 유의적으로 감소함 (그림 36)
- 또한 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 전립선 상피세포의 두께가 유의적으로 감소함 (그림 36)
- 이는 양성대조군이 finasteride를 처리한 군 (TP+Fina)과 비슷한 효과였음 (그림 36)

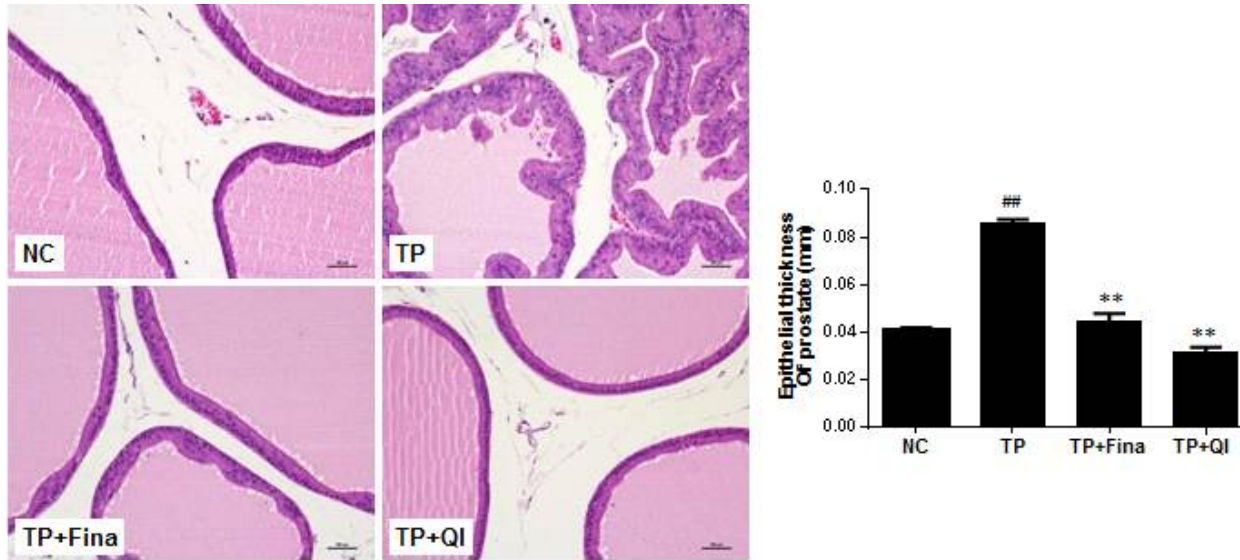


그림 36. 전립선 조직에 대한 hematoxylin and eosin 염색

- 전립선 조직에서 cell proliferation을 확인하기 위해 전립선 조직 절편에 PCNA에 대한 면역염색을 실시한후 비교한 결과 정상 SD rat (NC)와 비교하여 testosterone을 투여하여 전립선비대증을 유발한 군 (TP)에서 PCNA 양성 세포의 수가 유의적으로 증가함 (그림 40)
- 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을 시 (TP+Fina), PCNA 양성 세포의 수가 유의적으로 감소함 (그림 40)
- 또한 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 PCNA 양성 세포의 수가 유의적으로 감소함 (그림 40)
- 이는 양성대조군이 finasteride를 처리한 군 (TP+Fina)과 비교하여 더 좋은 효과를 보임 (그림 10)

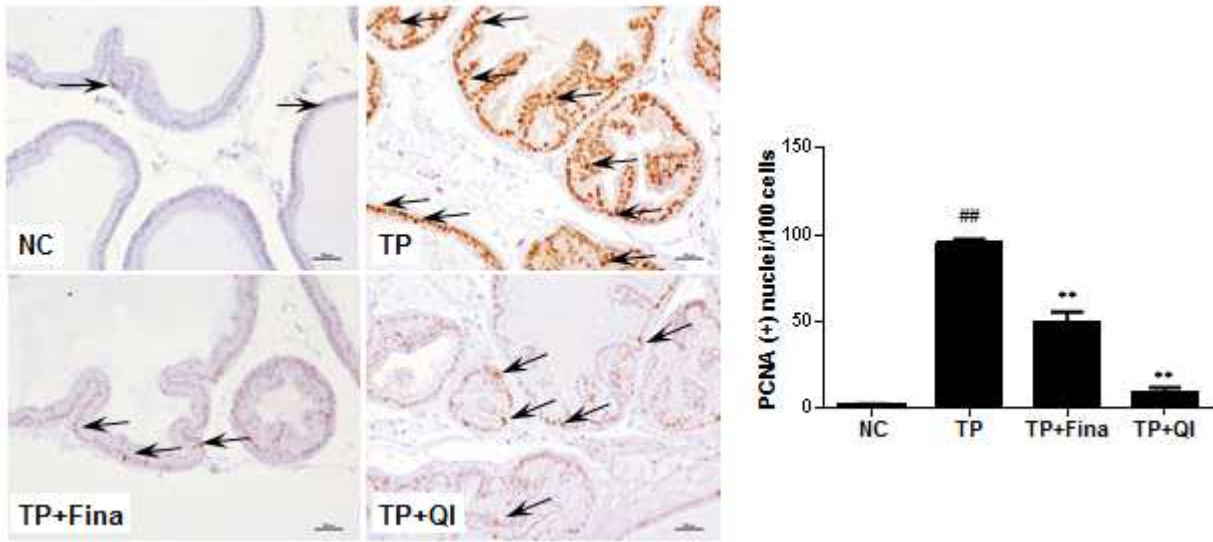


그림 40. 전립선 조직에 대한 PCNA 면역조직염색

- 또한 전립선 조직에서 단백질을 분리한후 western blot을 실시한 결과 정상 SD rat (NC)와 비교하여 testosterone을 투여하여 전립선비대증을 유발한 군 (TP)에서 PCNA 및 cyclin D1의 발현이 유의적으로 증가함 (그림 41)
- 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을 시 (TP+Fina), PCNA 및 cyclin D1의 발현이 유의적으로 감소함 (그림 41)
- 또한 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 PCNA 및 cyclin D1의 발현이 유의적으로 감소함 (그림 41)
- 이는 양성대조군이 finasteride를 처리한 군 (TP+Fina)과 비슷한 효과를 보임 (그림 41)

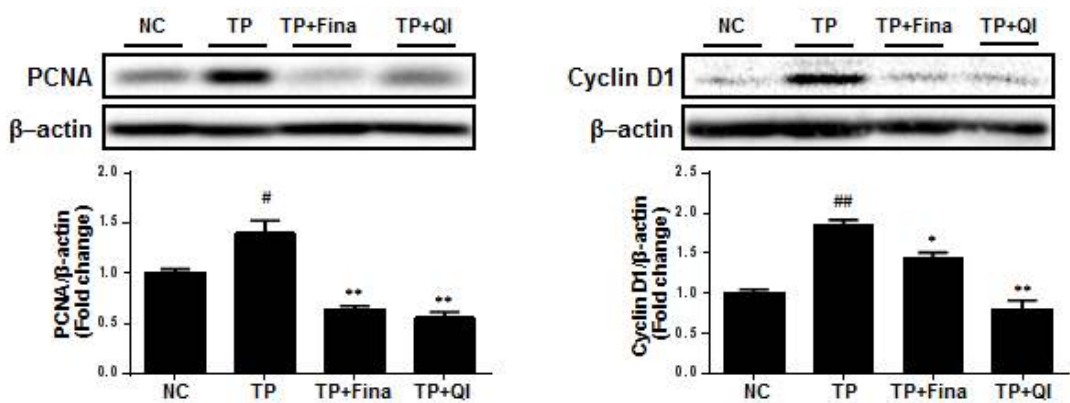


그림 11. 전립선 조직에 대한 PCNA 및 cyclin D1에 대한 western blotting

나. 세포 사멸 조절 여부 확인 및 관련 signal 분석

(1) 실험방법

- 전립선비대증 동물 모델 유발
- 전립선 조직에서 TUNNEL 염색: 전립선 조직에서 cell proliferation을 확인하기 위해 전립선 조직 절편에 PCNA에 대한 일차 항체를 반응시킨 후 양성 세포를 카운팅 하여 비교
- 단백질 발현(western blotting) 비교: : 단백질 분리 후 anti-caspase-3 Ab, anti-caspase-9 Ab, bcl-2 Ab 및 bax Ab (1:1000 in blocking solution)와 12-16 시간, HRPO-conjugated anti-mouse 또는 rabbit secondary Ab (1:2000 in TBST)와 실온, 1 시간 반응. ECL Westsern blotting detection substrate solution을 membrane에 가한 후 1분간 반응. Bio-Rad 사의 Gel Doc system을 이용하여 단백질 발현 검출

(2) 실험결과

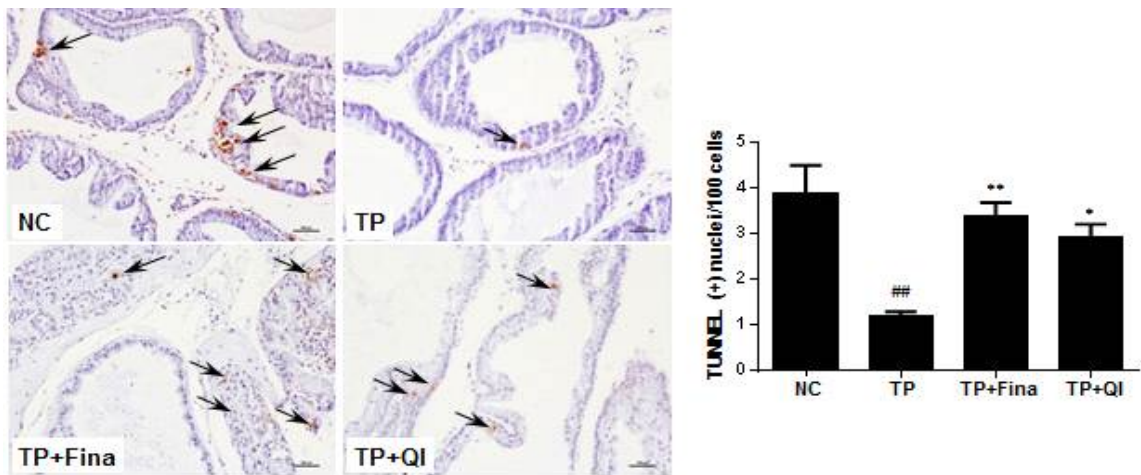


그림 42. 전립선 조직에 대한 TUNNEL염색

- 전립선 조직에서 세포사멸 (apoptosis)을 확인하기 위해 전립선 조직 절편에 대한 TUNNEL염색을 실시한후 비교한 결과 정상 SD rat (NC)와 비교하여 testosterone을 투여하여 전립선비대증을 유발한 군 (TP)에서 apoptotic cell의 수가 유의적으로 감소함 (그림 42)
- 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을시 (TP+Fina), apoptotic cell의 수가 유의적으로 증가함 (그림 42)
- 또한 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 apoptotic cell의 수가 유의적으로 증가함 (그림 42)
- 이는 양성대조군이 finasteride를 처리한 군 (TP+Fina)과 비교하여 더 좋은 효과를 보임 (그림 42)
- 또한 전립선 조직에서 단백질을 분리한 후 western blot을 실시한 결과 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을시 (TP+Fina), cleaved caspase-3 및 caspase-9의 발현이 유의적으로 증가함 (그림 43)
- 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 cleaved caspase-3 및 caspase-9의 발현이 유의적으로 증가하였으며 이는 양성대조군이 finasteride를 처리한 군 (TP+Fina)과 비슷한 효과를 보임 (그림 43)

- anti-apoptotic protein인 bcl-2 및 pro-apoptotic protein인 bax의 발현을 비교한 결과 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리한 군 (TP+Fina) 및 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 bcl-2의 발현은 감소한 반면 bax의 발현은 유의적으로 증가함 (그림 43)

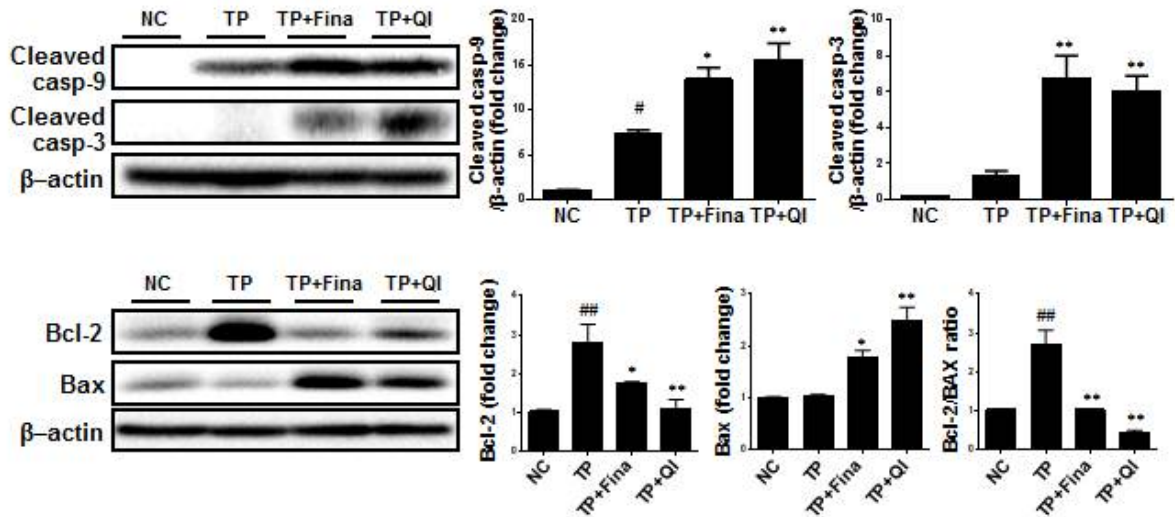


그림 43. 전립선 조직에 대한 caspase-3, caspase-9, bcl-2 및 bax에 대한 western blotting

다. 세포 증식 및 사멸을 조절하는 작용 기전 규명

(1) 실험방법

- 단백질 발현(western blotting) 비교: : 단백질 분리 후 phospho-AKT Ab, total-AKT Ab, phospho-GSK3 beta Ab, total-GSK3 beta Ab (1:1000 in blocking solution)와 12-16 시간, HRPO-conjugated anti-mouse 또는 rabbit secondary Ab (1:2000 in TBST)와 실온, 1 시간 반응. ECL Westsern blotting detection substrate solution을 membrane에 가한 수 1분간 반응. Bio-Rad 사의 Gel Doc system을 이용하여 단백질 발현 검출

(2) 실험결과

- 정상 SD rat (NC)와 비교하여 testosterone을 투여하여 전립선비대증을 유발한 군 (TP)에서 세포의 성장 및 사멸을 조절하는 phospho-AKT 및 phospho-GSK3 beta의 발현이 유의적으로 증가함 (그림 44)
- 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 양성 대조군인 finasteride를 처리하였을 시 (TP+Fina), phospho-AKT 및 phospho-GSK3 beta의 발현이 유의적으로 감소함 (그림 44)
- 또한 사군자 추출물을 투여한 군 (TP+QI)에서 전립선비대증을 유발한 군 (TP)과 비교하여 phospho-AKT 및 phospho-GSK3 beta의 발현이 유의적으로 감소함 (그림 44)
- 이는 양성대조군이 finasteride를 처리한 군 (TP+Fina)과 비슷한 효과를 보임 (그림 14)

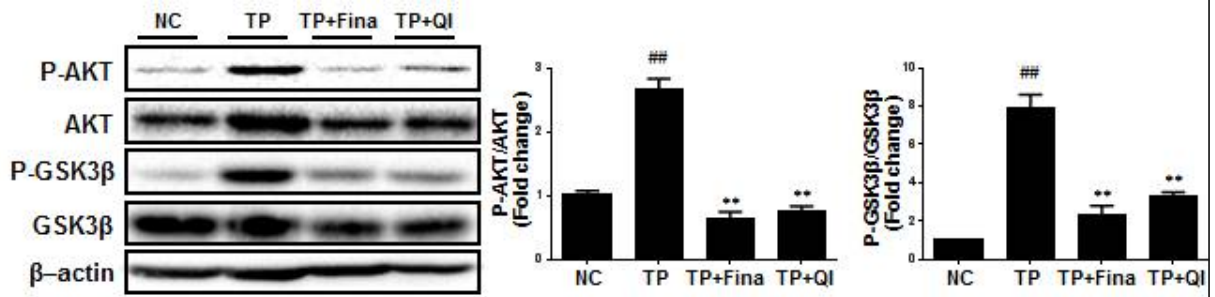


그림 44. 전립선 조직에 대한 phospho-AKT Ab, total-AKT Ab, phospho-GSK3 beta Ab, total-GSK3 beta에 대한 western blotting

(가) 하부요로증상 완화 효능 평가

① 사군자 분획물에 따른 전립선 평활근의 *ex vivo* 이완효능 평가

- 실험방법

- 사람의 prostate와 달리 실험동물로부터 적출된 전립샘 근육의 교감신경계 자극은 해부학적 구조에 따라 민감도가 다름
- 특히 arterial lobe에서는 사람과는 상이하게 부교감신경자극에 민감함
- 따라서 ventral prostate를 취하여 교감신경계 자극에 의한 전립선변화 관찰 (그림 12.)
- 0.1mM(10⁻⁴M) phenylephrine 전처리 후, 최대 수축기에 시료를 처치하여 이완효능 확인
- 후보물질을 농도별로 전처리하고, Phenylephrine의 농도-반응 비교
- 사군자 추출물에 의해 전립선 평활근의 유의한 이완효과를 관찰: 전립선 조직에서의 α1-아드레날린 수용체에 차단에 따른 하부요로증상 개선효과를 평가하기 위하여 8주령 백서에서 채취한 전체전립선중 요도부를 둘러싸고 있는 Dorsolateral lobe을 적출하여 50, 100, 200, 400, 600 ug/mL의 농도로 전립선 이완효과를 평가

- 실험결과

- 전립선 시료에 H₂O분획물, H₂O layer에 대한 전립선 이완효능 식염수만을 처치한 대조군에 비하여 차이가 없었으며, 기존에 확인한 바와 같이 전립선 이완 효능은 없음 (그림 45)

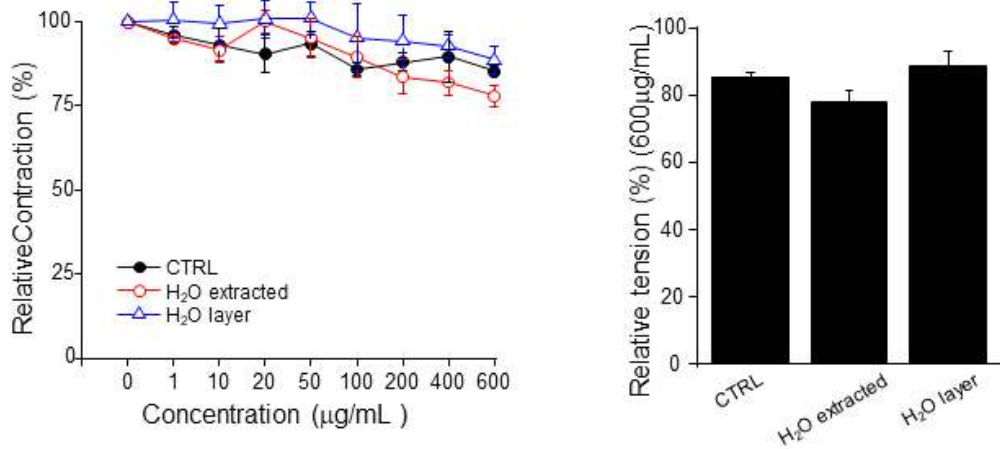


그림 45. 사군자 물분획물에 대한 전립선 이완 효능 평가

- 전립선 시료에 각기 다른 분획으로부터 획득한 시료를 처치하였으나 대조군인 동량의 DMSO를 처치한 조건과 차이가 없음. 물분획물 또는 식염수만을 처치한 실험에 비하여 전립선의 자발적 이완 (spontaneous relaxation)이 일어났으며 이는 DMSO에 의한 K⁺ channel 활성화 및 평활근 이완조절과 관련이 있음 (그림 46)

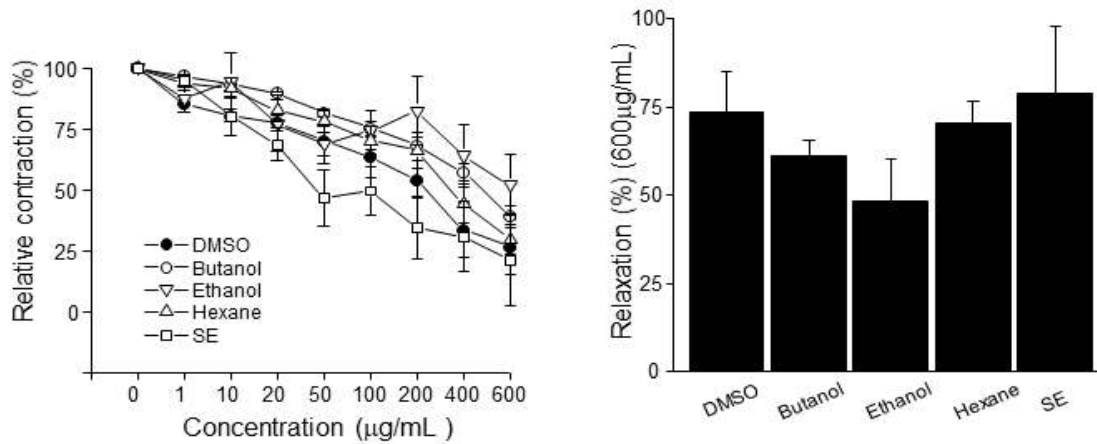


그림 46. 사군자 분획물에 대한 전립선 이완 효능 평가

- 전립선 시료에 시중에 판매중인 카리토, 전립소 (CJ)에 대한 동등성 효능을 평가하였음. 비록 전립소 (CJ)가 전립선 평활근에 대한 큰 이완효과가 관찰되었지만, 카리토는 사군자 EtOH 분획물과 유사한 전립선 이완효능을 보임 (그림 47)

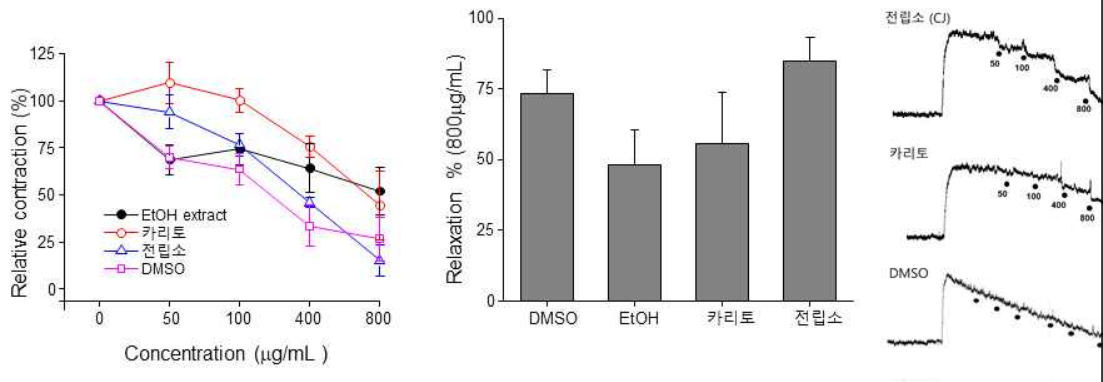


그림 47. 시판중인 약물에 대한 효능 동등성 평가

- 흉대동맥 시료에 시중에 판매중인 카리토, 전립소 (CJ,2015), 전립소 (CJ,2017)에 대한 동등성 효능을 평가하였음. 비록 전립소 (CJ)가 혈관평관에 대한 큰 이완효과가 있으나, 카리토는 사군자와 크게 다르지 않음 (그림 48)

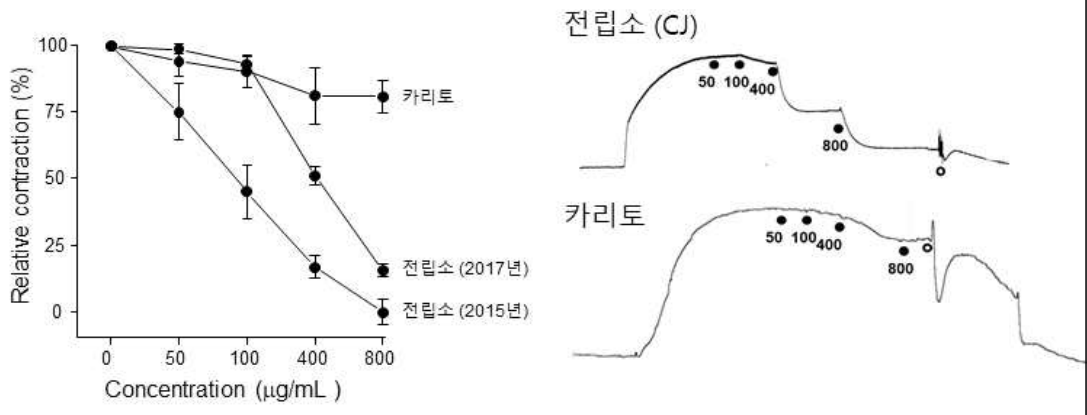


그림 48. 시판중인 약물에 대한 효능 동등성 평가

② 사군자 추출물의 전립선비대증에 유발된 하부요로증상 개선 효능 평가

- 실험방법

- 전립선비대증에 의한 요도내압변화를 관찰하기 위한 모델동물 확립 (그림 49)
- : 요도내압 측정을 통한 하부요로증상의 완화 효능 평가를 위해 10주령 수컷 SD 랫드 전립선 요도부의 압력 측정

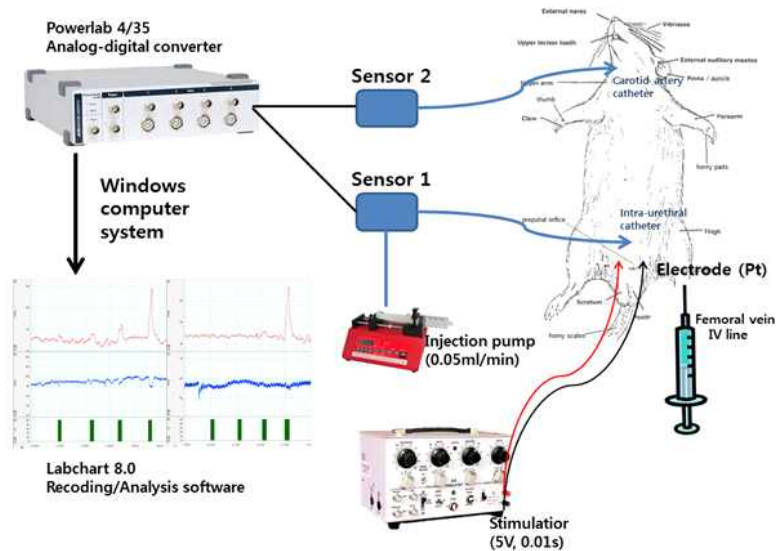


그림 49. 전립선비대증에 의한 요도내압변화를 관찰하기 위한 모델동물

- : 실험동물: 체내 전립선 요도압의 측정을 위해서 10주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 (380 ~ 400g)를 사용
 - : 마취 후 하복부에 정중절개를 한 다음 방광을 노출시켜서 주사기로 소변을 제거하고 방광이 소변으로 다시 채워지는 것을 막기 위해서 요관에 폴리에틸렌 도관을 설치하여 소변을 체외로 빼냄
 - : 요도압력을 측정하기 위해서 PE tube을 외요도구를 통해서 전립선 요도부에 위치시킴
 - : 전립선 요도부의 tube를 연결한 후 약 30분 정도의 안정기를 거친 다음, 하복신경에 전기자극을 주고 변화를 관찰한 뒤, 다양한 농도의 시료를 정맥주사로 투여하여 전기자극을 주고 요도압력 상승의 변화 관찰
 - : 전기자극은 platinum bipolar hook electrode로 하였고, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz로 주파수 변화를 주고, 전압은 5 V, 진폭은 1 ms (S48 Square Pulse Stimulator, Grass Technologies, USA)로 하복신경을 자극하여 변환기 (FT03, Grass Telefactor West Warwick, RI, USA)를 통해 전립선 요도부의 압력 변화 관찰 주파수 세기에 따른 전립선 요도부의 압력 측정
 - : 하복 신경에 전기자극을 주게 되면 요도내압의 수축이 나타나고, data 분석은 수축기에 면적을 계산(Origin program)하여 data 비교
 - : 정상 쥐에서의 주파수 세기에 따른 요도내압을 확인하기 위해 전기 자극 조건은 1 ms, 5 V, 60 s로 동일하게 하고 주파수의 세기(5, 10, 20 Hz)를 다르게 함. 주파수가 강해짐에 따라 요도내압 수축율도 증가함
- *In vivo* 요도내압 측정기법 확립 및 알파차단효과 및 교감신경자극 반사 평가 (그림 50, 51)

- : 실험방법을 통해 준비되어진 동물에 0.01mg/kg의 알파차단제인 tamsulosin을 정맥주사하여 요도내압의 변화와 혈압의 변화를 관찰하였으며 아래 그림과 같이 정상군의 동물에서는 35mmHg의 안정적인 요도내압력이 tamsulosin처치 후 10mmHg 낮아져 25mmHg에 항정상상태를 유지함
- : 실험동물의 노출된 방광을 기준으로 prosate와 urethral의 위치를 추정하여 Urethra부분을 Stimulation시키기 위해서는 방광 노출부의 정중선 꼬리쪽 5mm아래를 기준으로 좌측 우측 각각 5mm씩 떨어진 곳에 백금 전극을 위치하여 5V, 0.01s로 설정하여 5Hz, 10Hz, 20Hz의 빈도로 Stimulation시면 자극의 빈도(Hz)에 비례하여 요도내압의 상승이 일어나며 이는 tamsulosin 투여시에 현저히 요도내압의 상승이 감소함

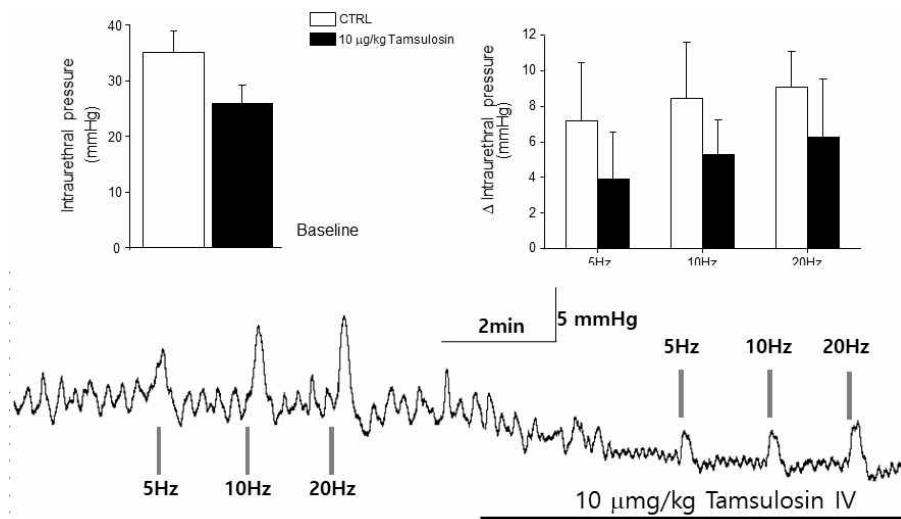


그림 50. *In vivo* 요도내압 측정기법 확립 및 알파차단효과 및 교감신경자극 반사 평가 방법

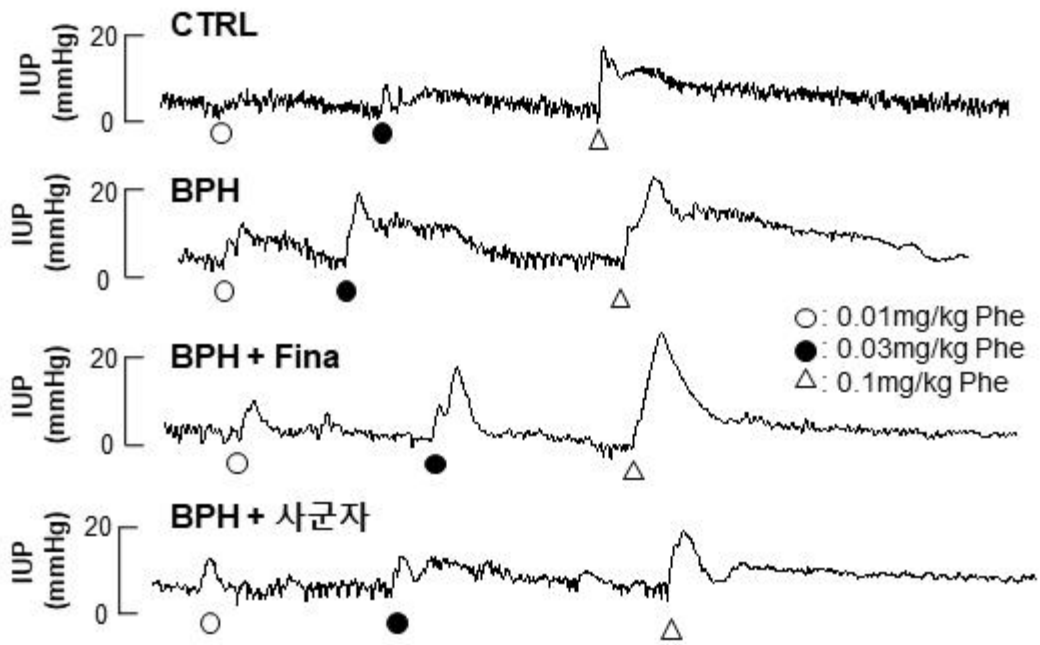


그림 51. *In vivo* 요도내압 측정기법 확립 및 알파차단효과 및 교감신경자극 반사 평가 방법

- 전립선비대증의 유발과 치료 처치 방법
: 요도내압 측정을 통한 하부요로증상의 완화 효능 평가를 위해 10주령 수컷 SD 랫드 전립선 요도부의 압력 측정
- 전립선비대증 모델동물에서의 치료 처치군에서의 하부요로증상 완화 효능 평가 (그림 52)
: 아래의 조건으로 Testosterone과 동시에 4주간 각 실험군별로 다른 조건의 실험조건을 제공하고, 4주차에 요도내압 및 하복신경을 자극을 통한 전립선 요도부의 압력 변화 관찰

Groups		
CTRL	Corn oil (3mg/Kg of BW/day)	
BPH	Testosterone (3mg/Kg of BW/day)	
BPH+ Fina	Testosterone (3mg/Kg of BW/day) (S.C.)	Supplied with Finasteride 10mg/Kg of BW/day (P.O.)
BPH +Fina+QI	Testosterone (3mg/Kg of BW/day) (S.C.)	Supplied with Comps 450mg/Kg and Finasteride 10mg/Kg of BW/day (P.O.)

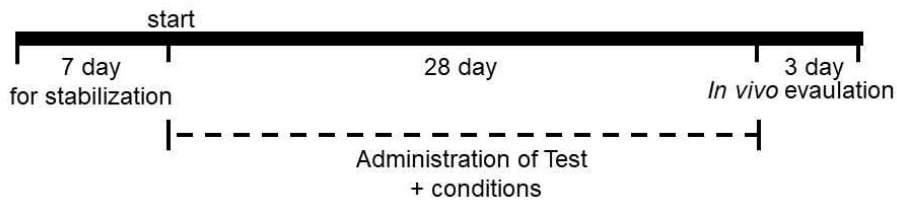


그림 52. 전립선비대증 모델동물에서의 치료 처치군에서의 하부요로증상 완화 효능 평가

- 실험결과

• 휴지기 요도내압의 변화

: corn oil만을 투여한 intact군에 TP를 처치하여 유도한 BPH군에서 요도내압의 통계적으로 유의한 상승을 관찰하였으며, 이러한 요도내압의 상승은 5 α -reductase 억제제인 Finasterid를 투여함으로써 감소하였고, 사군자 처치군에서도 finasteride 투여군과 동등한 요도내압 감소를 관찰함 (그림 53)

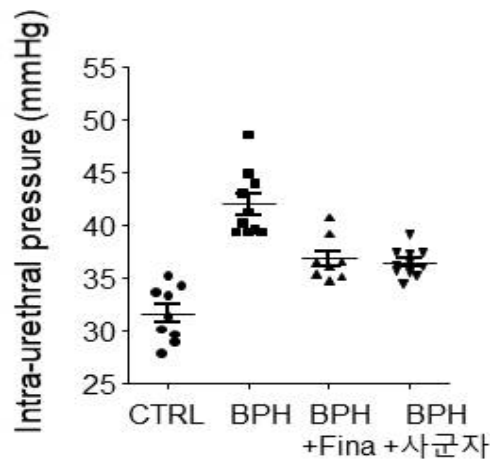


그림 53. 전립선비대증 모델동물에서의 휴지기 요도내압의 변화

• 전립선 및 남성생식기의 크기에 미치는 영향 (그림 54)

: 테스토스테론 (10 mg/kg, s.c.)을 투여하여 유도한 전립선 비대군은 대조군에 비해 전립선의 무게가 유의하게 증가

: 반면, 5-알파 환원효소 억제제로 임상에서 사용 중인 Finasteride 처리군은 전립선비대군에 비해 전립선중 Ventral lobe의 무게가 현저히 감소

: 사군자 처리군에서 전립선비대 유도군에 비해 전립선 무게가 감소하였으며, 이는 Finasteride 투여군에 비해서는 전립선의 무게의 감소가 크지 않음

: 전립선 이외에도, 하부요조직의 경우 BPH군에서 그 크기가 증가하였으나, Finasteride와 사군자 투여군에서는 그 크기의 증가가 의미있게 감소

: 정소의 경우 모든 군에서 통계적으로 큰 차이를 보이지 않음

: 해면체의 크기는 BPH군에서 크게 증가하였으며, Finasteride 또는 사군자를 투여군에서 그 크기의 증가가 감소하였음

: 이러한 전립선 및 남성생식기의 변화로 미루어 사군자에 의한 요도내압의 조절은 전립선 크기의 증가를 억제함으로써 이루어지며, 5-alpha reductase를 투여함으로써 DHT 저하에 따른 남성생식기 발달의 억제하는 효과가 있음을 확인

: 사군자는 양성대조군인 Finasteride와 동등하거나 비슷한 수준의 효능을 갖음

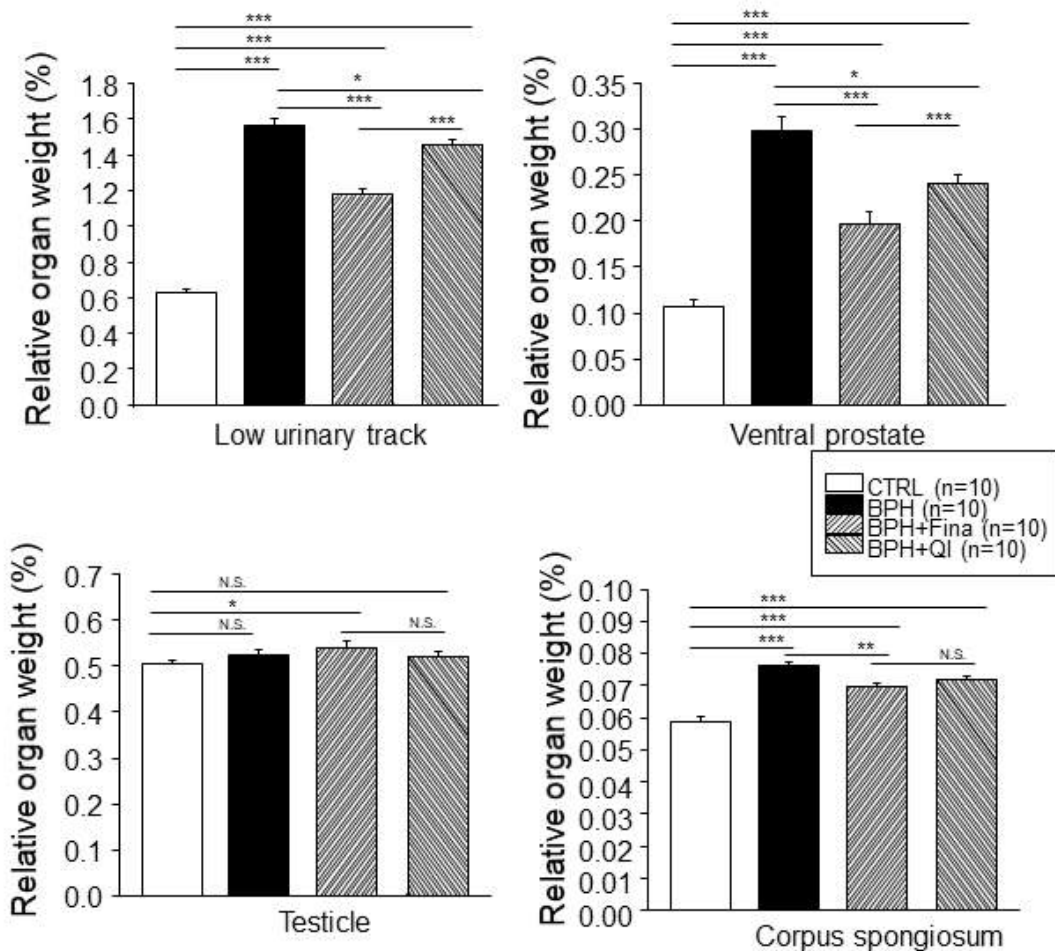


그림 54. 전립선 및 남성생식기의 크기에 미치는 영향

- hypogastric nerve 자극을 통한 요도내압 변화에 미치는 영향 (그림 55)
- : 교감신경계 항진을 통해 요도내압을 상승시키는 Hypogastric nerve를 선택적으로 전기자극으로 흥분시키면 유의한 요도내압의 상승을 관찰 할 수 있고, 이러한 요도내압의 상승은 자극의 강도 (자극빈도, 5Hz, 10Hz, 20Hz)를 증가시킬수록 그 상승이 증가함
- : corn oil만을 투여한 intact군에 비하여 TP를 처치하여 유도한 BPH군의 신경자극에 의한 요도내압의 상승은 통계적으로 모든 자극 빈도에서 크게 증가되었으며, BPH군에 Finasteride, BPH군에 사군자 추출물을 투여한 군에서는 신경자극에 의한 요도내압의 상승이 BPH군에 비해 크게 감소하여 대조군과 유사한 수준의 요도내압 상승을 관찰 함
- : 따라서 사군자는 교감신경성 자극에 의한 전립선 평활근의 수축을 억제하는 효능이 있으며 이는 사군자 자체의 전립선 이완 효능 보다는 전립선의 크기를 감소시킴으로써 압박성 요도내압상승을 억제하는 효능으로 판단

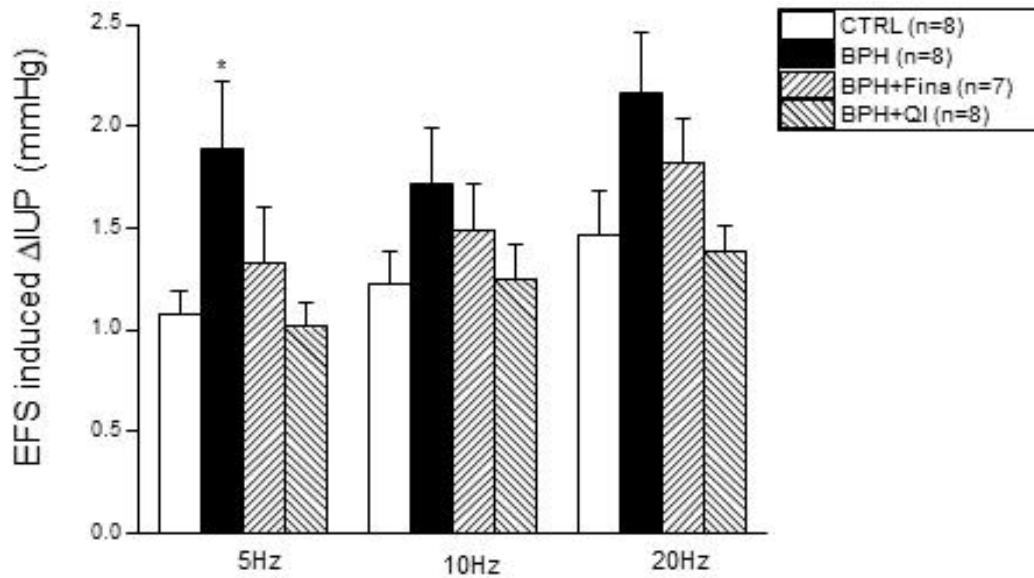


그림 55. hypogastric nerve 자극을 통한 요도내압 변화에 미치는 영향

- systemic 교감신경 항진에 의한 요도내압 변화에 미치는 영향 (그림 56)
- : 직접적인 교감신경계 약물을 투입하여 전립선을 자극 하는 방법으로 0.01mg/Kg, 0.03mg/Kg, 0.1mg/Kg의 Phenylephrine을 femoral artery를 통해 주입하여 일어나는 요도내압의 변화를 관찰함
- : BPH군에서 기록되어진 Phenylephrine에 의한 요도내압의 상승은 모든 농도의 Phenylephrine 투여군에서 증가하였으며, BPH+Finasteride 투여군의 경우 요도내압의 상승이 BPH군과에 비하여 차이가 없음. 하지만 0.03mg/Kg, 0.1mg/Kg 농도의 Phenylephrine 투여군의 경우에는 요도내압의 상승이 크게 감소하여 대조군과 비슷한 수준의 요도내압의 상승을 관찰함
- : 이러한 실험 결과로 미루어 전립선 조직 비대에 의한 하부 요로의 저항 증가로 인해 요도내압의 상승이 일어나며, 사군자 투여에 의해 요도내압 상승이 억제됨을 확인함

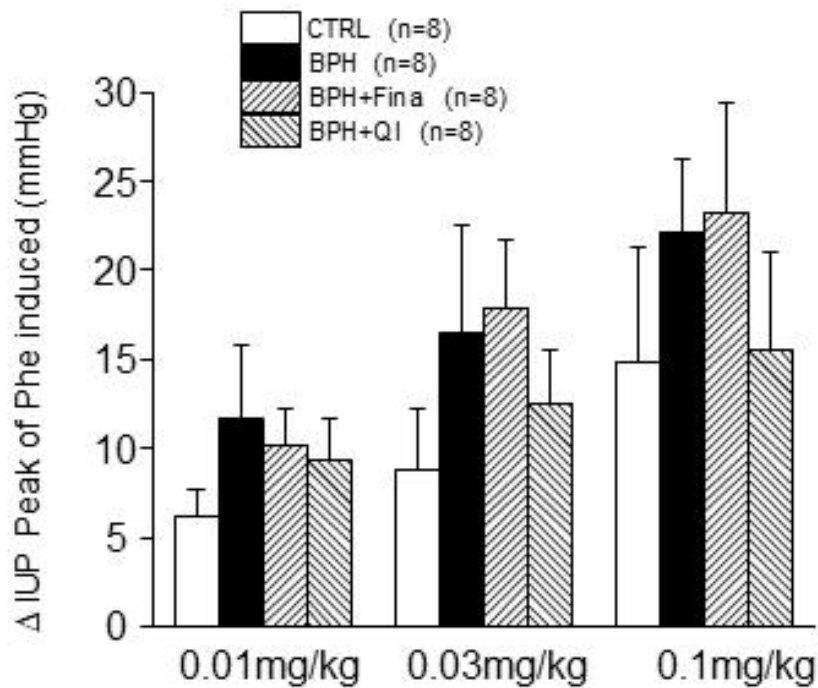


그림 56. systemic 교감신경 향진에 의한 요도내압 변화에 미치는 영향

(나) 알파차단효과로 인한 심혈관계 부작용 평가

① 사군자 추출물의 혈압에 대한 부작용 검증

- 실험방법

- Sprague-Dawley 수컷 흰쥐에 심혈관계 부작용 평가를 위한 *in vivo* 모델 구축
- *In vivo* 동물모델에서 사군자 추출물의 전신 심혈관계의 부작용 및 효능을 알아보기 위해 수축기 및 이완기 혈압을 측정

- 실험결과

- corn oil만을 투여한 대조군에 비하여 테스토스테론(10 mg/kg, s.c.)을 투여하여 유도한 BPH군, Finasteride 투여군에서의 수축기 혈압은 통계적으로 유의한 차이가 없으나, 사군자 투여군에서의 수축기 혈압은 유의하게 감소함 (그림 57)
- 이러한 사군자에 의한 수축기압 저하에 대한 보고는 현재까지 없으며, 향후 추가적인 연구가 필요함

② 혈장 CRP 농도변화에 미치는 영향

- 실험방법

- 광범위 염증 마커로 사용되고 있는 혈중 C reactive protein (CRP)농도는 사람에게서 하부요로증상과의 코호트연구를 통해 의미 있는 증가가 보고되어 있음
- 각기 다른 시험군에서 채취한 혈청에서 측정된 CRP의 농도를 비교

- 실험결과

- corn oil만을 투여한 대조군에 비하여 BPH, Finasteride, 사군자 투여군 모두에서 현저히 CRP농도가 증가하였으며, 이러한 혈중 CRP농도의 증가는 Finasteride와 사군자 투여군에서 BPH군에서 보다 의미있게 낮음 (그림 58)
- 이러한 혈중 CRP농도의 변화로 미루어 하부요로증, 신결석과 같은 비뇨기계 질환의 진단마커로서의 혈중 CRP농도의 활용이 의미 있을 것으로 예상됨

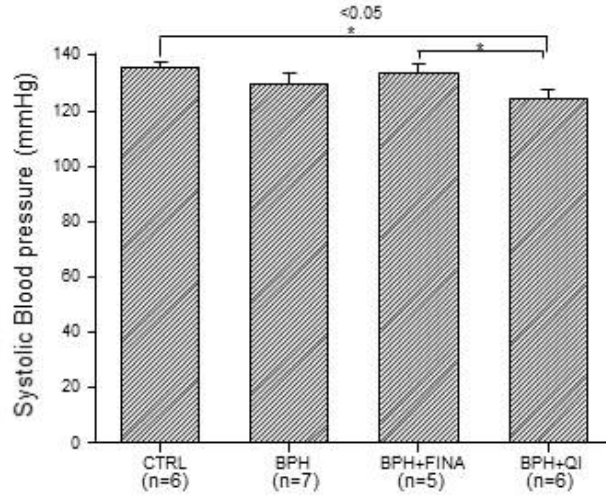


그림 57. 수축기 및 이완기 혈압

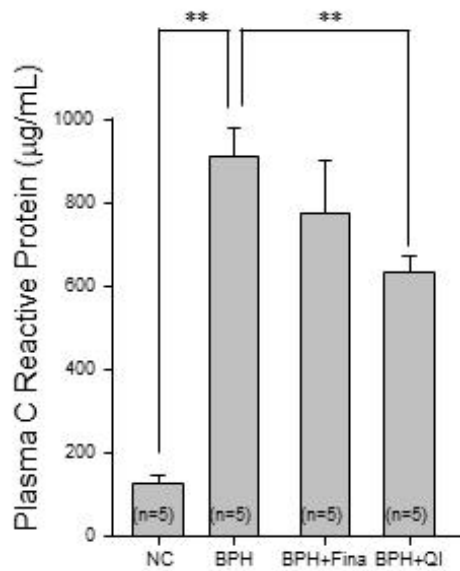


그림 58. 혈장 CRP 농도변화

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3.1. 목표

연도	구분	연구개발의 목표	연구 개발의 내용 및 범위	목표(정성/정량)	
2016	주관연구 기관 ((주)휴온스)	사군자 원료 규격 연구 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 사군자 원생약 규격연구 <ul style="list-style-type: none"> - 산지별, 채취시기별 원생약 규격화 : 각각의 샘플에 대한 패턴분석 진행 - 최종 산지 선정 • 사군자 원료의 규격연구 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 추출조건 설정 - Bioassay-guided fraction/isolation 을 통한 분획 및 성분 연구 - 지표/유효 성분 설정 및 분석법 연구 	특허 출원	
				특허 등록	
	협동연구 기관1 (충남대 학교)	사군자 추출물로부터 전립선비대증 개선효과를 가진 활성물질 탐색	<ul style="list-style-type: none"> • 사군자 추출물에 대한 <i>in vitro</i> 효능 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 전립선비대 상피세포주 및 간질세포주를 이용한 활성 검색 - 세포증식, 세포자멸사, 염증관련 인자 및 oxidative stress 관련인자 평가 • 사군자 추출물에 대한 <i>in vivo</i> 효능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 전립선 평활근에서의 알파차단 효과를 통한 전립선 이완효능 검증 - 요도내압 측정법을 통한 하부요로증상 완화 효과 검증 - 전립선 조직에서의 항염 및 세포증식에 대한 효능 확인 	학술 발표	1
				논문	
				인력 양성	
				기술 실시(이전)	
2017	주관연구 기관 ((주)휴온스)	사군자 추출물을 이용한 제품화 기반 구축	<ul style="list-style-type: none"> • 대량 생산공정 기반 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 공정연구 진행 (Pilot, Scale-up 생산 포함 3 LOT) - 기준 및 시험법 설정 및 데이터 확보 	특허 출원	1

	협동연구 기관1 (충남대 학교)	사군자 추출물에 대한 전립선비대 증 치료 기전 규 명	<ul style="list-style-type: none"> - 분석법 validation - 원료의 안정성시험 (6개월 가속 등) • 최종 기능성 원료에 대한 비임상 독성시험 - 사군자 추출물의 안전성 확보를 위한 비임상 독성시험 (염색체 이상, 복귀돌연변이, 소핵시험, 설치류/비설치류 단회 독성시험, 설치류/비설치류 13주 반복투여 독성시험) 	특허 등록	
			<ul style="list-style-type: none"> • 전립선 유래 세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 작용기전 연구 - 전립선비대로 유발된 내피세포 (BPH-1)의 증식 조절 여부 확인 및 관련 signal 분석 - 세포 사멸 조절 여부 확인 및 관련 signal 분석 - 5α-reductase 발현 평가 - Androgenic receptor 활성 평가 	학술 발표	1
			<ul style="list-style-type: none"> • 전립선비대증 동물모델을 이용한 <i>in vivo</i> 작용기전 연구 - 전립선비대로 유발된 내피세포의 증식 조절 여부 확인 및 관련 signal 분석 - 세포 사멸 조절 여부 확인 및 관련 signal 분석 - 전립선 내 염증 조절 여부 확인 및 관련 signal 분석 	논문	2
				인력 양성	2
				기술 실시(이전)	
2018	주관연구 기관 ((주)휴 온스)	사군자추출물에 대한 인체적용시 험 및 개별인정 신청	<ul style="list-style-type: none"> • 최종 기능성 원료에 대한 인체적용시험 수행 및 개별인정신청 - 사군자 추출물의 전립선 건강개선 효과에 대해서 인체적용시험을 수행함 - 개별인정신청을 위한 문서작성 	특허 출원	2
			<ul style="list-style-type: none"> • 제형연구 및 시제품 개발 	특허 등록	1
				학술 발표	2

협동연구 기관 1 (충남대 학교)	사군자 추출물에 대한 전립선 비대증 치료기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> 알파차단효과로 인한 심혈관계 부작용 평가 <ul style="list-style-type: none"> <i>in vivo</i> 동물모델에서의 혈압 및 심장에 대한 효능 검증 하부요로증상 완화 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> 요도내압 측정법을 이용한 알파차단효과로 인한 하부요로증상 완화 효과 검증 	논문	2
			인력양성	2
			기술실시(이전)	1

3.2. 목표 달성여부

(1) 정량목표 달성여부

구분	지식 재산권		학술성과			인력양성	기술 실시 (이전)
	특허출원	특허등록	학술발표	논문			
				SCI	비SCI		
1차 년도	목표		1				
	달성		1				
2차 년도	목표	1	1	2		2	
	달성	9	5	1		4	1
3차 년도	목표	2	1	2	2	2	1
	달성	2	3	4	0	5	1
계	목표	3	1	4	4	4	1
	달성	11	3	9	1	9	2

3.3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

1. 미달성 목표

가. 인체적용시험 종료

- 초기에 시험물질투여군 1군, 대조군 1군으로 총 2개 군으로 시험 프로토콜 설정하였으나 아래 사유로 인하여 일정이 지연됨
 - 인체적용시험의 투여 용량설정단계에서 효력시험(*in vivo/in vitro*) 및 독성시험 결과와 향후 산업화를 고려하여 2군에서 3군으로 시험군 설정 변경
 - 군 설정 변경에 따라 시험대상자 수가 100명에서 135명으로 증가

시험군	변경전		변경후		
	대조군	투여군	대조군	투여군 1	투여군 2
	50	50	45	45	45

- 대조 및 시험물질 투여농도 변경, 인체적용시험 명확한 데이터 수집을 위한 선정/제외 기준 및 유효성 평가변수 설정으로 인하여 대상자 모집기간이 다소 증가됨
- 시험물질 필요량의 증가로 인한 임상약 생산일정의 변경
- 현재 총 135명 모집완료 및 시험 진행 중 (최종환자 모집완료)
- 2019년 4월 마지막 모집 환자의 최종방문예정 후 종료 예정
- 인체적용시험 실시기관에서 마지막 대상자의 마지막 방문까지의 기간은 지연되었으나 가능한 빠르게 결과 도출 예정

나. 사군자추출물의 개별인정형 건강기능식품 원료신청

- 인체적용시험 완료 후 신청 예정 (2019년 3Q신청 예정)

4. 연구결과의 활용 계획 등

4.1. 본 연구과제를 통한 미래원천기술 확보

- 남성 갱년기 성기능 이상의 병태생리학적 기반을 이해하고 이를 통한 신규 복합 치료제 개발을 위한 원천기술 확보
- 새로운 전립선비대증 치료 선도물질 (lead compound)로서 선도물질 최적화 (lead optimization) 연구로 확대
- 사군자 추출물 또는 분획물의 target gene에 대한 target validation 연구로 확대 (gene-engineered mouse 제작 등)
- 다른 질환모델에서의 사군자 유효물질의 확대 적용 (분자 기전 등을 연구)

4.2. 연구과제 종료 후 활용 방안

- 전립선이상, 발기부전, 정자 운동성 저하 등 갱년기 증상을 완화할 수 있는 복합 예방/개선 가능
- 본 과제 수행을 통해 구축된 인적, 물적 연구 인프라를 기반으로 관련 분야 연구를 위한 산.학 연구 협의체 구성
- 분자적 연구를 통한 신규 therapeutic target을 개발하고, 질환동물 모델을 확립하여 추가적인 신약개발 과제로 확대
- 천연물 또는 식물자원 활용을 통한 고부가가치 천연물 소재 개발 및 산업화
- 본 과제 수행을 통해 사군자 추출물의 기술 가치를 산정하고 나아가 남성 갱년기 장애 개선의 사업화 가능성을 확인
- 현재 진행하고 있는 인체적용시험의 종료 후 (2019년 4월), 건강기능식품 개별인정 신청을 통하여 남성 갱년기 성기능 저하의 주요 원인을 극복할 기능성원료 (건강기능식품)로 개발 확대
- 인체적용시험 또는 개별인정 획득을 실패할 경우, 남성호르몬 변화와 밀접한 연관이 있는 심혈관계 질환을 타겟으로 한 건강기능식품 및 탈모 치료제로써의 적응증 변화를 통한 개발 가능성을 면밀히 검토

4.3. 향후 마케팅 및 사업화 계획

- Segmentation : 천연물의 특징인 다성분 및 다효능을 극대화시키는 제품 개발
 - 남성 비뇨생식기계 질환은 골다공증, 성욕감퇴, 발기 부전, 집중력 저하, 만성 피로, 체형 변화 및 체모의 감소 (탈모)의 증상을 동반
 - 전립선비대증 및 이에 수반되는 증상에 대한 효력 확인 후, 다성분 및 다효능을 가진 건강기능식품 개발
- Targeting : 노화와 관련된 남성 비뇨생식기 질환임을 감안하여 50대 이상 중년 남성을 주요 타겟
 - 노령화 사회에서 발생하는 대표적인 남성질환인 전립선비대증 및 성기능 장애
 - 50대 이상의 남성이 전체 전립선비대증 진료인원의 90.5%를 차지
 - 본 연구 기술개발 제품의 타겟 대상을 감안하여, 중장년 남성들의 삶의 질을 높이는 의미를 연상하는 제품명 설정을 통한 마케팅

- Positioning : 기존 건강기능식품과 비교하여 상대적으로 저렴한 가격으로 포지셔닝
 - 전립선비대증이나 성기능 저하와 관련된 건강기능식품에 대한 욕구가 있는 소비자 시장은 동질형 선호패턴을 보이고 있음
 - 쏘팔메토 관련 제품이 압도적인 현 시장의 특성을 반영하여, 본 연구 기술개발 제품은 상대적으로 저렴한 가격으로 포지셔닝

4.4. 기대효과

가. 기술적 측면

- 기존 전립선비대증 치료제의 문제점인 늦은 효과 발현과 부작용인 성욕감퇴를 개선하면서, 전립선비대증의 대표적인 치료기전인 adrenergic $\alpha 1$ 차단 및 5 α -환원효소 억제 효능을 가진 새로운 전립선비대증 및 성기능 저하 개선용 고부가가치 기능성 식품 소재 개발
- 안드로젠 관련 남성 질환들 즉, 남성 갱년기 장애, 비뇨기계질환 (전립선비대증, 전립선암, 전립선염)을 포함한 질환의 치료 및 진단, 예방 방법 개발에 응용 가능
- 전립선비대증 및 남성 갱년기 장애와 관련된 기초학문과 임상의학의 기초자료로 활용 가능
- 전립선비대증 병인의 기전과 관련 유전자의 규명과 전립선비대증의 새로운 예방/치료법 개발
- 전립선비대증에 효능이 있는 약물의 분자생물학적 작용기전 및 표적유전자, 단백질 특이적 경로 규명
- 치료 전략에서 multi-targeted modality의 중요성에 대한 토대 제시
- 갱년기 성기능 저하의 중요한 common signaling pathway에 대한 새로운 이론 제시
- 생리학 기술을 생화학/분자생물학 기술을 융합한 새로운 research 방법 및 연구 모델 제시

- 1 사군자 전립선 비대증 완화와 하부요로 증상 대한 병태생리기전 규명
- 2 남성 성기능 저하에 관한 특이적 치료기술 개발을 통한 원천기술 확보
- 3 남성 갱년기 성기능 저하를 치료/예방할 수 있는 복합치료제 개발
- 4 기존 약물의 부작용을 최소화 하고 부작용을 극복할 기술 개발

나. 경제적 · 산업적 측면

- 전립선비대증 환자의 치료 만족도 증가
- 국내 50대 이상 남성의 절반이 전립선비대증을 앓고 있으며 이들 대부분이 성기능 저하라는 문제점을 가지고 있음. 노년인구의 증가로 이러한 문제는 점차 확대될 전망

- 따라서 노년을 보다 여유롭고 행복하게 보내고 싶어하는 환자들에게 보다 안전하면서 치료효과가 좋은 새로운 천연물 제재를 제공하여 환자의 만족도 향상
- 장기적인 투여로 인한 약가에 대한 경제적 부담 저하
- 획기적인 치료제개발로 치료기간 및 경제적 손실을 줄이고, 국민건강 증진, 의료보건 환경 및 정신건강 향상에 기여하고 새로운 제약 산업 형성
- 본 연구를 통해 천연물 등 신소재 발굴 및 고부가가치의 제약산업 선도하며 국민건강증진에 기여
- 미국, 유럽 등지에 신소재 발굴로 인한 기술이전과 경제적 이익 창출
- 융합기술을 이용한 학문성취도 향상 및 전문적인 연구인력 양성
- 원재료 생산을 위한 자생식물 재배를 통한 농가 소득의 다변화 및 증대
- 새로운 기능성 식품생산을 통한 의약품 수입 대체효과 및 수출 증대효과를 기대
- 제품 생산을 통한 인력고용을 통한 일자리 창출

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 사군자 추출물을 이용한 남성비뇨생식기 건강 개선용 기능성 식품소재 개발					
	(영문) Development natural health food for the urogenital disease of men using <i>Quisqualis indica</i> extract					
주 관 연구 기관	(주)휴온스		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 중앙연구소		
참 여 기 관	충남대학교			(성명) 임중환		
총 연구개발비 (1,166,667 천원)	계	1,166,667	총 연 구 기 간	2016.09 ~ 2018.12		
	정부출연 연구개발비	700,000		총 인 원	21명	
	기업부담금	466,667		총 참 여 연 구 원 수	내부인원	21명
	연구기관부담금			외부인원	0명	
<p>1. 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 사군자추출물을 이용하여 남성 비뇨생식기 질환(전립선 비대증, 생식능력저하, 발기부전)에 개선효과가 있는 고부가가치 건강기능 식품소재를 개발함으로써 국내 재배농가 및 기업의 소득증대와 더불어 국민보건에 기여하여 사회전반에 걸친 시너지효과를 창출하는 것을 목적으로 함 <p>2. 연구내용 및 결과</p> <p>가. 주관연구기관 ((주)휴온스)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 사군자 원료 규격 연구 및 표준화 <ul style="list-style-type: none"> • 국내외 산지별, 채취 시기별 원생약 규격화 완료 • 원료의 규격화 완료 • 지표/유효 성분 설정 및 분석 완료 - 사군자 추출물을 이용한 제품화 기반 구축 <ul style="list-style-type: none"> • 공정연구 진행 (Pilot, Scale-up 생산 포함 3 LOT) • 기준 및 시험법 설정 및 분석법 validation • 원료의 안정성시험 (6개월 가속 등) • 최종 기능성 원료에 대한 비임상독성시험 - 전립선 건강 기능성 원료에 대한 인체적용시험 및 개별인정 신청 <ul style="list-style-type: none"> • 최종 기능성 원료에 대한 인체적용시험 진행 • 제형연구 및 기능성 원료 시제품 개발 						

나. 협동연구기관1 (충남대학교)

- 사군자 추출물로부터 전립선비대증 개선효과를 가진 활성물질 탐색
 - 사군자 추출물에 대한 *in vitro* 효능시험 완료
 - 사군자 추출물에 대한 *in vitro* 효능시험 완료
- 사군자 추출물에 대한 전립선비대증 치료 기전 규명
 - 전립선 유래 세포주를 이용한 *in vitro* 작용기전 연구
 - 전립선비대증 동물모델을 이용한 *in vivo* 작용기전 연구
- 사군자 추출물에 대한 전립선비대증 치료기전 규명
 - 알파차단효과로 인한 심혈관계 효능평가
 - 전립선비대증에 의한 하부요로증상 효능평가

3. 연구성과 활용실적 및 계획

- 후속 연구를 통한 남성 갱년기 성기능 저하의 주요 원인을 극복할 기능성 소재 개발
- 전립선이상, 발기부전, 정자 운동성 저하 등 갱년기 증상을 완화할 수 있는 복합 예방/개선 가능
- 본 과제 수행을 통해 구축된 인적, 물적 연구 인프라를 기반으로 관련 분야 연구를 위한 산.학 연구 협의체 구성
- 분자적 연구를 통한 신규 therapeutic target을 개발하고, 질환동물 모델을 확립하여 추가적인 신약개발 과제로 확대
- 사군자 추출물 또는 분획물의 target gene에 대한 target validation 연구로 확대 (gene-engineered mouse 제작 등)
- 다른 질환모델에서의 사군자 유효물질의 확대 적용 (분자 기전 등을 연구)

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	116078-3		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	농생명 신소재·시스템		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	사군자 추출물을 이용한 남성 비노생식기 건강 개선용 기능성 식품소재 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	(주)휴온스		연구책임자	임종환	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	16.09.05.~16.12.31	100,000	66,667	166,667
	2차연도	17.01.01~17.12.31	300,000	200,000	500,000
	3차연도	18.01.01~18.12.31	300,000	200,000	500,000
	4차연도				
	5차연도				
	계	16.09.05~18.12.31	700,000	466,667	
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018.12.31

3. 평가자(연구책임자) : 임종환

소속	직위	성명
(주)휴온스	수석연구원	임종환

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 임종환

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

확약	
----	---

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

다성분 다효능이 특징인 천연물을 이용하여 기존 의약품의 심혈관계 및 생식기계 부작용 이슈를 극복하고 전립선 비대 및 하부요로 장애 등의 전립선 비대증에 의한 증상을 개선할 수 있는 건강기능식품 소재 개발로 현재 남성비뇨생식기계 질환의 미충족 수요를 충족시킬 것으로 사료됨. 천연물 소재의 새로운 기능성과 안정성을 입증하고 이를 활용한 기능성 식품으로 개발함으로써 부가가치를 높여 산업화 농가 소득 증대에 이바지 할 것으로 기대됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

한국 노령인구 비율 증가 (2005년 전체인구의 9.3%에서 2015년 전체인구의 15.7%)에 따라 고령화 관련 질환들이 이슈화 되고 있으며, 남성의 노화에 의한 생식능력 저하, 성기능 장애 등 남성 비뇨기질환 환자 수가 증가하고 있음. 최근 5년간 국내 전립선 비대증 환자는 32 % 증가 (2010년 771,862명에서 2014년 약 100만명)
사군자추출물 기능성 식품소재가 점유가능한 시장의 규모가 점점 확대되면서 해당 연구결과의 활용범위가 다양해 질 것으로 사료됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제 수행을 통해 구축된 인적, 물적 연구 인프라를 기반으로 관련 분야 연구를 위한 산.학 연구 협의체 구성하고 분자적 연구를 통한 신규 therapeutic target을 개발하고, 질환동물 모델을 확립하여 추가적인 신약개발 과제로 확장가능
사군자 추출물 또는 분획물의 target gene에 대한 target validation 연구로 확대 가능하며 다른 질환모델에서의 사군자 유효물질의 확대 적용 (분자 기전 등을 연구)

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

성과목표일정 대비 빠른 시기에 해당 연구기술의 기술이전을 시행하면서 사군자추출물 건강 기능개선 식품소재의 사업화 및 상품화를 조기에 달성하기 위해 노력하였고, 추가로 전립선비대증 치료 또는 예방 물질 발굴을 위한 스크리닝 방법 기술이전을 통해 추가적인 남성 비뇨기 관련 질환 치료물질 개발을 위한 인프라 구축 완료
현재 개별인정신청 진행 예정인 사군자추출물 이외 초임계추출물 등 다양한 추출방식에 대한 특허 출원 등을 통해 해당 과제의 활용범위를 넓히기 위해 노력함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

일본, 중국 등에서 개최한 여러 국제학회에 참석하여 사군자추출물의 전립선 비대증 개선효과 관련 포스터발표를 통해 해당 연구 관련한 개발성과발표
SCI급 저널에 해당 연구과제 개발성과에 관련된 논문을 발표하면서 해당 연구의 기전, 약리 효과 등에 관련된 기술의 타당성 확보
특허 발표 및 기술이전을 통해 해당기술의 판권 및 기술권 확보

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
①사군자 원료규격 연구 및 표준화	20	100	- 사군자 원생약의 산지별, 채취시기별 원생약 규격화 및 최종 산지 선정 완료 - 사군자추출물 분획 및 성분연구 완료 - 지표/유효성분 설정 및 분석법 연구 완료
②사군자추출물로부터 전립선비대증 개선효과를 가진 활성물질 탐색	15	100	- 사군자추출물에 대한 in vitro 효력검증시험 완료 - 사군자추출물에 대한 in vivo 효력검증시험 완료
③사군자추출물을 이용한 제품화 기반 구축	20	100	- 사군자추출물 대량생산공정 기반 확립 - 최종 기능성 원료에 대한 비임상 독성시험 완료
④사군자추출물에 대한 전립선비대증 치료기전 규명(1)	15	100	- 전립선 유래 세포주를 이용한 in vitro 작용기전 연구 완료 - 전립선비대증 동물모델을 이용한 in vivo 작용기전 연구 완료
⑤사군자추출물에 대한 인체적용시험 및 개별인정 신청	15	80	- 최종 기능성 원료를 이용한 인체 적용시험 진행 중 (마지막 환자 최종방문이 2019년 04월 종료 예정)
⑥사군자추출물에 대한 전립선비대증 치료기전 규명(2)	15	100	- 알파1 수용체 차단효과로 인한 심혈관계 부작용 평가완료 - 하부요로증상 완화 효능평가
합계	100	97	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

‘사군자추출물을 이용한 남성 비뇨생식기 건강 개선용 기능성 식품소재 개발’ 연구개발성과를 통해 남성 비뇨생식기 관련 병태생리학적 기전을 규명, 기존 약물의 부작용을 최소화 하면서 남성 갱년기/성기능 저하를 복합적으로 치료, 예방할 수 있는 건강기능식품소재를 개발하면서 학술적, 제약 산업적으로 새로운 성과를 얻어냄.

해당 소재의 원료규격 표준화, 제품화 기반 구축 (대량생산공정 개발, 최종 기능성 원료에 대한 비임상 독성시험 완료), 인체적용시험 및 개별인정 신청을 통해 사군자추출물을 이용한 남성 비뇨기계 건강개선 및 기능성 식품을 개발하면서 관련 질환 치료방법에 새로운 대안을 제시하고, 새로운 천연물 신소재 발굴을 통해 고부가가치의 제약산업 기술 향상에 기여하여 전반적인 국민건강증진 및 국내 의료보건환경의 개선을 위해 노력함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

인체적용시험 투여 용량설정 단계에서 시험군을 재설정함으로써 인체 적용시험 일정이 지연되었으며, 이로 인해 과제 최종목표를 달성하지 못하였음. 그러나 자사비용을 추가 투입하여 시험군과 모집환자수를 증가시킴으로서 개별인정 승인 및 사업화 가능성을 높일 수 있을 것으로 사료됨.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

과제 종료 후에도 자사비용을 투입하여 인체적용시험을 일정에 맞춰 진행하고, 개별인정신청을 통해 사업화를 진행할 예정임.

후속연구개발을 통해 남성 갱년기 성기능 저하의 주요 원인을 극복할 수 있는 기능성 소재를 추가로 개발하면서 분자생물학적 수준의 연구를 통해 신규 therapeutic target을 개발하고, 전립선비대증 및 남성 비뇨생식기계 질환관련 동물모델을 확립하여 추가적인 신약개발 과제로 확대 예정.

사군자추출물 또는 분획물의 타겟 유전자에 대한 target validation 연구로 확대.

다른 질환모델에서의 사군자 유효성분의 확대적용을 위한 분자기전 추가 연구.

본 과제 수행을 통해 구축된 인적, 물적 연구 인프라를 기반으로 관련 분야 연구를 위한 산/학 연구 협의단체를 구성.

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	사군자 추출물을 이용한 남성 비뇨생식기 건강 개선용 기능성 식품소재 개발			
주관연구기관	(주)휴온스		주관연구책임자	임종환
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	700,000천원	466,667천원		1,166,667천원
연구개발기간	2016.09.05.~2018.12.31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①사군자 원료규격 연구 및 표준화	- 사군자 원생약의 산지별, 채취시기별 원생약 규격화 및 최종 산지 선정 완료 - 사군자추출물 분획 및 성분연구 완료 - 지표/유효성분 설정 및 분석법 연구 완료
②사군자추출물로부터 전립선비대증 개선효과를 가진 활성물질 탐색	- 사군자추출물에 대한 in vitro 효력검증시험 완료 - 사군자추출물에 대한 in vivo 효력검증시험 완료
③사군자추출물을 이용한 제품화 기반 구축	- 사군자추출물 대량생산공정 기반 확립 - 최종 기능성 원료에 대한 비임상 독성시험 완료
④사군자추출물에 대한 전립선비대증 치료기전 규명(1)	- 전립선 유래 세포주를 이용한 in vitro 작용기전 연구 완료 - 전립선비대증 동물모델을 이용한 in vivo 작용기전 연구 완료
⑤사군자추출물에 대한 인체적용시험 및 개별인정신청	- 최종 기능성 원료를 이용한 인체적용시험 진행 중 (인체적용시험 2019년 04월 종료 및 개별인정신청 2019년 3Q 예정)
⑥사군자추출물에 대한 전립선비대증 치료기전 규명(2)	- 알파1 수용체 차단효과로 인한 심혈관계 부작용 평가완료 - 하부요로증상 완화 효능평가

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육지 도	인력양 성	정책 활용·홍보		기타 (타 연 구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	3	1		2							4			4	4					
연구기간내 달성실적	11	3		2							1			9	9		71			
달성율(%)	466	200		100							25			225	225					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	사군자 추출물을 유효성분으로 하는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 조성물
②	전립선 비대증 치료 및 예방용 후보물질 발굴 방법

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	신업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	v	v				v	v			
②의 기술							v			

* 각 해당란에 v 표시

