

보안과제(), 일반과제(V) / 공개(V), 비공개()

수출전략기술개발사업
제3차년도 최종보고서

11-1543000
-002
646-
01

고려
인삼이
약물
상호
작용에
미치는
영향
연구

최
종
보
고
서

2019

농림축산식품부

수출전략기술개발사업 R&D Report

고려인삼이
약물상호작용에
미치는 영향 연구

최종보고서

2019. 03. 29.

주관연구기관
/ 경북대학교 산학협력단

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고려인삼이 약물상호작용에 미치는 영향 연구”(개발기간 : 2016.05.19. ~ 2018.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 03. 29.

주관연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자) 임 기 병 (인)

주관연구책임자 : 송 임 속

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316017-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.05.19. -2018.12.31	단 계 구 분	1단계/1단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	고려인삼이 약물상호작용에 미치는 영향연구			
연구책임자	송 임숙	해당단계 참여연구원 수	총: 39 명 내부: 8 명 외부: 31 명	해당단계 연구개발 비	정부: 1,330,000천원 민간: 0 천원 계: 1,330,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 39 명 내부: 8 명 외부: 31 명	총 연구개 발비	정부: 1,330,000천원 민간: 0 천원 계: 1,330,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경북대학교 산학협력단			참여기업명	
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	24	4									

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약 보고서 면수 250

- 본 과제 목적은 고려인삼과 의약품 상호작용 규명으로 고려인삼의 과학적 안전성을 확보하여 고려인삼의 효능 신뢰도 제고 및 수출 증대에 기여하고자 함
- 고려인삼의 미국(US FDA), 유럽(EMEA), 및 한국(KFDA)의 가이드라인에 따른 약물 상호작용 연구 수행
 - 고려인삼제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼추출물) 및 활성성분 14종 (ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, F2, compound K, Rg1, Rg3, Rf, Re, Rh1, F1, panaxadiol, panaxatriol)의 1상 대사효소 (7종; CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A), 2상 대사효소 (6종; UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7) 및 약물 수송체 (8종; OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp, BCRP) 억제능 평가
 - 백삼, 홍삼추출물 및 ginsenoside Rb1의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능 평가
- 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 in vitro /in vivo 동물용 각테일 개발
 - In vitro에서의 고려인삼 제제 및 진세노사이드의 약물상호작용 고속 평가를 위한 각테일 기반의 1상 약물대사효소 활성 고속 평가기술 개발
 - 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가용 in vivo rat dual 각테일 개발
- 고려인삼제제의 약물대사 및 수송체 상호작용에 대한 in vivo PK 평가 및 홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가
 - 홍삼 추출물의 단회 동시투여에 의한 약물상호작용 평가시 유의적인 상호작용은 나타나지 않음
 - 홍삼 추출물의 4주 반복투여시 CYP3A의 대사율은 증가하고 CYP2D의 대사율은 저해됨
 - 다빈도 처방의약품 중 당뇨병치료제(메포민), warfarin, 고혈압치료제(amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제, valsartan, furosemide), 메토트렉세이트, monoamine oxidase inhibitor (selegiline), NSAID계 진통제 (sulfasalazine, 디클로페낙), omeprazole, dextromethorphan, digoxin, 실리마린의 약동학적 상호작용을 평가한 결과 신중한 투여가 요구되는 약물이 있지만 임상적으로 유의적인 상호작용은 없음
 - 당뇨병질환군, 간질환군, MCD-diet로 유도한 지방간 모델에서 홍삼의 약효 또는 홍삼과 치료약물 (메포민, 실리마린) 또는 대사활성 탐침약물과의 상호작용을 평가함
 - 사람 혈장 중 ginsenoside의 농도 분석 및 약동학 특성 평가, 약동학 특성 기전확인을 위한 위장관 투과도 평가
- 임상 1상시험을 통해 사람에서 약물상호작용이 없는 안전용량 규명
 - 홍삼추출물 제제 (dried ginseng > 60%; 85.1 mg/day as sum of Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg3, and Rh1)의 2주 반복투여는 혈압, ALT, AST, 체온 등의 임상적으로 유의한 변화 없이 복용하였음
 - 홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A) 및 수송체 (OATP1B1)의 활성에 임상적으로 유의한 상호작용을 나타내지 않음
 - 다빈도 병용투여 의약품인 metformin의 상호작용 및 안전성 평가결과 홍삼추출물 제제의 2주 반복 투여는 metformin의 약동학 및 약효에 유의한 상호작용을 나타내지 않음

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 과제의 목적은 고려인삼과 의약품 상호작용 규명으로 고려인삼의 과학적 안전성을 확보하여 고려인삼의 효능 신뢰도 제고 및 수출 증대에 기여하고자 함 ○ 고려인삼의 미국(US FDA), 유럽(EMEA), 및 한국(KFDA)의 가이드라인에 따른 약물 상호작용 연구 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 고려인삼제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼추출물) 및 활성성분 14종 (ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, F2, compound K, Rg1, Rg3, Rf, Re, Rh1, Fl, panaxadiol, panaxatriol)의 1상 대사효소 (7종; CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A), 2상 대사효소 (6종; UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7) 및 약물수송체 (8종; OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp, BCRP) 억제능 평가 - 고려인삼 추출물 (백삼, 홍삼추출물) 및 ginsenoside Rb1의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능 평가 ○ 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 in vitro /in vivo 동물용 칩테일 개발 <ul style="list-style-type: none"> - In vitro에서의 고려인삼 제제 및 진세노사이드의 약물상호작용 고속 평가를 위한 칩테일 기반의 1상 약물대사효소 활성 고속 평가기술 개발 - 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가용 in vivo rat dual 칩테일 개발 - 대사효소 상호작용 평가를 위한 in vivo mouse 칩테일 개발 ○ 고려인삼제제의 약물대사 및 수송체 상호작용에 대한 in vivo PK 평가 및 홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 홍삼 추출물의 단회 동시투여에 의한 약물상호작용 평가시 유의적인 상호작용은 나타나지 않음 - 홍삼 추출물의 4주 반복투여에 따른 약물상호작용 평가시 CYP3A의 대사율이 증가되는 반면에 CYP2D의 대사율은 저해됨이 관찰됨. - 다빈도 처방의약품 중 당뇨병치료제 (메포민), warfarin, 고혈압치료제 (amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제, valsartan, furosemide), 메토트렉세이트, monoamine oxidase (MOA, selegiline), NSAID계 진통제 (sulfasalazine, 디클로페낙), omeprazole, dextromethorphan, digoxin, 실리마린의 약동학적 상호작용을 평가한 결과 신중한 투여가 요구되는 약물이 있지만 임상적으로 유의적인 상호작용은 없음 - 당뇨병질환군, 간질환군, MCD-diet로 유도한 지방간 모델에서 홍삼의 약효 또는 홍삼과 치료약물 (메포민, 실리마린) 또는 대사활성 탐침약물과의 상호작용을 평가함 - 사람 혈장 중 ginsenoside의 농도 분석 및 약동학 특성 평가, 약동학 특성 기전확인을 위한 위장관 투과도 평가 ○ 임상 1상시험을 통해 사람에서 약물상호작용이 없는 안전용량 규명
------------------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> - 홍삼추출물 제제 (dried ginseng > 60%; 85.1 mg/day as sum of Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg3, and Rh1)의 2주 반복투여는 혈압, ALT, AST, 체온 등의 변화 없이 복용하였음 - 홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A) 및 수송체 (OATP1B1)의 활성에 임상적으로 유의한 상호작용을 나타내지 않음 - 다빈도 병용투여 의약품인 metformin의 상호작용 및 안전성 평가결과 홍삼추출물 제제의 2주 반복투여는 metformin의 약동학 및 약효에 유의한 상호작용을 나타내지 않음 ○ 고려인삼과 약물복용에 대한 가이드라인 설정 및 안전관리 체계 마련 <ul style="list-style-type: none"> - 소비자 안전을 위해 고려인삼에서 유래한 건강기능식품의 약물상호작용 위험도 표시 - 지표물질 함량 또는 복용량에 따른 상호작용 가능성의 등급화 - 다량의 건강기능식품의 약물상호작용 평가를 위한 고효율평가 시스템 제안 ○ 고려인삼의 수출증대를 위한 약물상호작용 및 안전성에 대한 홍보 <ul style="list-style-type: none"> - 고려인삼-약물상호작용 가이드북 제작 (2회) - 학술대회 홍보부스 운영을 통한 연구성과 홍보 (2건) - 풍기인삼농협 해외영업소 및 해외전시실에 논문 및 가이드북 전시 (9개국 11개소) 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - in vitro/ in vivo 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 각테일기반의 평가기술 개발 결과를 3건의 특허와 1건의 PCT 출원함 - 고려인삼의 안정성 및 우수성을 강조하기위한 상호작용 연구결과의 국제학술지 및 학회 발표 (국제 SCI급 논문 15편, KSCI급 논문 9편, 학회발표 23건) - 소비자 안전을 위해 고려인삼의 약물복용에 대한 홍보자료로 고려인삼-약물상호작용 가이드북 제작 (2회) 및 정책 제안 (3개 프로토콜 1건), 학술대회 홍보부스 운영을 통한 연구성과 홍보 (2건) 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 고려인삼-의약품 상호작용 결과 중 주요 사항은 인삼가공품의 표시기재부에 기재하여 의약품과의 복용시 상호작용에 대한 정보를 쉽게 얻을 수 있도록 함 - 국내 홍보자료 제작 및 배포를 통한 내수 증대 - 고려인삼과 약물복용에 대한 가이드라인 및 정책 제안 - 소비자 안전을 위해 고려인삼 유래한 건강기능식품의 약물상호작용 위험도 표시 				
국문핵심어 (5개 이내)	고려인삼	약물상호작용	양방향 약물상호작용	복용가이드 라인	1상 임상시험
영문핵심어 (5개 이내)	Korean Ginseng	drug interaction	full-duplex drug monitoring	drug intake guideline	phase 1 clinical trial

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	36
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	220
4. 연구결과의 활용 계획 등	232

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 최종목표

- 고려인삼과 의약품 상호작용 규명으로 고려인삼의 과학적 안전성을 확보하여 고려인삼의 효능 신뢰도 제고 및 수출 증대에 기여
 - 고려인삼에 체계적인 약물상호작용 연구로 과학적 근거를 확보를 통한 의약품 수준의 안전성 확보
 - 소비자 안전을 위해 고려인삼의 약물복용에 대한 가이드라인 제시 및 정책 제안, 공동연구 참여국의 언론보도 활동
 - in vivo에서 사이토크롬 P450 효소 활성도의 고속 평가를 위한 최소용량 각테일기술 개발 및 특허 출원

나. 당해연도 연구개발 목표 및 결과

(1) 제1차년도 (2016년)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼제제 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 동결건조물 제조 • ginsenoside 12종 분리 정제 	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼제제 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 동결건조물 제조 • 고려인삼 지표성분 Rg+Rb1+Rb2 함량 분석 • ginsenoside 12종 분리 정제 	<ul style="list-style-type: none"> • 풍기인삼농협협동조합으로부터 고려인삼 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 원료를 제공받아 동결건조물을 가공하였으며, 연구팀에서 동일한 시료를 제공받아 연구수행 • 고려인삼 지표성분 Rg1+Rg3+Rb1 11.92 mg/g 포함됨 • ginsenoside 12종 분리 정제 (Rb1, Rb2, Rg1, Rg3, Rc, Rh1, Rd, Rf, Re, F1, F2, K) 하여 대사효소 및 수송체 저해실험에 제공함
<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼 및 활성성분의 1상대사효소 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼제제의 1상대사효소 억제능 평가 • 인삼의 활성물질 5종의 1상 대사효소 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)은 7종의 CYP 활성의 유의적 억제능은 관찰되지 않았음 • ginsenoside 5종(Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K)은 7종의 CYP에 대해 약한 억제현상을 나타내었음
<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼 및 활성성분의 2상대사효소 	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼제제의 2상대사효소 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)은 6종의 UGT 활성의 유의적 억제능은 관찰되지 않았음

억제능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 인삼의 활성물질 5종의 2상대사효소 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ginsenoside 5종(Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K)은 6종의 UGT 활성 약한 억제현상을 나타내었음
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 약물수송체 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 약물수송체 억제능 평가 인삼의 활성물질 5종의 약물수송체 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 6종 약물수송체에 대한 유의적 억제능은 관찰되지 않았음 ginsenoside 5종(Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K)은 6종의 약물수송체 활성에 대해 약한 억제현상을 나타내었음
<ul style="list-style-type: none"> 홍삼 추출물 1상/2상대사효소/수송체 유도능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼 추출물 1상/2상대사효소/수송체 유도능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> CYP3A4 mRNA 발현이 58~38%까지 감소하였으므로 고용량에서 CYP3A4 억제에 의한 약물상호작용 유발 가능성이 있을 것으로 예측됨 이외의 1상 대사효소, 2상 대사효소, 수송체에는 유도능이 나타나지 않음

(2) 제2차년도 (2017년)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> 백삼추출물 분리정제 	<ul style="list-style-type: none"> 백삼으로부터 고사포닌함량 분획 제조 추출물 중 총 사포닌 함량 및 ginsenoside 함량 분석법 확립 백삼추출물의 뇌세포 보호활성 측정 	<ul style="list-style-type: none"> 풍기인삼농협협동조합으로부터 건조된 세절 백삼원료를 제공받아 에탄올 침전을 이용하여 고사포닌함량 분획을 얻었으며, 이를 동결건조함 백삼추출물 중 총 사포닌 함량은 53 mg/g 포함됨 백삼추출물 중 ginsenoside 15종의 함량 분석하였으며, 총 ginsenosides의 함량은 6.4 mg/g임 백삼 추출물은 glutamate로 유도한 뇌세포 독성을 현저히 감소시킴
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 대사효소 억제능 평가 (human, in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> 인삼의 활성물질 추가 9종 (Ginsenoside Rb2, Rc, Re, Rf, Rh1, F1, F2, panaxadiol, panaxatriol)의 1상 대사효소 (CYPs) 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> Rb1이 CYP2C9에 유의적인 억제능을 보임 F2가 CYP2B6에 대해 강한 억제능을 나타냄 compound K는 CYP2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4에 미약한 억제능을 나타냄 Rb1을 포함한 6종 진세노사이드는 UGT1A9에 대하여 저해능을 나타냄 Rg3는 UGT1A3, UGT1A9 및 UGT2B7에

	<ul style="list-style-type: none"> 인삼의 활성물질 추가 추가 9종의 2상 대사효소 (UGTs) 억제능 평가 10종 P450 동효소 활성 고속 평가기술 개발 	<p>대해서 저해능을 나타냄</p> <ul style="list-style-type: none"> Compound K의 경우는 UGT1A3에 대해서만 약한 저해능을 나타냄 Rg1은 UGT1A4에 대하여 저해능을 나타냄 10종 P450 기질 각테일 조합 및 LC-MS/MS 분석법 개발
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 약물수송체 억제능 평가 (human, in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> 인삼의 활성물질 추가 10종의 수송체 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> Rb1, Rd, Rg3, compound K는 OATP1B1, OATP1B3에 약한 저해성을 보임 Rb2, Rd, Rd는 OATP1B3에 강한 저해성은 panaxatrioid는 OAT3, OATP1B1, OATP1B3에 약한 저해성은 보임
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 1상/2상대사효소/수송체 유도능 평가 human, in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> 백삼 추출물 1상/2상대사효소/수송체 유도능 평가 Ginsenoside Rb1의 1상/2상대사효소 유도능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 백삼 추출물은 1상/2상대사효소/수송체의 발현을 변화시키지 않음 Rb1은 1상/2상대사효소/수송체의 발현을 변화시키지 않았으므로 약물상호작용 가능성이 낮은 것으로 예측됨
<ul style="list-style-type: none"> 홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 및 수송체에 미치는 영향을 평가하여 약동학적 상호작용을 확인하기 위한 1상 임상시험 수행 (human, in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼과 in vivo cocktail 약물과의 약동학적 상호작용 및 안전성 평가 임상시험 후 혈장시료에서 투여 약물 및 ginsenoside 분석 임상시험 결과보고서 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립 - In vivo cocktail (midazolam 2mg (CYP3A), dextromethorphan 30mg (CYP2D6), caffeine 100mg (CYP1A2), losartan 50mg (CYP2C9), omeprazole 20mg (CYP2C19), pitavastatin 2mg (OATP1B1)) 적용한 open-label, three-period, single-sequence design의 임상시험 진행 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 대상자 모집 및 스크리닝 검사 시행 임상시험 진행 및 임상시료(혈장, 뇨) 확보 단백질 침전법을 이용한 11종 약물 및 ginsenosides 분석법 개발 및 검증 LC-MS/MS 분석조건 최적화 및 인체 혈장 시료중 ginsenoside 농도 분석 완료
<ul style="list-style-type: none"> 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 약물대사 활성 및 수송활성 저해성에 대한 in 	<ul style="list-style-type: none"> In vivo Cocktail substrate 활용한 약물상호작용 평가 시스템 개발 수삼, 홍삼, 백삼 	<ul style="list-style-type: none"> 약물상호작용 평가를 위한 5종 CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A)에 대한 cocktail 개발 수삼, 홍삼, 백삼 추출물 중 ginsenoside 함량 분석

<p>vivo PK평가 (mouse/rat, in vivo)</p>	<p>추출물의 약동학 특성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> • 홍삼의 단회 및 반복투여 후 ginsenoside 약동학 평가 • 홍삼 추출물을 단회/2주/4주 반복투여 후 5가지 cocktail 기질 투여를 통한 약물상호작용 평가 • 홍삼 추출물을 in vivo에서의 1상대사효소/2상대사효소/수송체 유도능 평가 • Methotrexate와 홍삼의 약동학적 상호작용 평가 • nifedipine과 홍삼의 약동학적 상호작용 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 수삼, 홍삼, 백삼 추출물 1g/kg용량으로 경구투여 후 ginsenoside는 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 4종 ginsenoside만 검출됨 • 추출물 중 ginsenoside의 함량이 높은 백삼 추출물과 홍삼추출물에서는 모두 유의적으로 높은 농도의 Rb1, Rb2, Rc Rd가 검출됨 • 홍삼 1.5g/kg/day로 단회, 1주, 2주간 반복투여 후 ginsenoside의 혈 중 농도는 단회투여에 비하여 반복투여시 증가함을 확인할 수 있었고, 1주 반복투여와 2주 반복투여의 경우에는 유의적인 차이가 없었으므로, 1주 반복투여 후 정상상태에 도달해있음 • 5가지 CYP기질 약물과의 상호작용 동시평가 • 홍삼 단회투여시 CYP기질 약물과의상호작용 관찰 안됨 • 홍삼 2주, 4주반복 투여시 CYP3A의 활성유도로 기질약물의 대사율이 증가됨이 확인됨 • 홍삼 추출물을 반복투여 후 mRNA와 단백질의 발현변화를 확인하였을 때 Mrp2의 발현이 유의적으로 감소함. 기질약물인 methotraxate의 혈중 농도는 대조군에 비하여 1주 반복투여군에서 유의적인 차이는 없었으나 소실속도가 감소하여 혈중 농도가 증가하는 경향을 보임. 담즙배설은 유의적으로 감소함 • nifedipine의 정맥투여시 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군에서 유의적인 차이가 없었으나, 경구투여시 혈중농도가 증가하고 대사체의 생성은 유의적으로 감소함
<ul style="list-style-type: none"> • in vivo 질환모델에서 홍삼 추출물과 약물과의 	<ul style="list-style-type: none"> • Streptozotocin 유도 당뇨병 모델에서 metformin과 홍삼추출물과의 	<ul style="list-style-type: none"> • Streptozotocin 유도 당뇨병 모델에서 metformin과 홍삼추출물과의 약동학적 상호작용은 관찰되지 않음 • 당뇨병쥐에서 metformin과 홍삼추출물 2

<p>상호작용 평가 (mouse/rat, in vivo)</p>	<p>상호작용 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> MCD-diet를 통한 지방간 모델에서의 홍삼 추출물과 CYP 기질 약물과의 상호작용 평가 	<p>g/kg를 한달간 투여하면 fasting glucose level이 유의적으로 감소하며 이는 홍삼과 metformin의 상가작용이 있는 것으로 확인됨</p> <ul style="list-style-type: none"> MCD-diet 모델에서 CYP활성 감소에 따른 약물상호작용 관찰 홍삼추출물의 4주 반복 투여를 통해 CYP활성이 회복되어 약물상호작용 경감됨을 확인함
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼의 간세포 활성조절 기전에 대한 프로테오믹스 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼 추출물을 4주간 반복투여 후 간세포내 단백질 변화 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼 추출물을4주간 투여 후 간조직내 단백질 변화의 comparative proteomics 분석 수행

(3) 제3차년도 (2017년)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> 임상시험 후 ginsenoside의 혈중 농도 분석 및 약동학 특성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> Ginsenosides 분석법 validation 임상시료 중 ginsenosides 분석 Ginsenosides 약동학 특성 평가 약동학 특성 기전확인을 위한 위장관 투과도 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 혈장 시료 중 ginsenoside 분석 (정량가능한 ginsenoside 확인한 결과, 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K의 5종 ginsenoside만 검출됨) 사람 혈장 중 5종 ginsenoside 분석법 validation한 결과 재현성있고 감도가 좋은 ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, and compound K 분석법을 확립하였음. Ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd는 반감기가 길고 반복투여에 의해 측정되는 현상을 보이지만 compound K는 축적현상이 없이 단회와 2주 반복 투여시 유사한 혈중 농도를 나타냄 Rg3를 제외한 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K의 투과도는 큰 차이가 없었으나, Rg3와 Rh1은 efflux ratio가 크므로 흡수의 저해현상이 있어 혈중 농도가 낮을 수 있음을 확인함.
<ul style="list-style-type: none"> 홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼추출물의 단회 및 반복투여에 대한 안전성 및 ginsenoside 혈중 농도 분석 홍삼의 단회 및 반복투여시 다빈도 	<ul style="list-style-type: none"> 정상군에서 홍삼-메포민 상호작용: 홍삼반복투여는 중요 수송체인 Oct1의 발현을 변화시켜 반복투여시 메포민의 소실반감기가 감소하고 혈중 농도가 증가함. 또한 24시간까지의 총 배설량도 증가함. 그러나 이러한 변화는 20% 내외로 임상적으로 유의한 변화는 아닌 것으로 판단됨. 당뇨병 질환군에서의 홍삼-메포민 상호작용: 홍삼과

	<p>처방의약품의 약동학적 상호작용 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> • 질환모델에서 홍삼의 단회 또는 병용투여시 약동학적 상호작용 평가 	<p>메포민의 약동학적 상호작용은 나타나지 않았으나 공복후 혈당농도는 메포민 단독투여군 또는 홍삼 단독투여군에 비하여 메포민과 홍삼을 동시 투여한 군에서 유의적으로 낮은 값을 보임</p> <ul style="list-style-type: none"> • 홍삼-warfarin 상호작용: 홍삼과 와파린을 병용투여했을 경우 와파린의 혈중농도에는 유의적인 변화가 없음. 또한 대사체의 혈중 농도에도 유의적인 변화가 없음 • 홍삼-고혈압치료제 상호작용: amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제는 amlodipine의 흡수가 느려지지만 유의미한 상호작용 없음. 니페디핀과는 유의미한 상호작용 없으나 위장관 대사효소의 감소로 대사체 생성이 감소함. Valsartan, furosemide와는 유의한 상호작용 없음. furosemide와 홍삼단회투여시 furosemide의 흡수가 증가하여 혈중 농도가 증가함. • 백삼-monoamine oxidase (MOA) 상호작용: 혈중농도는 대조군에서의 혈중농도에 비하여 감소하였으며, 반감기와 Tmax의 변화 없이 Cmax와 AUC가 감소하였다. • 홍삼-NSAID계 진통제 상호작용: sulfasalazine의 혈중농도는 임상적으로 유의미한 정도는 아니지만 Tmax와 MRT의 변화가 없이 Cmax와 AUC가 1주 반복투여군에서 유의적으로 증가하였음. 디클로페낙과 대사체인 hydroxiclofenac의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이가 없음. • 홍삼-omeprazole 상호작용: 오메프라졸과 대사체인 hydroxy omeprazole의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이 없음. • 홍삼-dextromethorphan 상호작용: 텍스트로메토르판과 대사체인 텍스트로판의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이 없음 • 홍삼-digoxin 상호작용: 디곡신의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이 없음. 간질환군에서 홍삼-실리마린의 상호작용: 홍삼의 투여는 실리마린의 약동학 특성에 상호작용을 유도하지 않음을 확인할 있었고, 간독성
--	--	--

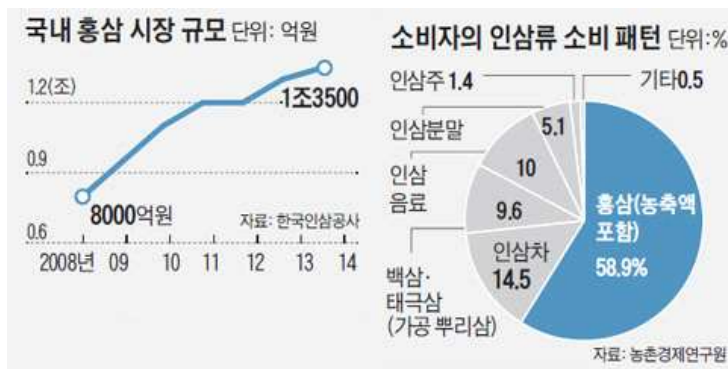
		지표인 ALT, AST의 감소는 실리마린과 홍삼의 상호작용에 의한 것이 아님.
<ul style="list-style-type: none"> 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 in vivo 동물용 각테일 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가용 in vivo rat dual 각테일 개발 대사효소 상호작용 평가를 위한 in vivo mouse 각테일 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 최소용량의 카페인, 디클로페낙, 텍스트로메톨판, 니페디핀, 오메프라졸, 디곡신, 퓨로세마이드, 메포민, 메토티렉세이트 및 발사탄으로 이루어진 탐침약물을 랫드에 동시투여하여 5종의 사이토크롬 P450 동종효소와 5종의 약물수송 단백질의 활성을 동시에 고속으로 측정할 수 있는 각테일 개발. 현재 국내특허로 출원되었음 (10-2018-0168269). 5종의 CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A) 활성 동시평가법 개발
<ul style="list-style-type: none"> 대사효소 및 약물수송체 유도능에 대한 in vivo rat PK 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 약물수송체 억제능 평가 인삼의 활성물질 5종의 약물수송체 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼 추출물의 단회 동시투여에 의한 약물상호작용 평가시 유의적인 상호작용은 나타나지 않음 홍삼 추출물의 2/4주 반복투여에 따른 약물상호작용 평가시 CYP3A의 대사율이 증가되는 반면에 CYP2D의 대사율은 저해됨이 관찰됨. 단백질과 mRNA 수준에서 CYP3A효소의 유도능은 관찰되지 않음 CD-diet로 유도한 지방간 모델에서 홍삼추출물의 약물상호작용 평가시 감소된 CYP활성 회복되어, 기질 약물들의 약물동력학 지표가 개선됨을 확인함
<ul style="list-style-type: none"> 다빈도 병용투여 의약품인 metformin과 고려인삼 상호작용 평가를 위한 임상시험 진행 	<ul style="list-style-type: none"> 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 식품의약품안전처 임상시험계획승인(IND) 신청 및 승인 대상자 모집 및 스크리닝 38명 진행 임상시험 진행 및 시료(혈장) 확보 약동·약력학 분석 및 약물상호작용과 	<ul style="list-style-type: none"> 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품 제품과 용량 선정 공개, 무작위배정, 2-시기, 1-순서군 디자인 확립 대상자 모집과 임상시험 완료 혈장 시료 확보 및 주관기관에 배송 혈중 약물농도 결과 전달받아 약동학 분석 시행 경구당부하 검사 결과 기반 약력학 분석 시행 paired t-test, ANOVA 등 통계분석 시행 측정된 약물농도를 이용하여 약동학 분석 수행 후 주요 약동학 파라미터 AUC와 C_{max} 산출 경구당부하 검사를 수행하여 glucose의 AUC와 C_{max} 산출 고려인삼과 metformin 병용투여 시와 metformin 단독 투여 시 약동학 파라미터의 변화를 통계적으로 확인

	안전성 평가	하여 약동·약력학적 상호작용 평가
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼과 다빈도 병용 투여 의약품인 metformin 안전성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 자·타각 증상 등 이상반응 발생 여부, 정도 및 빈도 비교·평가 신체검진, 활력징후, 12-lead 심전도, 임상실험실검사, 병용약물 복용 여부 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 연구 전 기간에 걸쳐 대상자의 상태(증상 및 징후)를 수시로 관찰 활력징후 중 혈압과 맥박수는 매 시기 첫 투여 전과 병용투여 시작 전, 매 시기 마지막 반복투여 전(0h)와 투약 후 4h, 24h에 측정 체온은 매 시기 첫 투여 전, 병용투여 시작 전과 2기 마지막 반복투여 전(0h), 2, 4, 6, 8, 12, 24h에 측정 심전도 검사는 스크리닝과 제 2기 퇴원 후 측정하여 평가 임상실험실검사는 매 시기 퇴원 전에 AST, ALT, BUN, 혈액응고검사를 시행
<ul style="list-style-type: none"> 고용량 고려인삼의 아만성 투여 후 안전성 평가를 위한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 고용량의 홍삼의 아만성 투여로 인한 안전성 평가 프로테오믹스 기반 간독성 기전 연구 Cystathionine beta-synthase 매개 H₂S에 따른 간독성 기전 규명 	<ul style="list-style-type: none"> 고용량 홍삼추출물 투여로 발생한 간독성의 기전을 탐색하기 위해 4주 투여 후 확보한 간시료에 TMT-1 labeling을 통한 정량적 프로테오믹 분석 실시 고용량의 홍삼 추출물의 아만성 투여로 인해 간독성이 발생하고, 그 기전이 CBS의 유도로 인한 H₂S가 증가하고, H₂S에 의해 증가된 ROS로 인한 염증반응 및 pAMPK감소로 인한 당신생반응의 증가로 고혈당이 유발됨을 제시함 따라서 권장복용량을 상회하는 용량으로 장기간 복용시 기대되는 약리작용이외의 독성반응을 야기할 수 있으므로, 정해진 권장복용량을 지킬 수 있도록 환자에 대한 복약지도가 요구됨을 확인함
<ul style="list-style-type: none"> 홍삼추출물의 신규 활성을 탐색하기 위한 국제 공동 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼추출물 및 ginsenoside의 전립선암세포의 migration 및 invasion 저해능평가 	<ul style="list-style-type: none"> 전립선암인 PC-3, LNCap 세포에 KRG 추출물 0.1 - 500 ug/ml 용량으로 처리하였을 때 migration 변화에 유의적인 변화를 관찰하지 못함 Invasion 평가에서도 홍삼추출물에 의한 저해효과는 나타나지 않았음

1-2. 연구개발의 필요성

○ 고려인삼의 건강기능 식품에서의 중요성

- 고려인삼의 세계일류상품 55선, 한국일등상품 10선 및 외국인이 연상하는 한국 대표 관광 상품 등에 선정된 한국을 대표하는 세계적 건강상품임
- 또한 해외 교역과 한국문화의 상징으로 전통적 명약으로서 한국문화상징 10에 선정됨
- 단일 품목으로 수출비중이 가장 높은 농산물임
- 동양의학에서 가장 효능이 있는 ‘상약’ 으로 분류되며, 건강기능식품의 상징으로 인식됨
- 국내 인삼 생산량은 중국의 44.49톤에 이어 세계 2번째 규모인 27.48톤으로 보고됨
- 세계적으로 국내에서 생산되는 고려인삼은 국내소비에 비해 수출이 활발하여, 해외 인삼의 국내 수입량 대비 수출량이 세계 1위를 차지함
- 국내에서 고려인삼의 여러 품목 중 홍삼이 가장 많이 생산되고 있으며, 최근 5년간 인삼의 소비행태 조사에 따르면 수삼형태보다는 가공된 인삼제품의 구매를 선호함
- 2014년 한국농촌경제연구원 ‘화훼·인삼·녹차의 소비행태 조사’ 보고서에 따르면 인삼 제품을 최근 5년 이내 구매했던 소비자들의 구입 제품으로는 홍삼, 홍삼정, 홍삼엑기스 등의 홍삼제품이 58.9%로 가장 높으며, 다음으로 인삼차 (14.5%), 인삼음료 (10.0%), 백삼이나 태극삼 등의 뿌리삼 (9.7%)등의 순이었음.
- 특히 인삼제품의 구입 시 불만사항으로는 제품 가격이외에 인삼제품의 안전성 신뢰 곤란이 전체 15.7%로 두 번째로 높게 조사되었음



[국내 홍삼시장 규모 및 주요 인삼류 소비품목]

○ 세계시장에서의 고려인삼의 위상

- 2015년도 우리나라 인삼 수출실적은 1억8900만 달러. 전년대비 52.5%가 늘어난 수치로 농수산물 단일품목으로는 최고액임
- 주요 수출국으로는 홍콩, 일본, 중국, 대만 등 동아시아와 미국임
- 세계 인삼시장 규모는 2015년 기준으로 200억 달러이며, 우리나라는 인삼중주국임에도 수출실적이 세계시장대비 1%미만으로 매우 미흡한 상황임
- 올해 정부의 인삼 수출 목표는 2억4500만 달러. 지난해 대비 29.4%나 높였으며, 2020년엔

10억 달러까지 늘린다는 계획을 발표함

- 인삼-약물 상호작용의 평가를 통해 고려인삼 복용의 과학적 안전성을 확보한다면 국가적으로 추진하는 인삼수출 증대를 통한 인삼농가의 수입 증대에 기여할 수 있을 것임

○ 고려인삼의 수출증대를 위한 새로운 전략의 필요

1. 품질관리 기준 강화와 약물상호작용 정보 요구

- 우울증에 효능이 있다고 알려진 St. John's wort의 경우 반복하여 복용하는 경우 약물대사효소인 CYP3A4의 활성을 증가시켜 함께 복용한 약물의 약효를 감소시킨 사례가 보고되었음
- 독일의 슈바베사는 CYP3A4의 활성을 증가시키는 St. John's wort의 주요 성분인 hyperforin의 함량을 일정하게 유지하여 약효의 재현성을 확보하고 약물상호작용 및 약효의 변화 예측성을 증대시켜 시장점유율 및 판매를 증가시켰음
- 고려인삼의 경우에도 품질관리 기준을 강화하여 유효성분의 함량을 일정하게 유지할 수 있는 제품으로 가공할 필요성과 함께 약물상호작용 기전을 이해하고 in vivo 임상에서 함께 병용하는 약물과의 약물상호작용을 평가하여 안전성에 대한 정보를 얻을 수 있음
- 또한 약동력학 모델을 사용하여 약물상호작용 가능성 및 반복 병용투여시 약효의 변화 예측성을 증가시키는 것이 고려인삼의 수출 증대 및 시장 점유율 증가에 기여할 것으로 사료됨

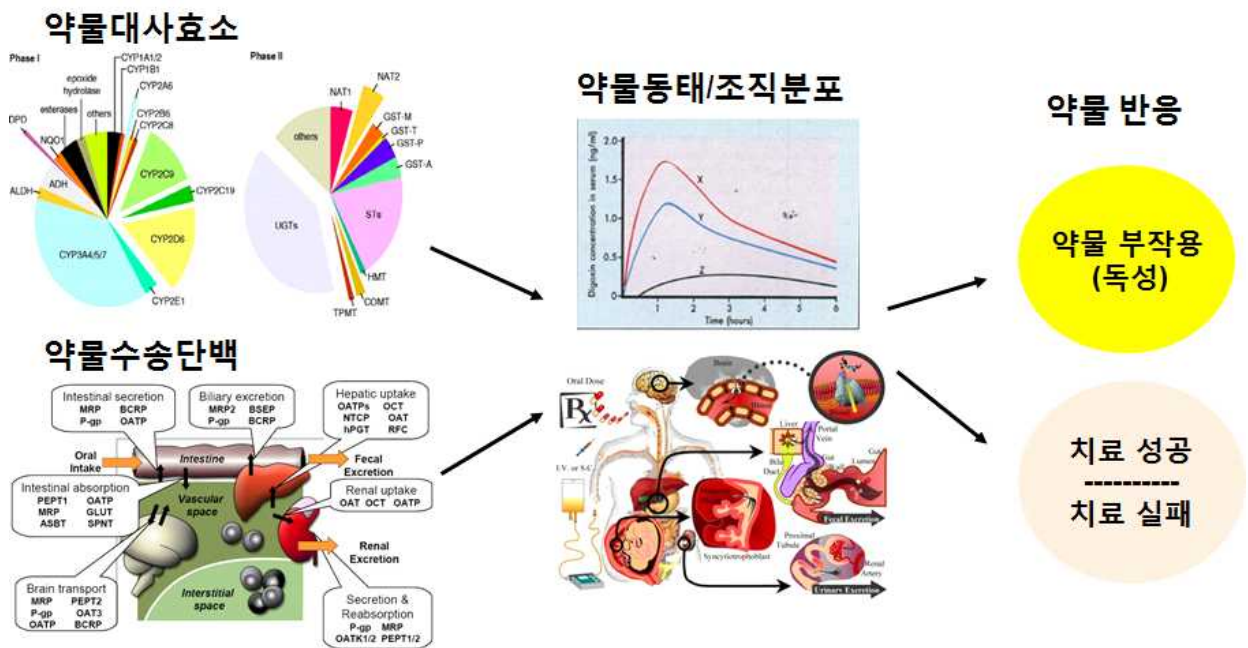
2. 약물상호작용 평가의 당위성

- 약물상호작용에 대한 정보는 신약개발시 drug labeling에 기재되는 매우 중요한 자료이며, 의약품의 안전한 복용을 위한 필수적인 자료임
- 1998년에서 2003년 까지 미국에서 부작용 발생 등의 이유로 허가후 시판 중지된 약물 12종 중 5종은 (astemizole, cerivastatin, cisapride, mibefradil, terfenadine) 약물대사효소 및 수송체 기반의 약물상호작용 발생에 그 원인이 있음
- 약물상호작용에 의한 부작용 발생빈도는 매우 높아서 사회적 비용이 발생하므로 안전한 약물사용을 위해 약물상호작용에 대한 정보 및 예측이 필요함
- 약물복용으로 인한 부작용 발생시 5종 이상의 약물을 병용투여한 경우가 92%임 (CPT, 1997). 즉, 의약품 또는 건강보조식품의 병용투여에 의한 약물상호작용 빈도가 매우 빈번하므로, 안전한 약물사용을 위해서는 약물상호작용에 대한 정보 및 예측이 필요함

3. 약물 부작용 예측을 위한 바이오마커 중 가장 중요한 것이 약물대사효소/수송체임

- 미국 FDA에서 고지한 약물반응의 다양성 예측을 위한 바이오마커는 효능 지표와 안전성 지표로 분류되며, FDA에서 2015년 11월 고지한 158종 지표 중 24.7%가 항암제의 표적과 관련된 지표이다. 나머지 75.3%는 안정성 지표임

- 안전성 지표 중 면역반응으로 인한 부작용에 관련된 지표가 7.6%이며, 수용체와 관련된 지표가 17.1%, 약물대사효소/수송체와 관련된 지표가 50.6%임
- 이상의 자료는 약물부작용을 평가/예측하기 위한 가장 대표적인 지표가 약물대사/수송체임을 나타냄
- 이는 약물대사효소/수송체가 아래 그림에서와 같이 약물의 체내동태 및 조직으로의 분포성을 조절하여 약효 및 부작용을 조절하는 가장 중요한 원인 유전자이기 때문임



[약효 또는 부작용 발생에 있어 약물대사효소/수송체의 중요성]

4. 건강기능식품-약물 약물상호작용의 연구의 중요성

- 천연물에서 유래하는 활성분자와 약물간 상호작용(herb-drug interaction)에 대한 중요성 관심이 증가하고 있음
- 약물과 함께 섭취되는 생약, 건강기능식품, 음식에 의한 약물의 약물/약동학적 상호작용에 의한 부작용으로 이들간 상호작용 평가를 통한 안전한 약물 또는 생약, 건강기능식품 정보의 구축이 요구됨
- 건강기능식품으로 사용되는 많은 품목들이 약물과 상호작용을 일으키는 것으로 보고되어 있으며, Canadian Pharmacists Journal, 2009에서 대표적 29개의 성분과 약물간의 상호작용을 보고함
- 고려인삼 역시 항혈전제를 비롯하여 7종류의 약물과 상호작용이 보고되어 있어 사용에 주의가 필요하여 체계적인 고려인삼-약물 상호작용의 평가가 요구됨
- 현재까지 고려인삼의 약물상호작용에 대한 선행연구결과는 주로 1상 대사효소에 국한된 결과가 대다수이고 주로 실험동물에서의 평가로 한정되어 있음
- 안전한 약물복용을 위해서 체계적 접근을 통한 상호작용 평가가 요구됨

- 1상 대사효소, 2상 대사효소, 수송체에 대한 체계적 평가 요구됨
- 안정성 평가에 관한 임상시험(약물동력학 평가)와 약효 검색을 위한 (약력학적)상호작용 평가가 필요
- 약물복용에 대한 가이드라인 제시가 가능하며, 정책제안을 통한 안전한 복용을 확보하여 국내 소비를 증가시키고, 수출을 증대시킬 수 있는 과학적 근거 확보가 요구됨

[의약품-건강기능식품의 병용섭취에 의한 약동학적 상호작용의 주된 예]

의약품	건강기능식품	상호작용으로 인한 부작용	
		구분	부작용
Metformin	Guar gum	길항작용	Metformin의 흡수 저해
Aspirin	Tamarind	상승작용	Aspirin의 BA 증가
Prednisolone	Glycyrrhizin	상승작용	Prednisolone의 CL 감소, AUC 증가
Digoxin, Theophylline, Cyclosporine	St. John' s wort	길항작용	대사 증가로 인한 AUC 감소, 혈중 농도 감소
Penicillamine	Fe 함유제제	길항작용	의약품 흡수 저해



CPJRPC

A tool for rapid identification of potential herbal medicine-drug interactions

Kosta Cvijovic, Heather Boon, Joanne Barnes, Jayna Brulotte, Walter Jaeger, Mano Murty, Duc Vu, Susanne Reid, Sunita Vohra

	Gastrointestinal system				Cardiovascular system						Respiratory system	Central nervous system				Endocrine system			Anti-infectives													
	Laxative agents	Anti-ulcer agents	Antacid agents	Antidiarrheal agents	Anticoagulant agents	Lipid-lowering agents	Antihypertensive agents	Beta-blockers	Diuretic agents	Cardiac glycosides	Antiarrhythmic agents	Antiasthmatic agents	Anti-allergy agents	Antiparkinson agents	Analgesic agents	Antipsychotic agents	Antiepileptic agents	Antidepressant agents	Sedative agents	Sex hormones		Corticosteroids	Hyperthyroid agents	Hypothyroid agents	Antidiabetic agents	Antifungal agents	Antibiotic agents	Anti(viral) agents	Nephrotoxic*	Hepatotoxic*		
Garlic					21	22																								23		
Ginger					24																											
Ginkgo					25	26		27																28								
Asian ginseng					29	30	31	32	33	31								34						35								
Hawthorn						36																										
Horse chestnut																																

[Herbal medicine-drug 상호작용 요약표, Canadian Pharmacists Journal, 2009]

○ 고려 인삼-약물의 상호작용 사례

- 고려인삼은 활력증강제로 작용하여 면역력 증강, 항염증, 항암활성 등 병용투여하는 약물

의 약효를 증강시키는 건강기능식품으로 분류되어 의약품과의 병용투여 사례가 매우 많음

- 그러나 고려인삼의 약물상호작용에 대해서는 체계적이고 다면적이며, in vitro에서 in vivo 연구까지 통합적으로 이루어지지 않고 있으며, 국내에서의 연구는 더욱 미약한 상황임
- ‘PubMed’에 ginseng과 drug interaction을 중심으로 검색하면 317개의 논문이 검색되며, 이 중 약동학적 상호작용 사례는 38건, in vitro cell에서의 약효에 대한 상승작용은 122건, 질환모델에서의 약물과 인삼의 상승작용이 212건이 검색되었다. 대부분은 외국의 연구진에 의한 결과이며, 약효의 상승작용에 대한 in vitro 실험결과임
- 약물의 표시기재부 (www.drugs.com)에 등록되어 있는 약물과 인삼의 상호작용은 generic drug을 포함하여 461건이 등록되었으나, 아스피린과 아스피린 복합제가 218건으로 약 47%를 차지하고 있으며, 인슐린제형이 84건으로 18%임. 당뇨병치료제와의 상호작용이 22건으로 5%, nifedipine등의 칼슘길항제가 12건으로 3%에 해당함. 이외에는 warfarin, digoxin, urokinase 등이 있으나, 상호작용의 기전에 대한 연구 및 약물대사/동태학적 상호작용 정보는 부족한 실정임
- 즉, ‘PubMed’의 연구실적에는 의약품의 표시기재부에 포함되지 않은 약물 또는 사례가 많은데 이는 의약품 표시기재에 포함되기 위해서는 FDA, EMEA, KFDA 등 허가기관의 기준에 맞춘 in vitro 및 in vivo 실험이 요구되는 데, PubMed의 연구결과가 이를 충족하지 못한 것도 이유가 될 것임
- 그러므로 본 연구과제에서는 고려인삼의 약물상호작용을 FDA, EMEA, KFDA 등 허가기관의 약물상호작용 평가 기준에 부합하는 실험계를 이용하여 체계적으로 평가하고, 임상적 의의가 약물에 대해서 in vitro 및 in vivo 약물상호작용 연구를 수행하고자 함
- 이상의 결과는 고려인삼 복용시 안전성을 확보하고 인삼의 복용가이드라인을 설정하는데 기여할 수 있을 것임

○ 고려인삼 - 약물상호작용 연구의 범위

- 약물상호작용 평가를 위해서는 약물대사효소 및 수송체에 대한 고려인삼의 저해성 및 유도능을 평가하게 되는데, 이는 고려인삼이 약물대사효소 및 수송체의 기능을 억제 또는 활성화 시켜 함께 복용하는 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설 특성을 변화시켜 약물의 체내동태 및 약효의 변화 및 부작용 발생을 유도하기 때문임
- 신약의 약물상호작용 평가를 위하여 FDA에서는 2006년과 2012년 “Guidance for Industries : Drug interaction studies” 를 고지하였으며, 약물대사와 약물수송체에 대한 in vitro 및 in vivo 약물상호작용 시험을 필수적으로 수행하도록 함. 이상의 결과는 신약 승인시 약품 표시기재사항으로 drug labeling에도 포함됨
- 또한 건강기능 식품 등으로 약물과 다빈도로 복용되고 있는 herb의 경우에는 herb-drug interaction guideline을 발표하여 의약품의 안전성을 확보하기 위하여 필수적

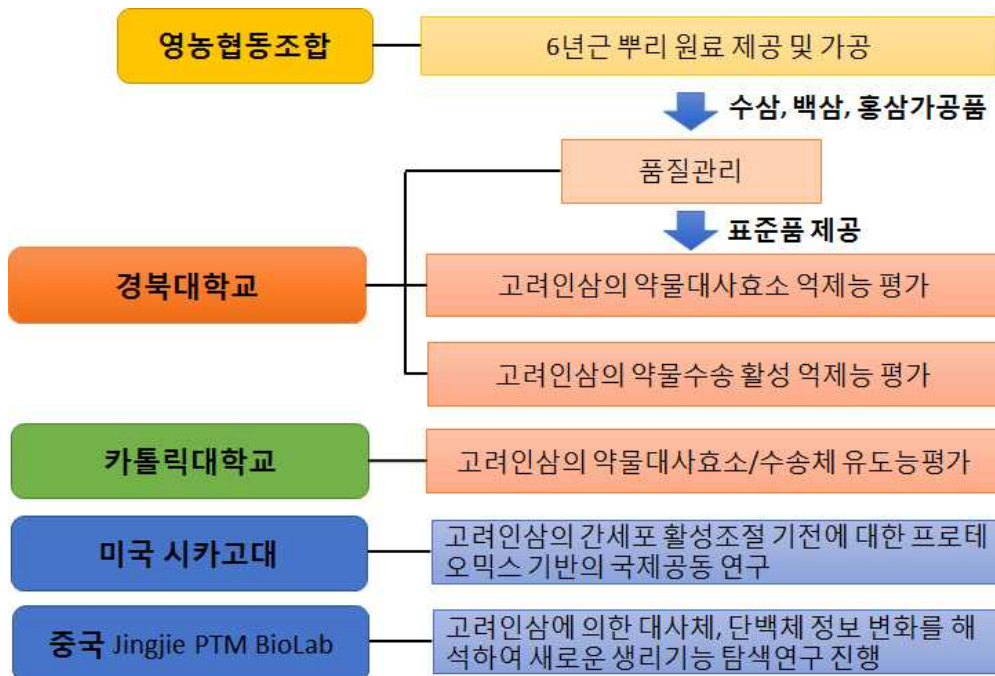
으로 수행하고 있음

- 한국 식약처도 2011년 약물상호작용 연구 가이드라인 설정하였으며 천연물신약의 경우에는 약물대사효소 및 수송체에 대한 약물상호작용 평가가 필수 제출자료임
- 고려인삼의 복용 가이드라인 설정을 위한 과학적 안전성을 평가하기 위해, 고려인삼에 대한 약물대사효소 및 약물수송체에 대한 약물상호작용 평가가 필수적임
- ☞ 고려인삼의 약물상호작용 연구를 통하여 약물 안정성을 확보하여, 국가적으로 추진하는 인삼 수출 증대에 기여하고자 함
- ☞ 고려인삼의 약물상호작용 연구를 위해 약동학/약물대사효소/수송체에 기반한 약물상호작용을 평가하고, 다빈도 복용 의약품과의 in vivo 약물상호작용을 평가하고자 함

1-3. 연구개발 범위

가. 1차년도

① 개발 목표



- 주관연구기관(경북대학교) : 고려인삼 제제 및 활성물질의 in vitro 약물상호작용 평가
 - (1) 고려인삼제제 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 가공 및 활성성분 분리 정제, 가공품 품질관리
 - (2) 고려인삼 제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 1상/2상 대사효소 억제능 평가
 - (3) 고려인삼 제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 약물수송 활성 억제능 평가

- (4) 인삼의 활성물질 5종 (Ginsenoside Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K)의 1상/2상 대사 효소 억제능 평가
- (5) 인삼의 활성물질 5종 (Ginsenoside Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K)의 약물수송 활성 억제능 평가
- 공동연구 (가톨릭대학교) : 고려인삼 제제 및 활성물질의 1상 및 2상 대사효소/수송체 유도능 평가
- 국제공동연구1 (미국 시카고대학교) : 고려인삼의 간세포 활성조절 기전에 대한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구 진행
- 국제공동연구2 (중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd) : 고려인삼에 의해 변화되는 생체 내 대사체, 단백질 정보를 해석하여 새로운 생리기능 탐색에 대한 국제공동연구 진행
- 협력연구 (풍기인삼 영농협동조합) : 6년근 뿌리원료 및 홍삼추출물 제공

② 개발 내용 및 범위

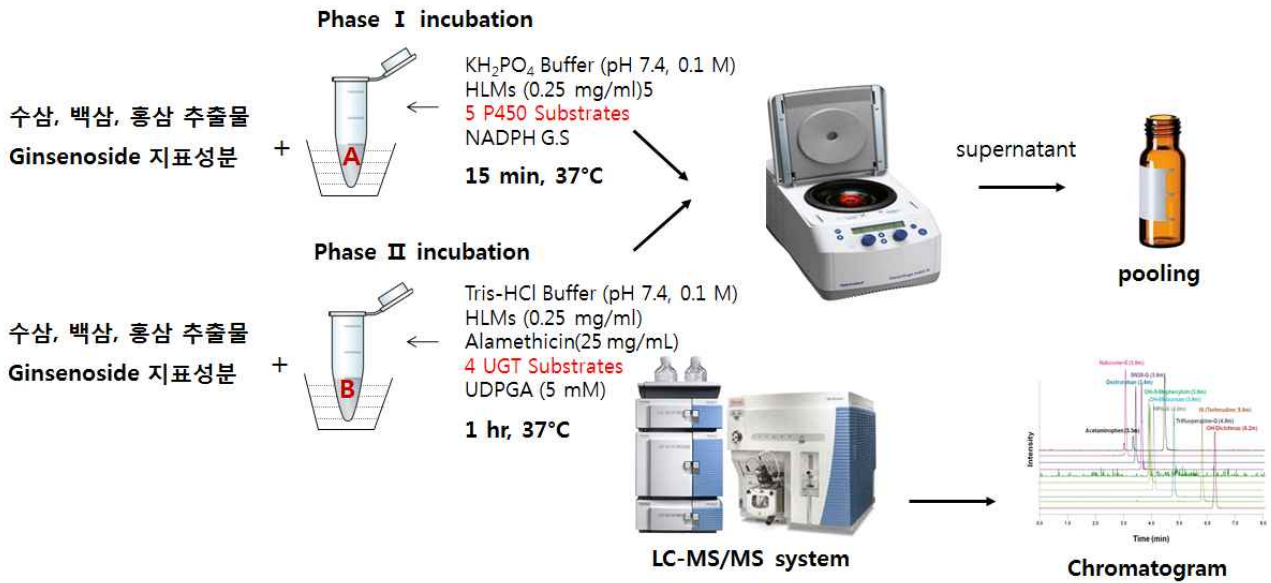
- 주관연구기관(경북대학교 약학대학) :

(1) 고려인삼제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 가공 및 활성성분 분리 정제, 가공품 품질관리

- 풍기인삼영농협동조합과의 MOU를 통하여 품질이 보증된 고려인삼 원료 및 가공품을 제공받고 본 연구에 사용할 고려인삼제제 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)를 추가 가공 및 치료성분의 분석을 통하여 품질을 관리함
- 인삼활성물질인 Ginsenoside Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K를 고려인삼으로부터 분리 및 정제하여 상호작용 연구에 사용할 수 있도록 제공함

(2) 고려인삼 3종의 약물대사효소 억제능 평가

- 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 1상/2상 대사효소 억제능 평가 (1상 대사효소 5종 : CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A) 및 2상 대사효소 4종 : UGT1A1, 1A4, 1A9, 2B7)
- 본 연구팀이 이미 보유한 1상/2상 대사활성 동시분석기술을 활용하여 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 대사활성 억제능을 농도별로 평가함
- 평가한 저해성 결과로부터 저해상수 IC₅₀ 값을 산출하고, 각각의 저해능 비교
- 산출된 저해상수로부터 in vivo 상호작용 가능성 평가



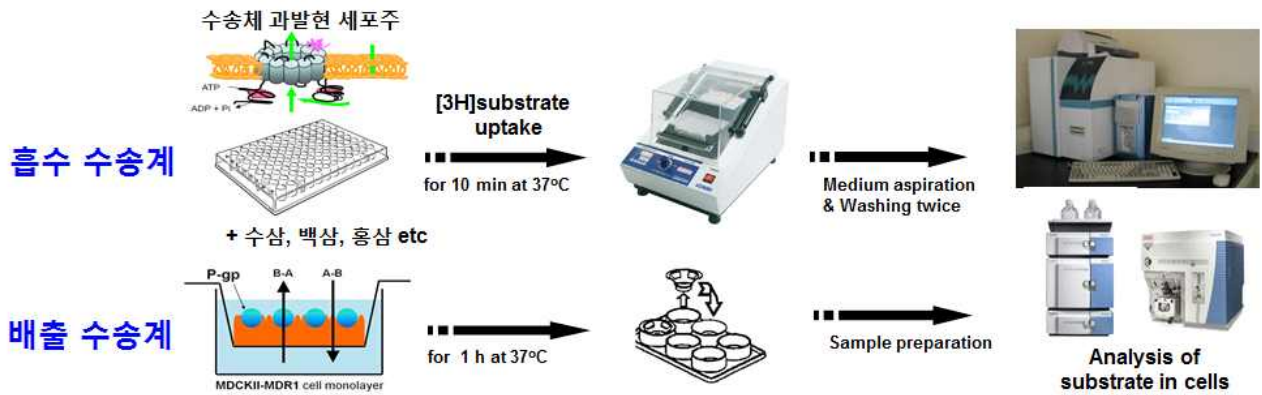
[수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 1상/2상 대사효소 억제능 평가 연구 개요도]

기질 반응	대사효소	기질 농도 (μM)	기질 반응	대사효소	기질 농도 (μM)
Phenacetin	CYP1A2	80	SN38	UGT1A1	0.5
Diclofenac	CYP2C9	10	Trifluoperazine	UGT1A4	0.5
Omeprazole	CYP2C19	20	Mycophenolic acid	UGT1A9	0.2
Dextromethorphan	CYP2D6	5	Naloxone	UGT2B7	1
Midazolam	CYP3A4	2.5			

[수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 1상/2상 대사효소 억제능 평가시 기질의 종류 및 농도]

(3) 고려인삼 3종의 약물수송 활성 억제능 평가

- 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 흡수 및 배출 수송계 억제능 평가 (OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp, BCRP)
- 본 연구팀이 이미 보유한 흡수 및 배출 수송활성 평가 기술을 활용하여 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 수송활성 억제능을 농도별로 평가함
- 평가한 저해성 결과로부터 저해상수 IC₅₀ 값을 산출하고, 각각의 저해능 비교
- 산출된 저해상수로부터 in vivo 상호작용 가능성 평가



[수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 약물수송체 억제능 평가 연구 개요도]

(4) 인삼의 활성물질 5종의 사람 간마이크로솜에서의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 억제능 평가

- Ginsenoside Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K의 1상/2상 대사효소 억제능 평가 (1상 대사효소 5종 : CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A) 및 2상 대사효소 4종 : UGT1A1, 1A4, 1A9, 2B7)
- Ginsenoside Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K의 흡수 및 배출 수송체 억제능 평가 (OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp, BCRP)

- 공동연구 (가톨릭대학교) :

(1) 홍삼 추출물의 사람 간세포에서의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능 평가

- 홍삼 추출물의 1상/2상 대사효소 및 수송활성 유도능 평가 (1상 대사효소 5종 : CYP1A2, CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19) 및 2상 대사효소 5종 : UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B7, SULT2A1), 수송체 (P-gp, BCRP)의 유도능 평가
- Human hepatocytes의 3D culture를 이용하여 사람의 대사 및 수송에 중요한 약물대사효소 및 약물수송체의 발현량 증가를 mRNA 수준에서 RT-PCR을 이용하여 평가
- 미국 및 유럽의 약물대사효소/수송체 유도능 평가 가이드라인 기준으로 Human hepatocytes를 3D culture 하고, 이 실험계에 국내 생산된 수삼, 백삼, 홍삼을 농도별로 48시간 동안 처리한 후 RNA를 추출하고, RT-PCR을 이용하여 mRNA 수준에서 1상, 2상 약물대사효소와 약물수송체의 발현량의 변화를 확인함
- 농도의존적 발현량의 증가로부터 유도능에 대한 EC₅₀ 값 산출
- 홍삼의 각각의 유도능에 대한 정량적 비교 및 in vivo에서의 약물상호작용 가능성 예측



[수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 1상/2상 대사효소 및 수송체 유도능 평가 연구 개요도]

- 국제공동연구1 (미국 시카고대)

- 미국 시카고대 Ben May Department for Cancer Research의 Dr. Yingming Zhao와 MOU를 맺고, 고려인삼의 간세포 활성화조절 기전에 대한 프로테오믹스 기반의 약리기전에 대한 국제공동 연구 진행 예정
- 고려인삼 제제 또는 활성성분이 ginsenoside를 간세포, 전립선 암세포 등에 처리하고, 세포 활성화 조절능을 규명하기 위해 세포 단백질을 추출함
- 추출된 단백질 시료로부터 Mass spectrometry 기반의 프로테오믹스 및 post-translational modification을 분석하여 major cell pathway를 분석하고, 이로부터 post-translational modification의 dynamic analysis를 통하여 고려인삼 제제 또는 활성성분이 ginsenoside를 간세포, 전립선 암세포내에서의 약리활성 기전 및 치료효과를 확인할 예정임

- 국제공동연구2 (중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd)


- 중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd의 Dr. Cheng Zhongyi와 MOU를 맺고, 고려인삼에 의해 변화되는 생체 내 정보를 해석하여 새로운 생리기능을 탐색하고 평가할 예정임
- 고려인삼 제제 또는 활성성분이 ginsenoside를 간세포 및 간암세포 등에 처리하고, 세포 활성화 조절능을 규명하기 위해 세포 단백질을 추출함
- 추출된 단백질 시료에서 유전체, 단백질체, 대사체의 변화 패턴을 분석하고 이 결과에 bioinformatics 분석을 진행하여 고려인삼에 의해 변화되는 생체 내 정보를 해석하여 새로운 생리기능을 탐색하고 평가할 예정임

- 협력연구 (풍기인삼 영농협동조합) : 연구진행을 위해서는 품질이 보증된 인삼시료의 확보가 매우 중요함. 이를 위하여 국내에서 생산되는 6년근 인삼원료가 확보되어 있고, GMP 시설이 완비되어있는 풍기인삼농협과 MOU를 체결하고 연구 진행에 필요한 인삼 원료 및 가공품을 제공받은 예정임. 또한 풍기인삼농협은 중국, 미국, 베트남 등에 해외판매소를 직접운영하고 있어 수출개발을 위한 본 과제의 연구개발에 상호 협력연구가 용이할 것으로

로 판단됨.


본 연구팀과의 협력부분은 다음과 같음

(1) Ginseng Radix (고려인삼) 6년근 뿌리 원료 제공

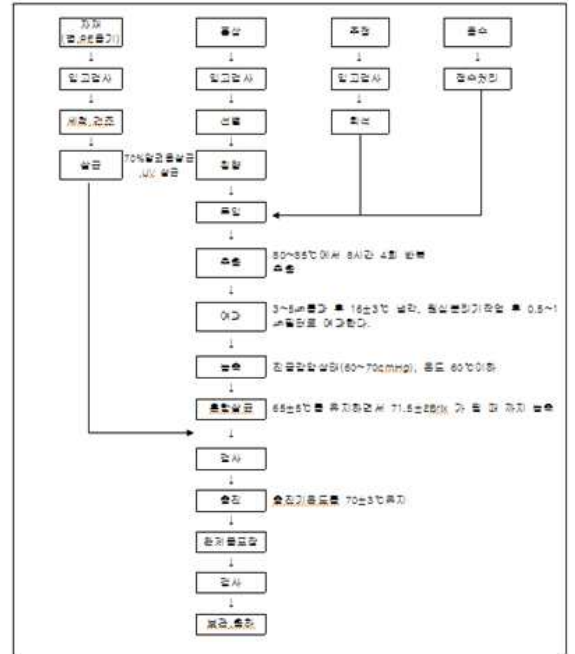
 제품표준서 홍삼농축액	문서번호	PH-PS-01
	제개정일자	2008.04.21 2014.01.28 2018.04.27
	개정번호	Rev. 10
	페이지	3 / 38

1. 포박선고사항

제품명	홍삼농축액
제품의 목적	홍삼제품
성상	홍삼색의 농성을 지닌 연노란색의 정제물
제품선고연월일	2004년 11월 28일, 2009년 09월 01일(본정선고), 2010년 03월 17일, 2011년 12월 01일(본정선고), 2018년 05월 10일
작성일자	이 차 무일장
작성연월일	2009년 04월 01일, 2010년 01월 01일, 2010년 03월 17일, 2011년 12월 01일, 2018년 05월 08일
기본내용	연약한 몸질, 피로개선, 혈소판 응집억제, 혈관 질환예방, 기억력 개선, 항산화에 도움을 줄 수 있음
섭취방법 및 섭취량	1일 3회, 1회 1g 정도를 냉수 또는 온수에 용해하여 섭취
섭취시 주의사항	외국산(당뇨치약, 혈액응고제) 복용시 섭취에 주의하십시오. 개별 용에는 이물질이 들어가지 않도록 밀봉 보관
보관기준	직사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관
유통기한	제조일로부터 66개월
표시사항	“건강기능식품” 표시사항 : 건강기능식품으로서(건강기능식품등법), 제조업, 제조업 및 소재지, 유통기한 및 보관방법, 내용물, 영양정보, 기능성분, 성분명, 성분명 및 성분시 주의사항, 총질량 및 순량, 용량과 약효 및 효능을 위한 외장물이 아니라는 내용의 표시, 내용물중 소리가파형발생유감에 관한 안내, 소리가파형발생 경향정보, 용산지, 총질량과 약효정보, 제조번호(LOT NO), 무단중복사용사해신고번호, 유통도안, 기타 세 부류사항에서 정하는 사항.
	표장방법 및 포장단위
포장재질	유리병, 폴리에틸렌 알루미늄(PE+AL)

 제품표준서 홍삼농축액	문서번호	PH-PS-01
	제개정일자	2008.04.21 2014.01.28 2018.04.27
	개정번호	Rev. 10
	페이지	4 / 38

2. 제조공정도



[시험원료 및 시험체제를 제공할 풍기인삼농협의 홍삼 추출공정 및 제품표준서]

(2) 시험에 사용될 원료는 수삼, 백삼, 홍삼추출액 및 분말의 형태로 제공함

(3) 홍삼가공품 내에서 지표물질인 사포닌 함량을 평가하여 홍삼추출물의 품질 관리

- 홍삼 추출 공정 및 공정표준서 (그림 첨부)
- 홍삼추출물의 검사항목

No.	검사항목	판정기준	검사주기
1	성상	고유의 색택과 향미를 가지며 이미, 이취가 없어야 함	LOT별
2	Rb1, Rg1 및 Rg3 함량	표시량(5.1mg/g) 이상	LOT별
3	고형분(%)	표시량 이상(최소 60%이상 표시)	LOT별
4	세균수	1ml당 3000 이하	LOT별
5	대장균군	음성	LOT별
6	잔류농약	식품공전 기준치에 적합하여야 함.	월 1회

- 시험성적서 중 성분분석표 : 진세노사이드Rb1, Rg1 및 Rg3의 합으로 5.1 mg/g 이상

나. 2차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관(경북대학교) :

- (1) 홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가
- (2) 시료 분석 : 임상시험 후 인체내 특정약물 및 ginsenoside의 혈중 농도 분석
- (3) Ginsenoside의 1상/2상 대사효소/ 수송체 억제 기전 규명 및 임상적 유용성 판정

- 공동연구 1(경북대학교병원 임상시험센터) : 고려인삼 안전성 평가 제 1상 임상시험 수행

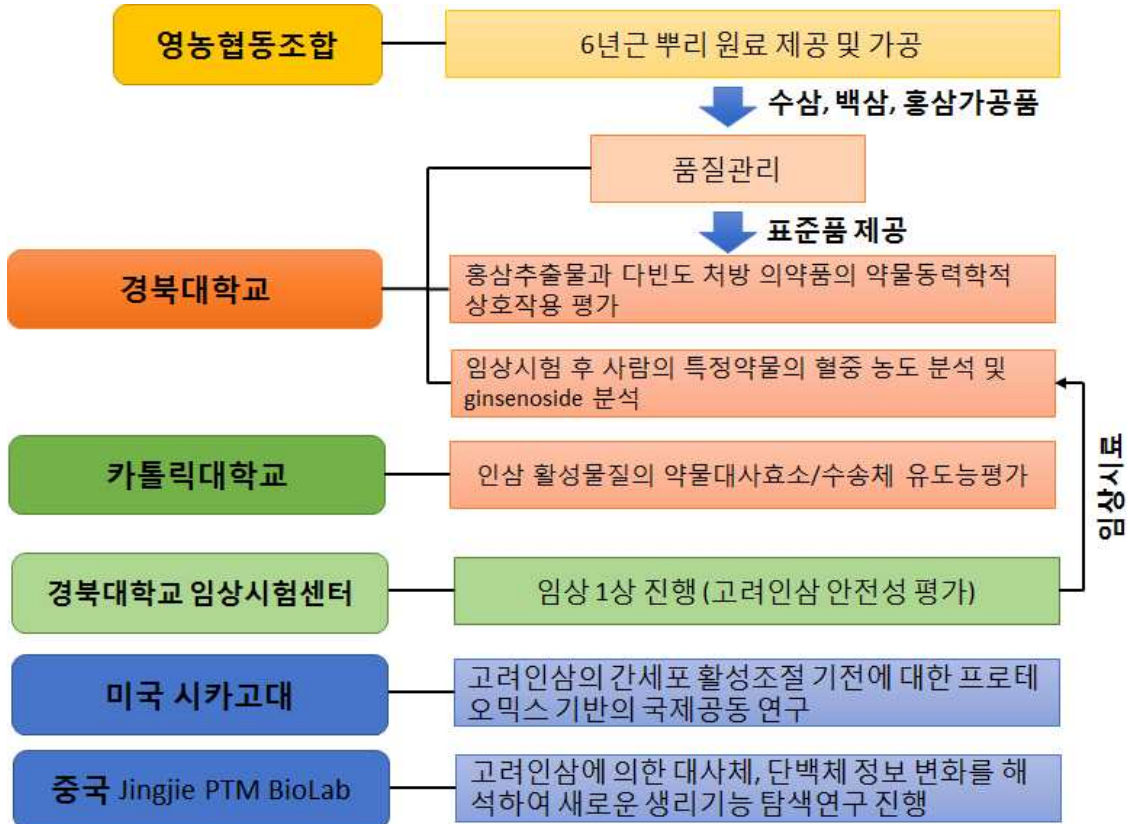
홍삼 투여 후 ‘In vivo cocktail’ 을 보완적용하여 약물상호작용평가 및 안전역 설정

- 공동연구 2(가톨릭대학교) : 인삼의 활성물질(ginsenoside)의 사람 간세포에서의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능 평가

- 국제공동연구1 (미국 시카고대학교) : 고려인삼의 간세포 활성조절 기전에 대한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구 진행

- 국제공동연구2 (중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd) : 고려인삼에 의해 변화되는 생체 내 대사체, 단백질 정보를 해석하여 새로운 생리기능 탐색에 대한 국제공동연구 진행

- 협력연구 (풍기인삼 영농협동조합) : 6년근 뿌리원료 및 홍삼추출물 제공

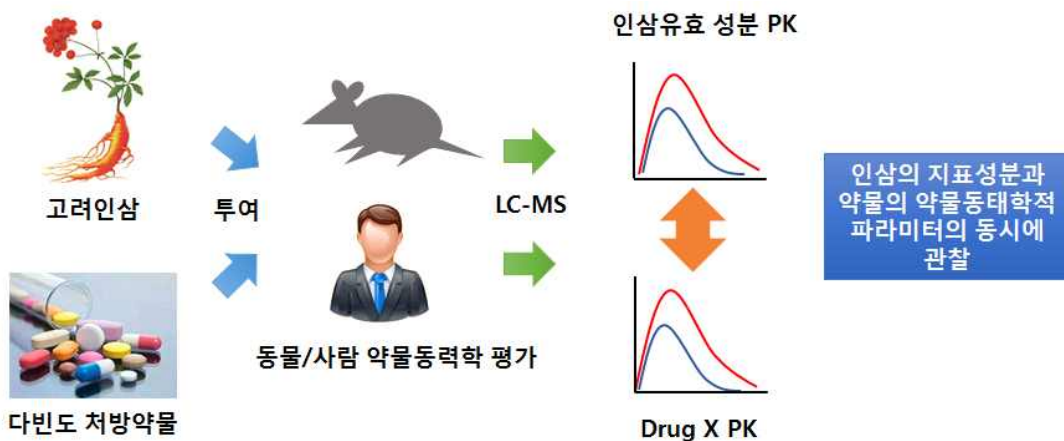


② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(경북대학교) :

- (1) 랫드/마우스에서 홍삼-약물상호작용 평가

- a. 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 약물대사 활성 및 수송활성 저해성에 대한 in vivo rat PK 평가
- 잘 알려진 CYP 대사효소 및 약물수송체의 기질과 ginsenoside의 in vivo rat PK 상호작용 연구
 - 연구팀에서 기 개발된 대사효소와 수송활성 평가를 위한 ‘In vivo cocktail’의 보완 및 저용량의 cocktail substrate를 투여하여 약물의 대사효소와 수송활성의 변화를 평가함
 - Ginsenoside 등 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 지표성분도 함께 분석하여 약동학 특성 평가 및 상호작용 유도시 혈 중 농도에 대한 정보도 함께 고려할 계획임



- b. 고려인삼과 in vitro 상호작용이 확인된 약물과의 약물동력학 평가 (mechanism 기반의 in vivo 상호작용 평가)
- 1차년도 연구결과를 통하여 상호작용이 큰 대사효소 또는 수송체를 통하여 약물의 체내동태 또는 약효의 영향을 받은 약물 선정
 - 인삼과의 병용투여 및 상호작용이 알려진 관절염치료제 (methotrexate, sulfasalazine 등), 당뇨병 치료제 (metformin, repaglinide, DPPIV 억제제), 고혈압치료제 (valsartan 등), 이뇨제 (furosemide 등), 항혈전제 (warfarin, aspirin 등), MAO inhibitor 등의 약물군에서 in vitro 상호작용 결과를 고려하여 선정함
 - Ginsenoside 등 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 지표성분도 함께 분석하여 약동학 특성 평가 및 상호작용 유도시 혈 중 농도에 대한 정보도 함께 고려함
- c. Ginsenoside의 약물대사효소/수송체 억제 기전 연구
- 1차년도에서 규명된 ginsenoside 중 유의적인 저해활성을 나타내는 ginsenoside와 대사효소/수송체의 in vivo 활성의 억제능을 검증하고 기전을 규명함
 - 평가에 사용한 ginsenoside이외에 compound K와 같은 metabolite에 대한 약물대사효소/수송체 억제능 추가 평가 및 기전 연구

d. 백삼으로부터 얻은 고사포닌 분획의 대량 제조 및 약력학적 상호작용 평가

- 1차년도에서 제조한 백삼으로부터 얻은 고사포닌 분획의 대량 제조 및 in vitro 효능 비교 평가 (HT22 세포주에서의 뇌신경세포보호 효능 및 HepG2 세포주에서의 간세포 보호 활성)
- 치료약물과 병용투여시 in vitro 및 in vivo 약동학적/약력학적 상호작용 평가

- 공동연구 1(경북대학교병원 임상시험센터) : 고려인삼 안전성 평가 제 1상 임상시험 수행
홍삼 투여 후 'In vivo cocktail' 을 보완적용하여 약물상호작용평가 및 안전역 설정

(1) 임상시험 디자인 확립

- 홍삼의 반복투여에 의한 1상 및 2상 대사효소, 수송체 활성화에 기반한 상호작용을 평가하기 위하여 기 확보된 'in vivo cocktail'을 기반으로 하여 제 1상 임상시험 수행
- 홍삼과 'in vivo cocktail' 약물 투여 용량 및 투여일 확립

▷ 홍삼 상용량 중 고용량을 선정하여 반복투여

▷ in vivo cocktail에 사용되는 약물 및 용량(안)은 다음 표와 같음

약물 및 용량	대사효소
midazolam 2 mg	CYP3A
dextromethophan 30 mg	CYP2D6
caffeine 100 mg	CYP1A2
losartan 50 mg	CYP2C9
omeprazole 20 mg	CYP2C19
pitavastatin 2 mg	OATP1B1

▷ 각 기질은 인체 대사효소 및 수송체의 가장 대표적인 기질로 FDA/EMA의 임상1상 상호작용 연구시 명시되어 있는 기질이며 다른 효소에 대한 저해성이 없어 상호간의 영향을 주지않는 기질과 투여용량으로 선정하였고, clinical pharmacology and therapeutics (2007)에 게재된 in vivo cocktail 조성임

▷ 상기 용량과 약물은 1차년도 연구결과와 분석 감도에 따라 최적의 조건으로 조정할 예정임

(2) 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 작성

- 대상자 선정·제외 기준 및 대상자 수
- 채혈시점, 횟수, 채혈량 등 채혈방법에 관한 문헌고찰 및 확립
- 채뇨방법 탐색 및 확립
- 검체처리 방법 조사 및 확립

(3) 경북대병원 임상시험심사위원회(IRB) 심의

- 연구계획서 및 CRF 등 IRB 제출서류 filing
- IRB 심의 및 승인 득함

(4) 대상자 모집 및 스크리닝 검사 시행

- 대상자 모집 공고
- 대상자 서면동의 후 스크리닝
- 선정·제외기준에 적합한 대상자 최종선정

(5) 임상시험 진행 및 임상시료(혈장, 뇨) 확보

- 첫 투여 전 혈장 및 뇨 시료 확보 후 홍삼 반복투여 시작
- 1, 2기 마지막 투여일 전날 저녁 8시경에 경북대병원 임상시험센터에 입원하여 퇴원할때까지 식이 및 활동 등을 조절하도록 함
- 입원 다음 날 오전 투여 전에 대상자 전원에게 팔 또는 손등의 정맥부위에 iv catheter 거치
- 오전 8시경 대상자 모두에게 홍삼 또는 홍삼+in vivo cocktail 약물을 투여하고 계획된 시점에 혈장 및 뇨 시료 채취



- 혈액은 혈구분리용 원심분리관에 넣고 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 즉시 혈장 분리관을 사용하여 혈장을 취함
- 혈액시료는 분석 시까지 -70℃에서 보관함

(6) 약동학 분석 및 약물상호작용 평가, 안전성 평가

- 홍삼 및 약물 농도 측정을 위한 혈장 및 뇨 시료를 주관연구기관에 제공
- 측정된 약물농도를 이용하여 AUC, C_{max} 등의 주요 약동학 파라미터를 산출함
- 보고된 이상반응 등을 통한 안전성 평가
- 임상시험 종료보고 및 결과보고서 작성

- 공동연구 2(가톨릭대학교) :

(1) 인삼의 활성물질(Ginsenoside)의 사람 간세포에서의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능 평가

- 인삼의 활성물질(Ginsenoside)의 1상/2상 대사효소 및 수송활성 유도능 평가 (1상 대사효소 5종 : CYP1A2, CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19) 및 2상 대사효소 5종 :

UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B7, SULT2A1), 수송체 (P-gp, BCRP)의 유도능 평가

- Human hepatocytes의 3D culture를 이용하여 사람의 대사 및 수송에 중요한 약물대사효소 및 약물수송체의 발현량 증가를 mRNA 수준에서 RT-PCR을 이용하여 평가
- 미국 및 유럽의 약물대사효소/수송체 유도능 평가 가이드라인 기준으로 Human hepatocytes를 3D culture 하고, 이 실험계에 국내 생산된 ginsenoside를 농도별로 48 시간 동안 처리한 후 RNA를 추출하고, RT-PCR을 이용하여 mRNA 수준에서 1상, 2상 약물대사효소와 약물수송체의 발현량의 변화를 확인함
- 농도의존적 발현량의 증가로부터 유도능에 대한 EC₅₀ 값 산출

- 협력연구 (풍기인삼 영농협동조합) :

- (1) Ginseng Radix (고려인삼) 6년근 뿌리 원료 제공
- (2) 시험에 사용될 원료는 수삼, 백삼, 홍삼추출액 및 분말의 형태로 제공함
- (3) 원료 내에서 지표물질인 사포닌 함량을 평가하여 시약의 품질 관리

- 국제공동연구1 (미국 시카고대)

- 1차년도에 체결된 미국 시카고대 Ben May Department for Cancer Research의 Dr. Yingming Zhao와의 MOU를 통해 구체적 국제공동연구 수행
- Ginsenoside의 전립선암세포에서의 활성을 평가하고 프로테오믹스 기반의 약리기전에 대한 국제공동 연구 진행

- 국제공동연구2 (중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd)

- 1차년도에 체결된 중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd의 Dr. Cheng Zhongyi와 MOU를 통해 국제공동연구 수행
- 고려인삼 제제 또는 활성성분이 ginsenoside를 간세포 및 간암세포 등에 처리하고, 세포 활성 조절능을 규명하기 위한 프로테오믹 분석결과를 bioinformatics 분석을 진행하여 고려인삼에 의해 변화되는 생체 내 정보를 해석하여 새로운 생리기능을 탐색하고 평가할 예정임

다. 3차년도

① 개발 목표

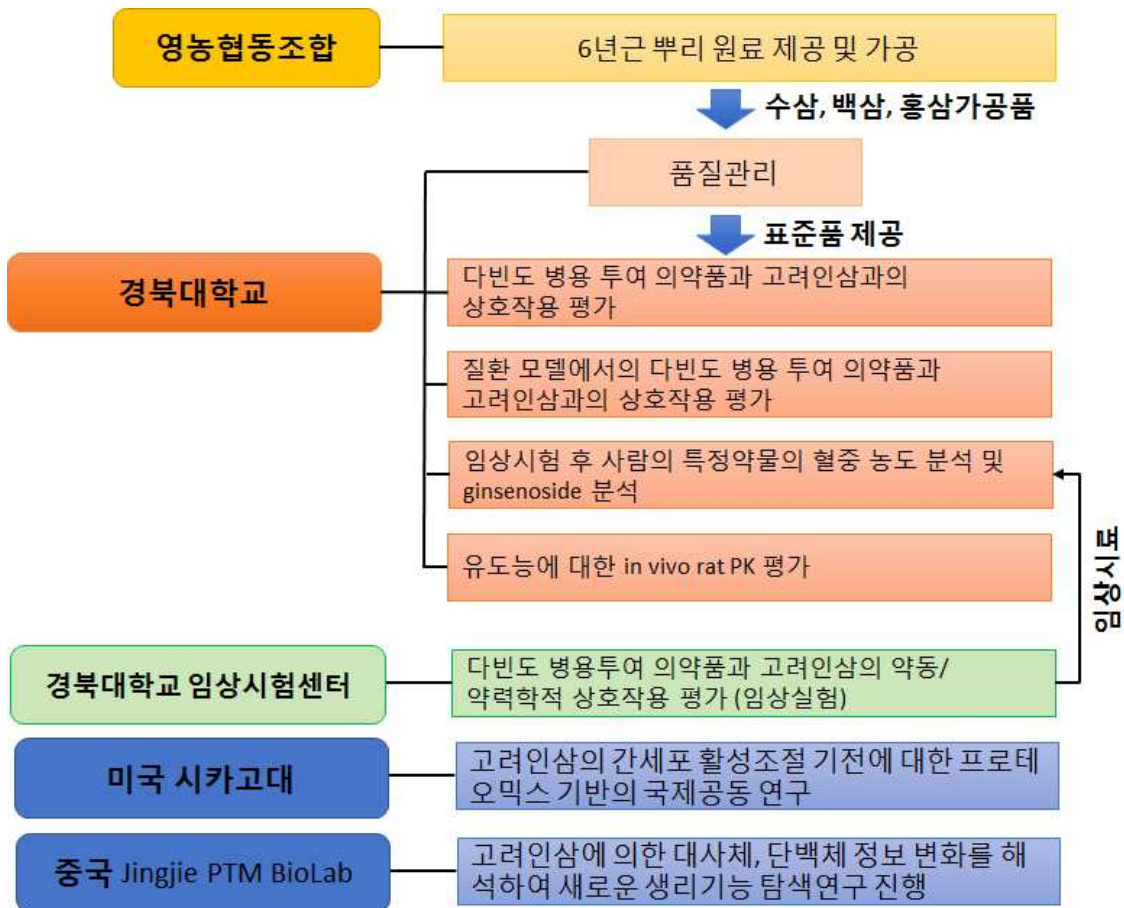
- 주관연구기관(경북대학교) :

- (1) 홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가
- (2) 시료 분석 : 임상시험 후 인체내 특정약물 및 ginsenoside의 혈중 농도 분석

(3) Ginsenoside의 1상/2상 대사효소/ 수송체 억제 기전 규명 및 임상적 유용성 판정

(4) 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능에 대한 in vivo rat PK 평가

- 공동연구 (경북대학교병원 임상시험센터) : 고려인삼 상호작용 평가 제 1상 임상시험 수행
 - 다빈도 병용투여 의약품과 고려인삼의 약동/약력학적 상호작용 평가
- 국제공동연구1 (미국 시카고대학교) : 고려인삼의 간세포 활성조절 기전에 대한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구 진행
- 국제공동연구2 (중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd) : 고려인삼에 의해 변화되는 생체 내 단백질 정보를 bioinformatics 분석을 통해 생체기전을 탐색함
- 협력연구 (풍기인삼 영농협동조합) : 6년근 뿌리원료 및 홍삼추출물 제공



② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(경북대학교) :

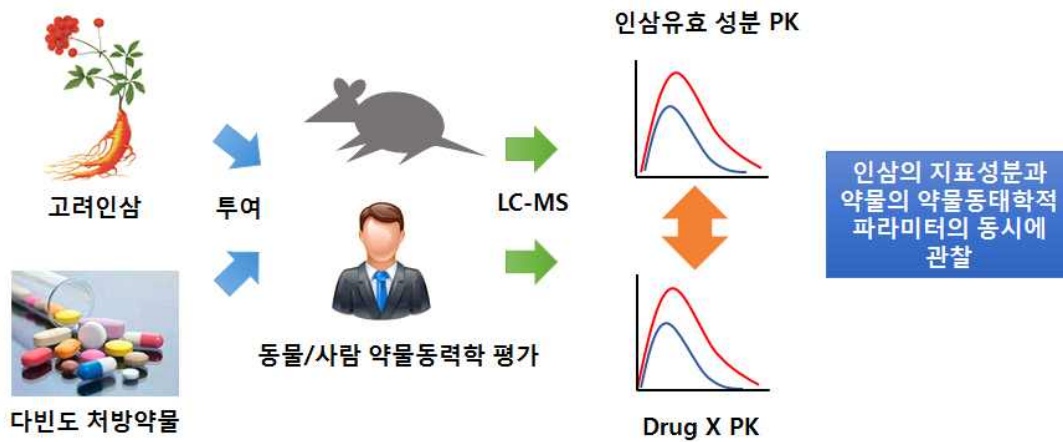
(1) 랫드/마우스에서 홍삼-약물상호작용 평가

a. 다빈도 병용 투여 의약품과 고려인삼과의 상호작용 평가

- 많이 판매된 질환관련 약물 선정 - Cyclosporin A, methotrexate 등의 면역억제제 및 sildenafil 등의 PDE5 억제제, 당뇨병치료제, warfarin, MAO 억제제, 고혈압치료제,

관절염 치료제, 간질환 치료제 등은 우선 적용함

- 단회 투여 후 상호작용 뿐만 아니라 반복투여 후 약물상호작용에 대해서도 동시에 평가함
- Ginsenoside 등 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 지표성분도 함께 분석하여 약동학 특성 평가 및 상호작용 유도시 혈 중 농도에 대한 정보도 함께 고려함



b. 질환 모델에서의 다빈도 병용 투여 의약품과 고려인삼과의 상호작용 평가

- 상호작용이 유의적으로 나타난 질환모델에서 기 선정된 의약품과 고려인삼을 반복투여 한 후 약물상호작용 평가, 2차년도에 우선적으로 확립한 당뇨모델, MCD 식이 유도 지방간 모델, 아세트아미노펜 유도 급성간독성 모델 등을 활용함
- 해당 의약품의 농도와 Ginsenoside 등 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 지표성분도 함께 분석하여 약동학 특성 평가 및 상호작용 유도시 혈중 농도에 대한 정보도 함께 고려함
- 질환모델에서의 생화학적 또는 efficacy biomarker 등도 함께 분석하여 약효에서의 상호작용도 함께 평가함
- 약동학 특성과 약력학 특성을 함께 산출하여 PK/PD correlation을 확인함
- 인삼과의 병용투여 및 상호작용이 알려진 관절염치료제 (methotrexate, sulfasalazine 등), 당뇨병 치료제 (metformin, repaglinide, DPPIV 억제제), 고혈압치료제 (valsartan 등), 이뇨제 (furosemide 등), 항혈전제 (warfarin, aspirin 등), MAO inhibitor 등의 약물군에서 in vitro 상호작용 결과를 고려하여 선정함

c. 홍삼추출물의 CYP2D, 3A기질 약물과의 상호작용 평가

- 2차년도 과제에서 규명된 반복투여 된 홍삼추출물의 CYP2D 억제능 및 CYP3A활성화에 따른 약물상호작용 평가
- 다빈도 처방 의약품 중 CYP2D, 3A의 기질인 약물 각 1종씩을 선택하여, 홍삼추출물의 4주간 반복투여 시 약물상호작용을 예측함
- 연구팀에서 기 개발된 대사효소와 수송활성 평가를 위한 'In vivo cocktail' 의 보완

및 저용량의 cocktail substrate를 투여하여 약물의 대사효소와 수송활성의 변화를 평가함

- d. 수삼, 백삼, 홍삼 추출물 또는 인삼의 활성물질(Ginsenoside)의 약물대사 활성 및 수송활성 유도능에 대한 in vivo rat PK 평가
- 잘 알려진 CYP 대사효소 및 약물수송체의 기질과 ginsenoside의 in vivo rat PK 상호작용 연구
 - 유도능 평가를 위하여 2주간 반복투여 후 상호작용을 평가할 예정임
 - 향후 수행할 임상 1상 시험과의 연계성을 위하여 기 개발된 ‘Inje cocktail’의 기질을 우선 고려하며, in vitro 실험결과에서 유의적인 저해성을 보이는 대사효소에 대한 기질을 우선적으로 고려하여 저용량의 cocktail substrate를 투여하여 약물의 대사효소와 수송활성의 변화를 동시에 평가함
 - Ginsenoside 지표성분도 함께 분석하여 약동학 특성 평가 및 상호작용 유도시 혈 중 농도에 대한 정보도 함께 고려할 계획임

- 공동연구 : 고려인삼 상호작용 평가 제 1상 임상시험 수행 - 다빈도 병용투여 의약품과 고려인삼의 약동/약력학적 상호작용 평가

(1) 임상시험 디자인 확립

- 다빈도 병용투여 의약품과 홍삼의 약동/약력학적 상호작용을 평가하기 위하여 제 1상 임상시험 수행
- 고려인삼과 약물 선정
 - ▷ 고려인삼 선정
 - ▷ 다빈도 병용투여 의약품 선정
 - : 당뇨병치료제, 고혈압치료제, 이상지질혈증 치료제 등을 선 고려
 - : 현재 만성질환 치료제들이 복합제로 처방되는 경우가 많으므로 홍삼추출물과 복합제와의 상호작용을 평가할 예정임

(2) 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 작성

- 대상자 수 산출
- 대상자 선정·제외 기준 확립
- 채혈시점, 횟수, 채혈량 등 채혈방법에 관한 문헌고찰 및 확립
- 채뇨방법 탐색 및 확립
- 검체처리 방법 조사 및 확립

(3) 경북대병원 임상시험심사위원회(IRB) 심의

- 연구계획서 및 CRF 등 IRB 제출서류 filing
- IRB 심의 및 승인 득함

(4) 대상자 모집 및 스크리닝 검사 시행

- 대상자 모집 공고
- 대상자 서면동의 후 스크리닝
- 선정·제외기준에 적합한 대상자 최종선정

(5) 임상시험 진행 및 임상시료(혈장, 뇨) 확보

- 첫 투여 전 혈장 및 뇨 시료 확보 후 홍삼 반복투여 시작
- 1, 2기 마지막 투여일 전날 저녁 8시경에 경북대병원 임상시험센터에 입원하여 퇴원할때까지 식이 및 활동 등을 조절하도록 함
- 입원 다음 날 오전 투여 전에 대상자 전원에게 팔 또는 손등의 정맥부위에 iv catheter 거치
- 오전 8시경 대상자 모두에게 홍삼 또는 홍삼+다빈도 병용투여 의약품을 투여하고 계획된 시점에 혈장 및 뇨 시료 채취



- 혈액은 혈구분리용 원심분리관에 넣고 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 즉시 혈장 분리관을 사용하여 혈장을 취함
- 혈액시료는 분석 시까지 -70℃에서 보관함

(6) 약동/약력학 분석 및 약물상호작용 평가, 안전성 평가

- 홍삼 및 약물 농도 측정을 위한 혈장 및 뇨 시료를 주관연구기관에 제공
- 측정된 약물농도를 이용하여 AUC, C_{max} 등의 주요 약동학 파라미터를 산출함
- 병용투여 의약품의 해당 약력학 파라미터를 측정 또는 산출하여 치료군간 비교 평가
- 보고된 이상반응 등을 통한 안전성 평가
- 임상시험 종료보고 및 결과보고서 작성

- 협력연구 (풍기인삼 영농협동조합) :

- (1) Ginseng Radix (고려인삼) 6년근 뿌리 원료 제공
- (2) 시험에 사용될 원료는 수삼, 백삼, 홍삼추출액 및 분말의 형태로 제공함

(3) 원료 내에서 지표물질인 사포닌 함량을 평가하여 시약의 품질 관리

- 국제공동연구1 (미국 시카고대)

- 미국 시카고대 Ben May Department for Cancer Research의 Dr. Yingming Zhao와의 MOU를 통해 구체적 국제공동연구 수행
- Ginsenoside의 전립선암세포에서의 활성을 평가하고 프로테오믹스 기반의 약리기전에 대한 국제공동 연구 진행
- 고려인삼 제제 또는 활성성분이 ginsenoside를 전립선 암세포 등에 처리하고, 세포 활성 조절능을 규명하기 위해 세포 단백질을 추출함
- 추출된 단백질 시료로부터 Mass spectrometry 기반의 프로테오믹스 및 post-translational modification을 분석하여 major cell pathway를 분석하고, 이로부터 post-translational modification의 dynamic analysis를 통하여 고려인삼 제제 또는 활성 성분이 ginsenoside를 전립선 암세포내에서의 약리활성 기전 및 치료효과를 확인할 예정임

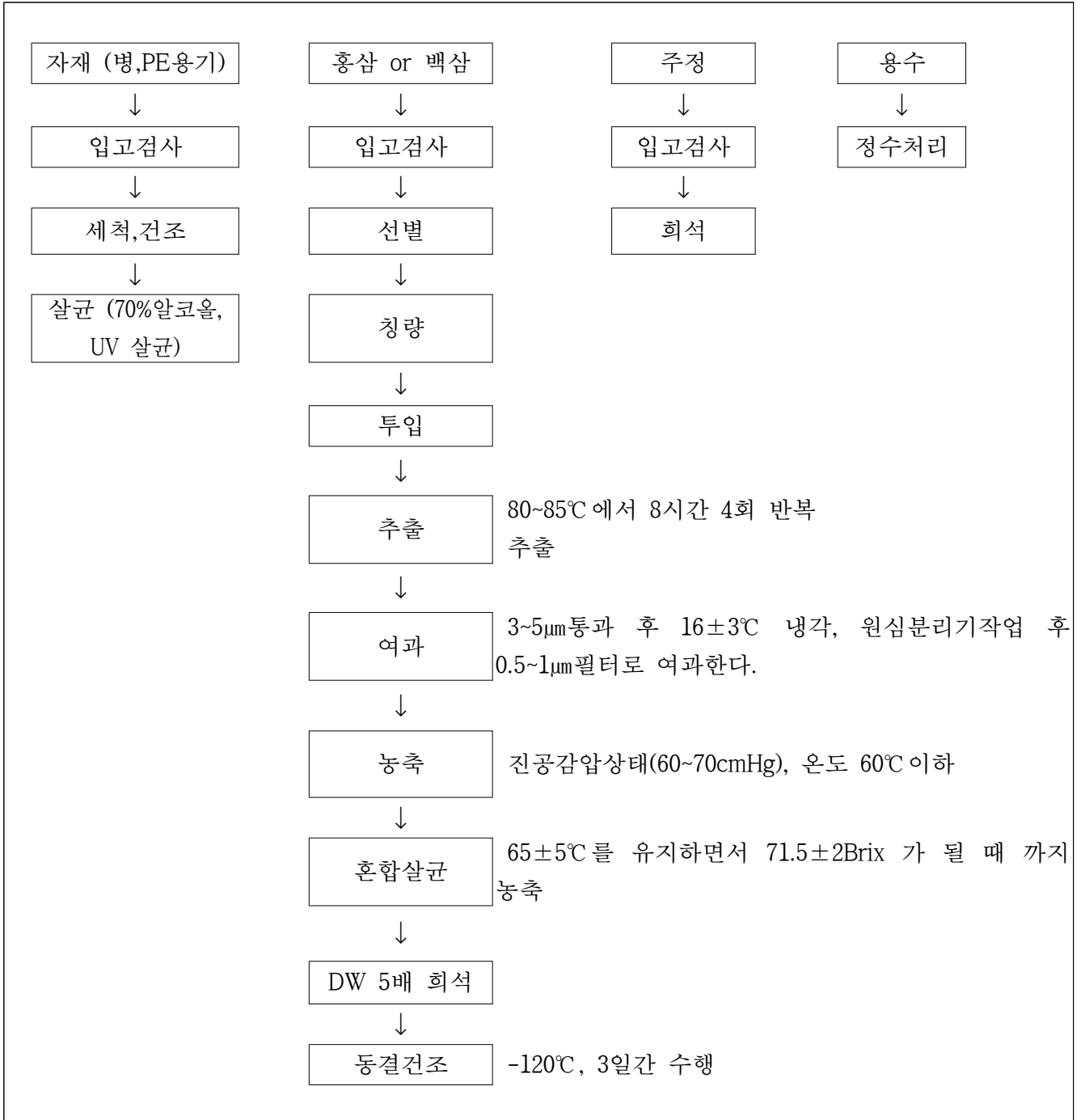
- 국제공동연구2 (중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd)

- 중국 항저우 Jingjie PTM BioLab Co. Ltd의 Dr. Cheng Zhongyi와 MOU를 통해 국제공동연구 수행
- 고려인삼 제제 또는 활성성분이 ginsenoside를 간세포 및 간암세포 등에 처리하고, 세포 활성 조절능을 규명하기 위한 프로테오믹 분석결과를 bioinformatics 분석을 진행하여 고려인삼에 의해 변화되는 생체 내 정보를 해석하여 새로운 생리기능을 탐색하고 평가할 예정임

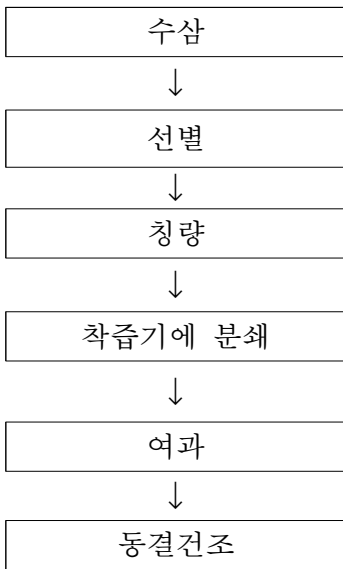
2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 고려인삼 추출물 제조 및 품질관리

(1) 홍삼, 백삼 추출물 제조 공정



(2) 수삼 추출물 제조 공정

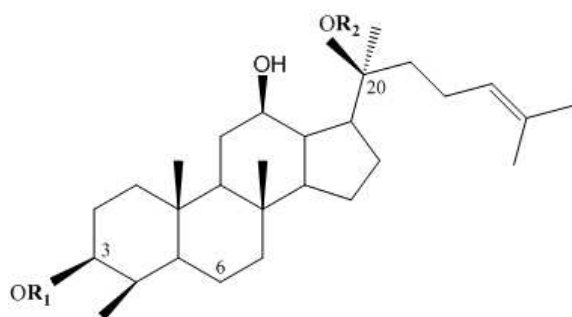


(3) 고려인삼 추출물의 지표성분인 ginsenoside 분석

(가) Ginsenoside 분석법 확립

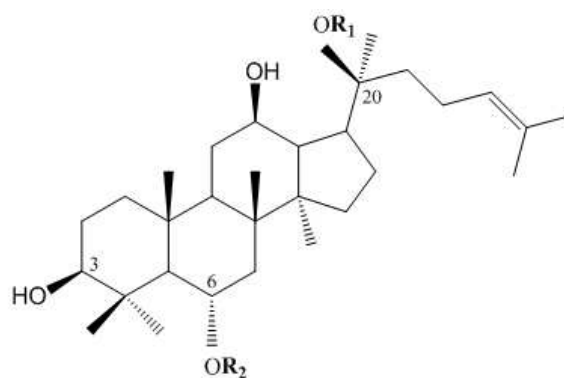
- LC-MS/MS를 이용하여 고려인삼 제제 중 ginsenoside 농도를 분석할 수 있는 분석법을 확립하였으며 확립된 방법을 이용하여 추출물 중 15종 ginsenoside 함량을 분석함
- 분석대상 ginsenoside 15종

Ginsenoside	
	Rb1
	Rb2
	Rc
	Rd
Panaxadiol 계열	Rh2
	Rg3
	F2
	Compound K
20(s)-Protopanaxadiol	
	Re
	Rf
Panaxatriol 계열	Rh1
	Rg1
	F1
20(s)-Protopanaxatriol	



20(S)-protopanaxadiol

Ginsenoside (PPD)	R ₁ (C-3)	R ₂ (C-20)
Rb1	Glc(2→1)Glc	Glc(6→1)Glc
Rb2	Glc(2→1)Glc	Glc(6→1)Arap
Rc	Glc(2→1)Glc	Glc(6→1)Araf
Rd	Glc(2→1)Glc	Glc
Rh2	Glc	H
Rg3	Glc(2→1)Glc	H
F2	Glc	Glc
Compound K	H	Glc
PPD	H	H



20(S)-protopanaxatriol

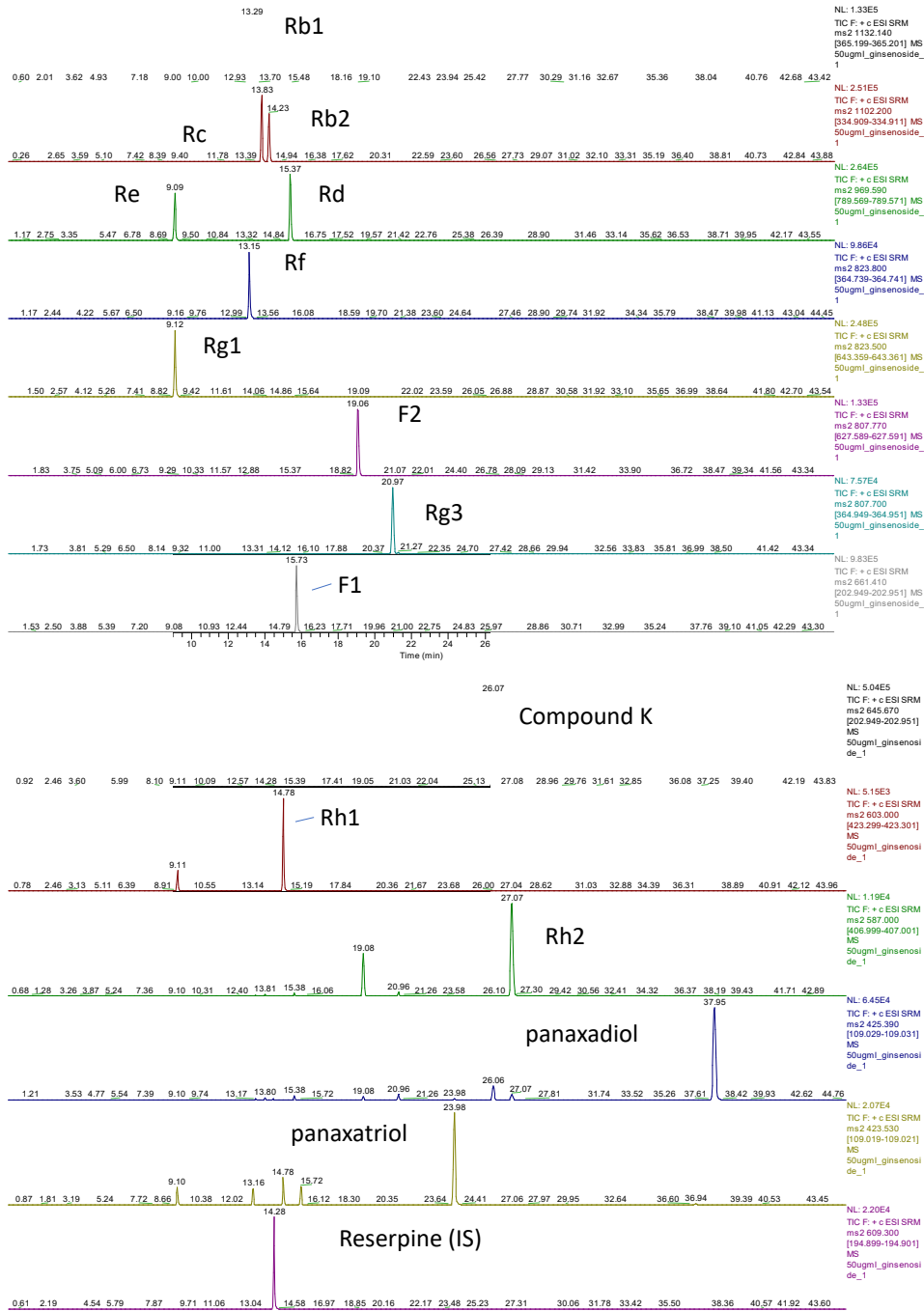
Ginsenoside (PPT)	R ₁ (C-20)	R ₂ (C-6)
Re	Glc	Glc(2→1)Rha
Rf	H	Glc(2→1)Glc
Rh1	H	Glc
Rg1	Glc	Glc(2→1)Xyl
F1	Glc	H
PPT	H	H

[Chemical structures of protopanaxadiol (PPD)-type ginsenosides and protopanaxatriol (PPT)-type ginsenosides]

- 분석조건

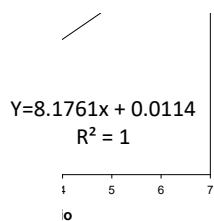
UFLC	Ultra Fast Liquid Chromatograph(Shimadzu, Kyoto, Japan)																																																																																						
Triple quadrupole MS	TSQ vantage(Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)																																																																																						
Analytical column	Shim-pack GIS(3 μ m ODS, 150 mm \times 3 mm) (Shimadzu, Kyoto, Japan)																																																																																						
Mobile phase	Solvent A : 5 mM ammonium formate (pH 4)																																																																																						
	Solvent B : 100% acetonitrile																																																																																						
	Gradient condition																																																																																						
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>0</th> <th>1</th> <th>39</th> <th>40</th> <th>40.1</th> <th>45</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>75</td> <td>75</td> <td>5</td> <td>5</td> <td>75</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td>20</td> <td>20</td> <td>95</td> <td>95</td> <td>20</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	0	1	39	40	40.1	45	A	75	75	5	5	75	75	B	20	20	95	95	20	20																																																																	
Time (min)	0	1	39	40	40.1	45																																																																																	
A	75	75	5	5	75	75																																																																																	
B	20	20	95	95	20	20																																																																																	
Flow rate	0.5 mL/min																																																																																						
Column oven temperature	30 $^{\circ}$ C																																																																																						
Auto sampler temperature	4 $^{\circ}$ C																																																																																						
Injection volume	10 μ L																																																																																						
Ionization mode	Electrospray ionization with positive ion mode																																																																																						
Vaporizer temperature	300 $^{\circ}$ C																																																																																						
Spray Voltage	4,000 V																																																																																						
Aux gas pressure	10 psi																																																																																						
Quantification	Selected reaction monitoring (SRM) mode [1]																																																																																						
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Analytes</th> <th>Q1</th> <th>Q3</th> <th>CE</th> <th>Polarity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Rb1</td> <td>1132.1</td> <td>365.2</td> <td>52</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rb2</td> <td>1102.2</td> <td>334.9</td> <td>60</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rc</td> <td>1102.2</td> <td>334.9</td> <td>60</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rd</td> <td>969.6</td> <td>789.6</td> <td>50</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Re</td> <td>969.6</td> <td>789.6</td> <td>50</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rf</td> <td>823.8</td> <td>364.7</td> <td>52</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rh1</td> <td>603.0</td> <td>423.3</td> <td>15</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rh2</td> <td>587.0</td> <td>407.0</td> <td>15</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rg1</td> <td>823.5</td> <td>643.4</td> <td>40</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rg3</td> <td>807.7</td> <td>365.0</td> <td>60</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>F1</td> <td>661.4</td> <td>203.0</td> <td>40</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>F2</td> <td>807.8</td> <td>627.6</td> <td>40</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Compound K</td> <td>645.7</td> <td>203.0</td> <td>40</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Panaxadiol</td> <td>425.4</td> <td>109.0</td> <td>30</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Panaxatriol</td> <td>423.5</td> <td>109.0</td> <td>35</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Reserpine (IS)</td> <td>609.3</td> <td>194.9</td> <td>35</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>	Analytes	Q1	Q3	CE	Polarity	Rb1	1132.1	365.2	52	+	Rb2	1102.2	334.9	60	+	Rc	1102.2	334.9	60	+	Rd	969.6	789.6	50	+	Re	969.6	789.6	50	+	Rf	823.8	364.7	52	+	Rh1	603.0	423.3	15	+	Rh2	587.0	407.0	15	+	Rg1	823.5	643.4	40	+	Rg3	807.7	365.0	60	+	F1	661.4	203.0	40	+	F2	807.8	627.6	40	+	Compound K	645.7	203.0	40	+	Panaxadiol	425.4	109.0	30	+	Panaxatriol	423.5	109.0	35	+	Reserpine (IS)	609.3	194.9	35	+
	Analytes	Q1	Q3	CE	Polarity																																																																																		
	Rb1	1132.1	365.2	52	+																																																																																		
	Rb2	1102.2	334.9	60	+																																																																																		
	Rc	1102.2	334.9	60	+																																																																																		
	Rd	969.6	789.6	50	+																																																																																		
	Re	969.6	789.6	50	+																																																																																		
	Rf	823.8	364.7	52	+																																																																																		
	Rh1	603.0	423.3	15	+																																																																																		
	Rh2	587.0	407.0	15	+																																																																																		
	Rg1	823.5	643.4	40	+																																																																																		
	Rg3	807.7	365.0	60	+																																																																																		
	F1	661.4	203.0	40	+																																																																																		
	F2	807.8	627.6	40	+																																																																																		
	Compound K	645.7	203.0	40	+																																																																																		
	Panaxadiol	425.4	109.0	30	+																																																																																		
Panaxatriol	423.5	109.0	35	+																																																																																			
Reserpine (IS)	609.3	194.9	35	+																																																																																			

- MRM Chromatography

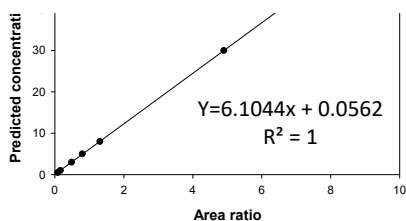


- Calibration curve

Rb1



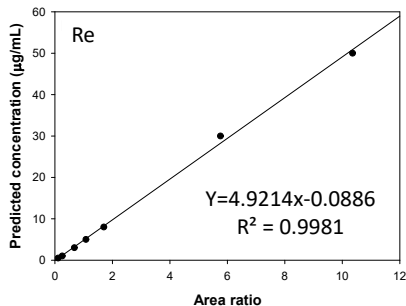
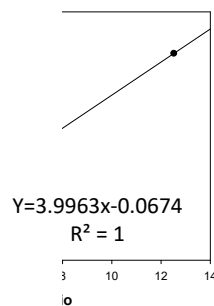
Rb2



Rc

$Y=4.3338x-0.0492$
 $R^2 = 1$

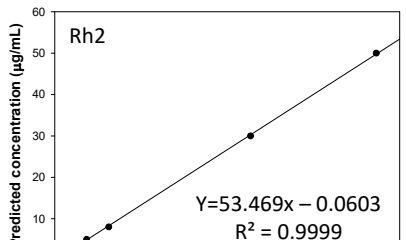
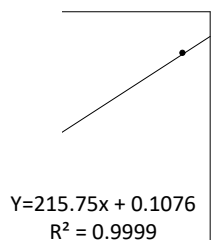
Rd



Rf

$Y=10.638x - 2.0715$
 $R^2 = 0.9953$

Rh1



Rg1

$Y=3.4922x + 0.0102$
 $R^2 = 0.9987$

Rg3

$Y=3.9963x - 0.0674$
 $R^2 = 1$

F1

$Y=1.0945x + 0.0709$
 $R^2 = 1$

F2

$Y=5.6794x - 0.1809$
 $R^2 = 0.9995$

Compound K

$Y=1.3427x + 0.0591$
 $R^2 = 1$

Panaxadiol

$Y=8.423x + 0.2407$
 $R^2 = 0.9999$

Panaxatriol

$Y=36.681x + 0.1534$
 $R^2 = 0.9999$

- Validation

Validation of the method for the LC-MS/MS determination of ginsenosides.

Ginsenosides	Calibration curve equation	Correlation coefficient	Range (µg/mL)	Recovery % (RSD%)		
				5 µg/mL	30 µg/mL	50 µg/mL
Rb1	y=8.1761x + 0.0114	R ² = 1	0.5 - 50	4.9 ± 0.5	29.9 ± 1.6	50.1 ± 2.5
Rb2	y=6.1044x + 0.0562	R ² = 1	0.5 - 50	4.9 ± 0.2	30.0 ± 1.0	50.0 ± 1.0
Rc	y=4.3338x - 0.0492	R ² = 1	0.5 - 50	5.0 ± 0.2	30.1 ± 1.1	49.9 ± 1.2
Rd	y=3.9963x - 0.0674	R ² = 1	0.5 - 50	5.1 ± 0.4	30.1 ± 0.8	49.9 ± 0.9
Re	y=4.9214x - 0.0886	R ² = 0.9981	0.5 - 50	5.2 ± 0.3	28.3 ± 2.37	50.9 ± 4.8
Rf	y=10.638x - 2.0715	R ² = 0.9953	1.0 - 50	5.7 ± 0.9	31.1 ± 2.2	48.8 ± 2.3
Rh1	y=215.75x + 0.1076	R ² = 0.9999	0.5 - 50	5.0 ± 0.3	30.4 ± 1.2	49.8 ± 2.6
Rh2	y=53.469x - 0.0603	R ² = 0.9999	0.5 - 50	4.9 ± 0.4	30.3 ± 1.3	49.8 ± 2.4
Rg1	y=3.4922x + 0.0102	R ² = 0.9987	0.5 - 50	5.2 ± 0.3	28.5 ± 2.3	50.8 ± 4.3
Rg3	y=3.9963x - 0.0674	R ² = 1	0.5 - 50	5.1 ± 0.4	30.1 ± 0.8	49.9 ± 0.9
F1	y=1.0945x + 0.0709	R ² = 1	0.5 - 50	4.9 ± 0.1	29.8 ± 0.8	50.1 ± 1.7
F2	y=5.6794x - 0.1809	R ² = 0.9995	0.5 - 50	5.8 ± 2.2	30.3 ± 4.6	49.8 ± 7.7
Compound K	y=1.3427x + 0.0591	R ² = 1	0.5 - 50	5.1 ± 0.6	29.9 ± 1.1	50.0 ± 1.5
Panaxadiol	y=8.423x + 0.2407	R ² = 0.9999	0.5 - 50	4.9 ± 0.2	29.8 ± 0.8	50.2 ± 0.8
Panaxatriol	y=36.681x + 0.1534	R ² = 0.9999	0.5 - 50	5.1 ± 0.5	29.8 ± 0.9	50.2 ± 1.3

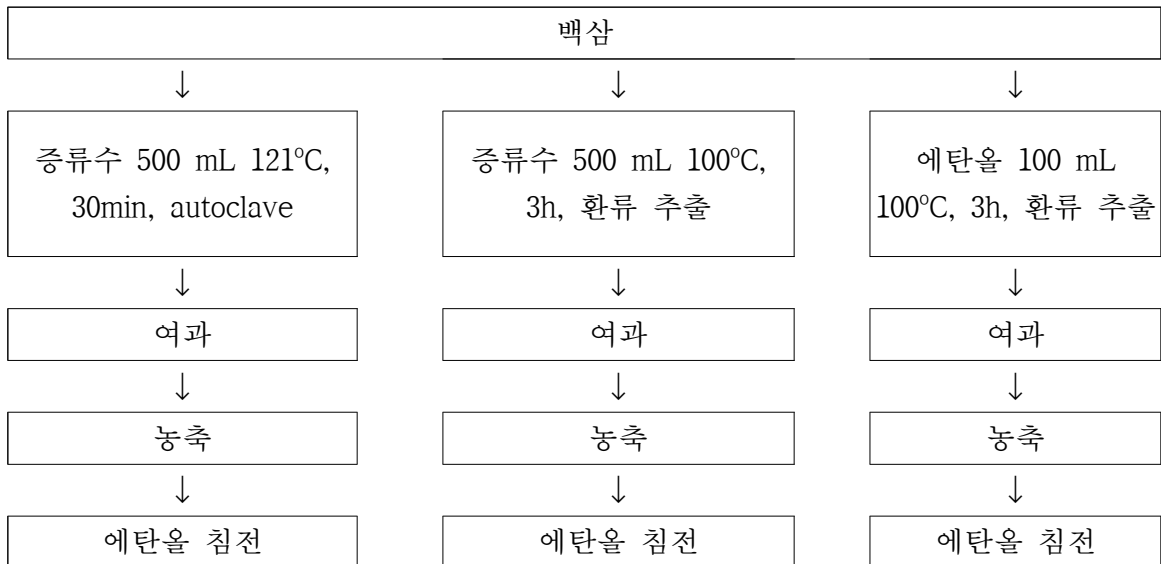
(나) 약물상호작용 평가에 사용된 수삼, 백삼, 홍삼추출물 내 ginsenoside 함량 분석

- 실험에 사용된 홍삼추출물에 함유된 ginsenoside를 정량하기 위해 15종의 ginsenoside의 MRM method와 LC-MS/MS 분석법을 구축함
- 추출물 50 mg/ml으로 methanol에 녹이고, 상층액 중의 ginsenoside를 정량함
- 추출물의 ginsenoside 함량은 비교한 대부분의 ginsenoside에서 백삼추출물이 가장 높았다. 백삼추출물의 Rb1+Rb2+Rg1의 함량은 13.1 mg/g이고, in vivo 평가 및 동물실험에 사용한 홍삼추출물의 Rb1+Rb2+Rg1의 함량은 8.6 mg/g, 임상시험에 사용한 홍삼정올데이는 2.6 mg/g, 수삼추출물의 Rb1+Rb2+Rg1의 함량은 3.7 mg/g 이었다.

Ginsenosides		Ginsenosides ($\mu\text{g/g}$)		
		수삼추출물	홍삼추출물	백삼추출물
Panaxadiol	Rb1	1353.2 \pm 106.5	5443.8 \pm 208.9	5724.5 \pm 38.2
	Rb2	652.3 \pm 18.9	1570.8 \pm 60.9	3696.9 \pm 64.8
	Rc	480.5 \pm 15.5	1126.6 \pm 36.9	2661.1 \pm 65.7
	Rd	126.0 \pm 5.3	1242.2 \pm 44.8	936.8 \pm 15.7
	Rh2	0	0	0
	Rg3	126.0 \pm 5.3	1242.2 \pm 44.8	936.8 \pm 15.7
	F2	0	0	0
	Compound K	0	0	0
	Protopanaxadiol	0	0	0
	Panaxatriol	Re	1492.1 \pm 74.8	1776.9 \pm 56.6
Rf		332.6 \pm 7.1	835.1 \pm 25.3	841.8 \pm 15.8
Rh1		20.5 \pm 2.9	911.4 \pm 28.0	168.5 \pm 8.2
Rg1		1737.1 \pm 87.3	1602.1 \pm 52.3	3716.6 \pm 66.6
F1		0	0	0
Protopanaxatriol		0	0	0

(4) 고사포닌 함유 백삼추출물 제조

(가) 제조과정



(나) 백삼 추출조건에 따른 추출 수율

- 물을 용매로 사용하는 것이 에탄올을 사용하는 것보다 추출물을 얻는 효율면에서 훨씬 우수한 것으로 판단됨
- 백삼 추출조건에 따른 추출 수율

wt (mg)/g ginseng dry wt	Auto-clave	Reflux in water	Reflux in EtOH
1차	422.6	481.1	79.0
2차	383.7	363.3	56.2
평균	403.1	425.2	67.6

Autoclave의 경우 121℃, 30분 가열하였으며, 환류추출의 경우 100, 또는 78℃에서 3시간 가열

(다) 에탄올 농도에 따른 수율 검토

- 물을 이용하여 3시간 환류추출한 시료에 대하여 20%의 에탄올 함량이 되도록 조제한 경우 함수에탄올가용성 분획의 수율이 백삼 1 g 당 337.8 mg으로 가장 높았음
- 백삼 추출물의 에탄올 조성비에 따른 함수에탄올 가용성 분획 수율

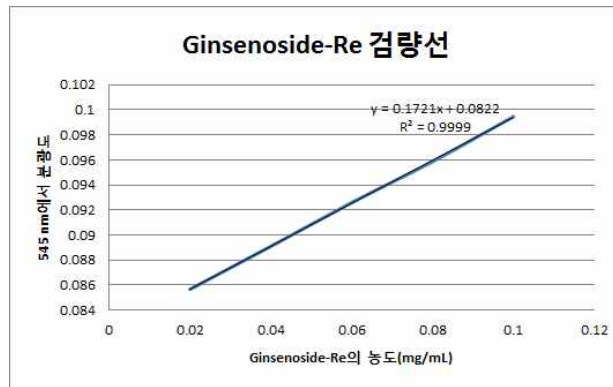
추출 조건		함수에탄올 가용성 분획의 무게 (mg/g dry wt ginseng)*		
추출 방법	에탄올 함량	1차	2차	평균
Auto-clave	20%	286.6(1,091.8)	312.7(397.0)	(299.7)
	40%	273.3(780.9)	285.9(272.3)	(279.6)
	60%	224.8(142.7)	280.2(177.9)	(252.5)
	80%	219.3(208.9)	248.2(78.8)	(233.8)
Reflux	20%	319.6(1,128.0)	356.1(418.9)	(337.8)
	40%	309.5(273.1)	287.6(253.7)	(298.5)
	60%	323.6(571.1)	299.7(176.3)	(311.6)
	80%	282.3(249.1)	255.7(75.2)	(269.0)

*괄호 안의 수치는 에탄올 침전 후 얻어진 상정액의 총 무게이며 괄호 앞의 수치는 인삼 건조중량 1 g당으로 환산 시의 무게

(라) 함수에탄올 가용성 분획의 사포닌 정량

① 검량선 작성 및 validation :

- Ginsenoside Re를 표준품으로 상기한 방법에 따라 비색정량을 실시한 다음 시료가 나타내는 흡광도와 농도와의 상관관계를 함수로 정량곡선을 작성하였다. 그 결과 0.02~0.10 mg/mL의 구간에서 매우 양호한 직선상의 상관관계를 나타내었으며 이 때 r^2 은 0.9999 이상임



- 3회의 독립적인 실험에서 3회 반복한 결과 사용한 농도와 흡광도간의 표준편차는 다음과 같았다.

농도와 흡광도간의 표준편차

mg/mL	average	STDEV
0.02	0.0856	0.0085
0.04	0.0890	0.0088
0.06	0.0926	0.0060
0.08	0.0959	0.0084
0.10	0.0995	0.0094

- 정밀도(precision) 및 정확도(accuracy)는 직선성의 범위를 나타내는 범위 중 0.02 mg/mL의 농도가 되도록 Ginsenoside-Re의 혼합표준용액을 제조하여, 하루에 실험을 3회 반복하여 일내(intra-day) 정밀도를 구하였고, 3일간 실험을 반복 시행하여 일간(inter-day) 정밀도를 구하였다. 정밀도는 측정값의 RSD(Relative standard deviation, %)로 계산하였으며, 정확도(accuracy)는 표준물질의 값에 대한 측정 평균값의 회수율로 계산 하였다. 9개 값의 평균값은 0.08761, 표준편차는 0.0003이다. 검출한계(lower limit of detection)값은 0.0059 mg/mL이고, 정량한계(lower limit of quantitation)값은 0.0199 mg/mL이다. 일내 RSD(Relative Standard Deviation)값은 0.33-0.48%, 일간 RSD 값은 0.23-0.52%였다. 또한 Ginsenoside-Re의 표준품의 회수율(Recovery)을 구한결과 0.02 mg/mL에서 99.42-100.33%였다.

일내 및 일간 LOD, LOQ, 정확도, 정밀도

Number	1	2	3	Average	STDEV
Day1	0.0875	0.0877	0.0883	0.0878	0.0004
Day2	0.0871	0.0875	0.0877	0.0874	0.0003
Day3	0.0874	0.0879	0.0874	0.0876	0.0003
Average	0.0873	0.0877	0.0878		
STDEV	0.0002	0.0002	0.0005		

0.02 mg/mL Ginsenoside-Re를 3일간, 3반복 했을 때 나온 분광도의 평균값과 표준편차

- 이상의 validation data는 아래에 정리하였다.

Validation data 요약

Parameters	Ginsenoside-Re
Linearity	
Range (mg/mL)	0.02-0.10
Correlation coefficient (R^2)	0.9999
Equation	
Intercept	0.0822
Slope	0.1721
Precision	
Intra-day (%)	0.33-0.48
Inter-day (%)	0.23-0.52
Accuracy	
Intra-day (%)	99.80-100.25
Inter-day (%)	99.68-100.22
Lower limit of quantitation (mg/mL)	0.0199
Lower limit of detection (mg/mL)	0.0059

② 합수에탄올 가용성 분획의 사포닌 정량

- 위에서 얻은 합수에탄올 가용성 분획 중 총 사포닌 함량을 정량하였다. 위에서 기술한 방법에 준하여 시료를 분석할 경우, 검량선의 범위에 들어오지 않으므로 각 시료는 적당한 농도로 희석하여 분석한 후, 희석배수를 고려하여 최종적으로 함량을 분석하였다.

백삼 건조추출물 당 총 사포닌 함량-1,2차 평균

추출 조건		사포닌함량	
추출 방법	에탄올 비율	mg/g extract	mg/g dry wt ginseng
Auto-clave	0%	7.66±0.23	3.06±0.09
	20%	12.89±0.62	3.89±0.18
	40%	10.51±0.34	5.89±0.10
	60%	17.31±0.57	4.42±0.16
	80%	35.00±0.94	8.20±0.23
Reflux	0%	39.30±0.70	16.83±0.66
	20%	58.26±1.62	19.68±0.57
	40%	30.59±1.37	9.07±0.39
	60%	80.33±3.01	25.07±0.91
	80%	175.67±3.37	53.69±1.07
	100%	73.4±4.01	4.89±0.25

- 추출물 중 사포닌의 함량은 물을 이용하여 3시간 환류추출한 시료에 대하여 80%의 에탄올 함량이 되도록 조제한 경우가 총사포닌 함량이 백삼 1 g 당 약 53 mg으로 가장 높아 백삼으로부터 사포닌 고함량분획을 조제하는 방법으로 가장 적합함
- 추출효율이 가장 좋았던 물용매 환류추출 및 60%에탄올 처리의 경우 총 가용성화합물은 323.6 mg/g dry wt ginseng이었고, 이 중 총사포닌의 함량은 26.93 mg/g dry wt ginseng이었으므로 함수에탄올가용성 분획 중에는 사포닌 함량이 8.3%로 계산할 수 있으며, 80% 에탄올 처리의 경우 총 가용성화합물의 양은 282.3 mg/g dry wt ginseng, 총사포닌의 양은 46.25 mg/g dry wt ginseng이므로 16.4%로 계산될 수 있으므로 함수에탄올가용성분획 중의 함량 역시 80% 에탄올을 이용하는 경우가 약 2배정도 효율이 우수함

③ 에탄올 침전 시료 중 진세노사이드 함량 분석

- Ginsenoside 표준품으로 상기한 방법에 따라 정량을 실시하고 백삼 g 당 ginsenoside 함량 (환산은 위의 백삼 진세노사이드 정량 실험 내 extract/dry wt ginseng을 참고함)을 1, 2차 평균으로 나타냄

Ginsenoside ($\mu\text{g/g}$ dry wt ginseng)						
	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6
Rb1	1151.4 \pm 14.9	797.0 \pm 21.9	1052.2 \pm 45.7	1171.2 \pm 6.9	1103.9 \pm 11.3	1628.5 \pm 44.5
Rb2	385.8 \pm 12.5	272.1 \pm 7.1	464.3 \pm 10.4	470.7 \pm 11.5	522.5 \pm 11.0	565.2 \pm 4.9
Rc	280.8 \pm 4.1	210.6 \pm 3.9	304.0 \pm 8.0	304.4 \pm 4.4	311.2 \pm 4.4	385.0 \pm 8.0
Rd	45.9 \pm 2.2	31.8 \pm 1.1	49.0 \pm 1.6	51.1 \pm 1.0	54.5 \pm 0.8	66.1 \pm 1.1
Rg3	35.2 \pm 2.3	19.7 \pm 1.5	46.3 \pm 1.8	69.2 \pm 5.0	106.9 \pm 3.4	28.5 \pm 0.9
Rh2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Compound K	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Panaxadiol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Re	554.0 \pm 7.1	468.2 \pm 8.8	502.1 \pm 14.1	505.2 \pm 11.0	458.0 \pm 6.2	613.4 \pm 7.3
Rf	379.7 \pm 4.5	329.0 \pm 8.1	345.4 \pm 13.2	348.6 \pm 4.1	343.5 \pm 7.6	352.9 \pm 10.2
Rh1	190.2 \pm 2.3	160.1 \pm 3.0	171.3 \pm 0.5	161.5 \pm 1.3	184.7 \pm 3.8	108.4 \pm 2.5
Rg1	2046.8 \pm 14.0	1785.3 \pm 19.7	1913.5 \pm 52.0	1886.0 \pm 12.7	1759.2 \pm 16.1	2634.9 \pm 30.9
F1	2.4 \pm 0.1	1.9 \pm 0.2	1.9	1.8 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1
Panaxatriol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
total	5072.2 \pm 26.0	4075.7 \pm 33.0	4849.9 \pm 73.1	4969.5 \pm 23.0	4846.2 \pm 25.5	6385.5 \pm 56.5

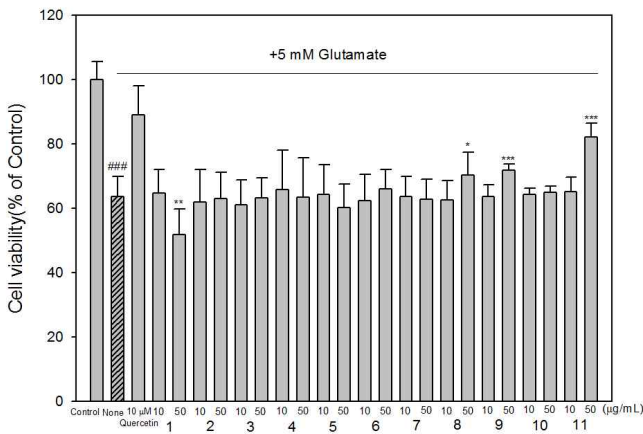
Ginsenoside ($\mu\text{g/g}$ dry wt ginseng)					
	# 7	# 8	# 9	# 10	# 11
Rb1	1326.7 \pm 30.2	1502.8 \pm 29.4	1567.8 \pm 102.9	1452.8 \pm 48.2	981.8 \pm 9.0
Rb2	488.2 \pm 7.2	574.2 \pm 12.8	632.4 \pm 5.8	613.0 \pm 7.2	427.2 \pm 4.4
Rc	340.6 \pm 6.7	373.7 \pm 7.2	410.0 \pm 6.3	380.2 \pm 6.5	300.9 \pm 3.3
Rd	52.0 \pm 1.5	64.2 \pm 1.9	65.7 \pm 0.8	65.2 \pm 2.4	49.2 \pm 0.7
Rg3	18.3 \pm 1.2	34.1 \pm 1.8	41.8 \pm 2.0	47.8 \pm 6.6	15.8 \pm 0.3
Rh2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Compound K	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Panaxadiol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Re	520.9 \pm 11.2	479.7 \pm 7.5	522.3 \pm 14.6	479.0 \pm 6.2	234.8 \pm 2.8
Rf	300.2 \pm 10.1	318.5 \pm 11.1	361.0 \pm 8.6	316.1 \pm 4.1	324.4 \pm 9.2
Rh1	85.3 \pm 3.0	86.0 \pm 1.5	94.4 \pm 2.8	84.0 \pm 0.7	15.3 \pm 0.4
Rgl	2233.7 \pm 42.8	2179.5 \pm 44.9	2414.9 \pm 29.8	2079.6 \pm 18.5	1649.3 \pm 27.2
F1	2.1 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	1.9	1.0
Panaxatriol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
total	5368.0 \pm 55.5	5614.7 \pm 57.3	6112.3 \pm 108.8	5519.6 \pm 53.5	3999.7 \pm 30.7

- 물을 이용하여 3시간 환류추출한 다음 여과지로 여액을 얻고 여기에 에탄올 농도를 80%로 해 준 경우가 사포닌 분획을 얻는 가장 좋은 방법으로 판단되었다. 이 방법을 이용할 경우 백삼 건조중량 1 g 당 약 53 mg의 조사포닌을 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 실험실 수준에 의한 것으로 앞으로 파일럿 스케일로 재실험 후 실제 산업현장에서 사용될 수 있는 공정을 확립하는 것이 필요할 것이며, 아울러 추가적으로 백삼의 양과 추출용액의 최적비율을 검토할 필요가 있을 것으로 생각됨.
- 한편 추출 및 침전 방법을 달리한 상기 총 11종의 시료에 대하여 LC-MS를 이용하여 주요 ginsenoside 15종의 함량을 분석해 본 결과, 추출물 g당 총 사포닌 함량은 에탄올로 환류추출한 경우가 압도적으로 높았으며, 백삼 g 당 총 사포닌의 경우는 비색정량과는 달리 물로 환류추출한 추출물이 가장 높았으며, 다음으로 이 추출물을 60% 에탄올로 침전 후 얻은 상등액이 높았다. 이 차이는 총 사포닌 중 15종 이외의 사포닌이 존재하거나, 또는 비색정량법의 한계로 인하여 사포닌 유사물질이 사포닌으로 정량되었을 수 있음을 의미함

(5) 고사포닌 함유 백삼추출물의 약효 평가

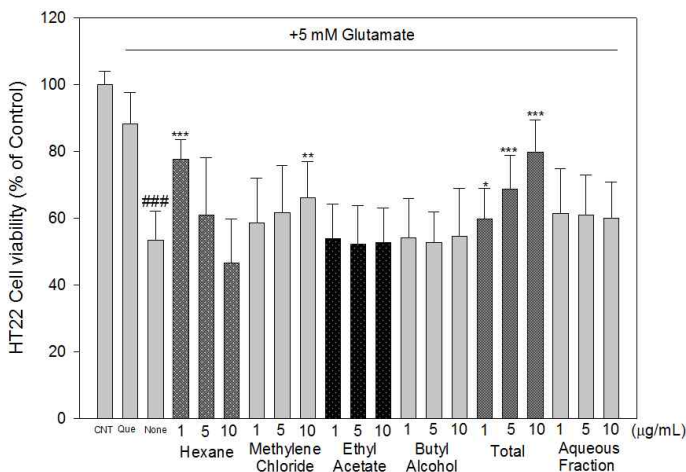
(가) 고사포닌 함유 백삼추출물의 뇌세포 보호활성 측정

- 백삼 추출물 시료 11종에 대하여 HT-22 세포에 대하여 보호활성을 비교함. 11번 시료를 50 ppm처리했을 때 세포 생존율을 가장 높게 회복하였다. 그 다음으로는 9번 시료를 50 ppm처리 하였을 때이다.



[The average cell survival rate. ###P < 0.001 compared to the control. *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 compared to 5 mM Glutamate-treated group.]

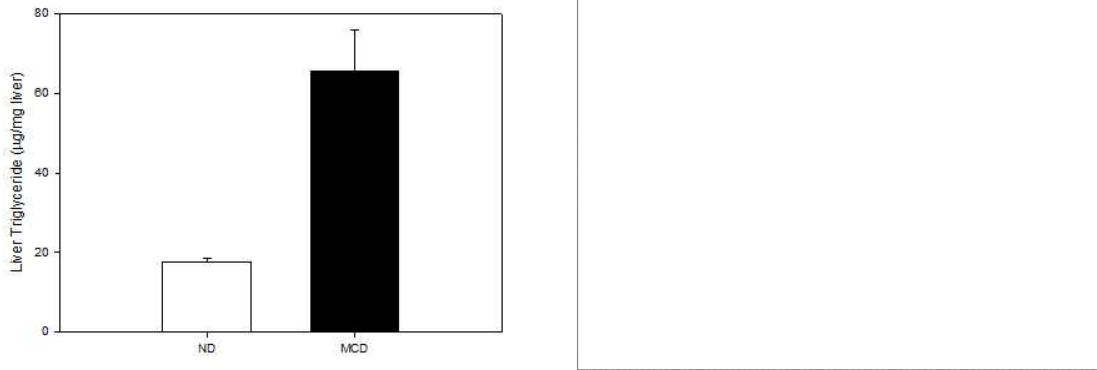
- 백삼의 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 분배추출하여 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol 및 수 가용성 분획을 얻고 이들에 대한 뇌세포 보호활성을 측정하여 보았다. 그 결과 1 ppm의 낮은 농도에서도 hexane 가용성 분획이 glutamate로 유도한 뇌세포 독성을 현저히 감소시켰다. 인삼의 뇌세포 보호활성 연구는 주로 사포닌에 집중되어 있어 hexane 가용성 분획에서 주목할만한 뇌세포 보호활성이 관측된 것은 매우 의미가 있음.



[The average cell survival rate. ###P < 0.001 compared to the control. *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 compared to 5 mM Glutamate-treated group.]

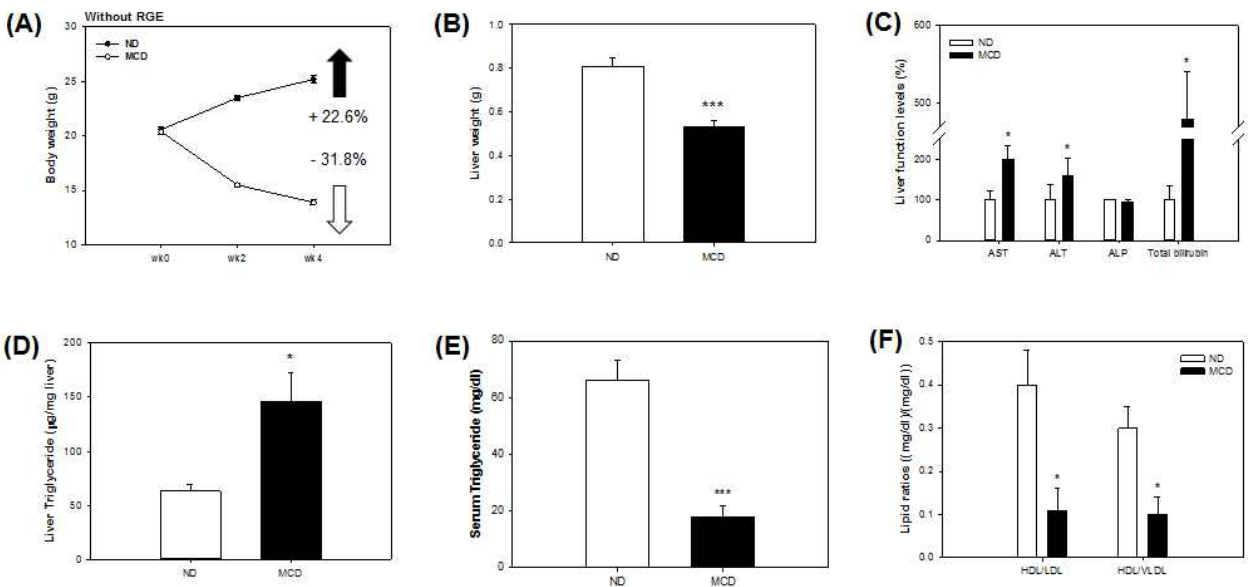
(나) 고사포닌 함유 백삼 추출물의 비알코올성 지방간 생성에 대한 효과 탐색

- 비알코올성 지방간 생성에 대한 백삼추출물의 독성 경감효과 탐색하기 위하여 MCD 식이모델은 선행연구를 통해 1~4주간 투여하여 비알코올성 지방간이 모델 생성을 위해 2주간 투여 모델 선정함



[비알코올성 지방간 모델 구축을 위해 MCD 2주 모델에서의 지방 내 중성지질 농도 (좌), MCD 모델에 백삼추출물 동시 투여 후 간 무게 변화 (우)]

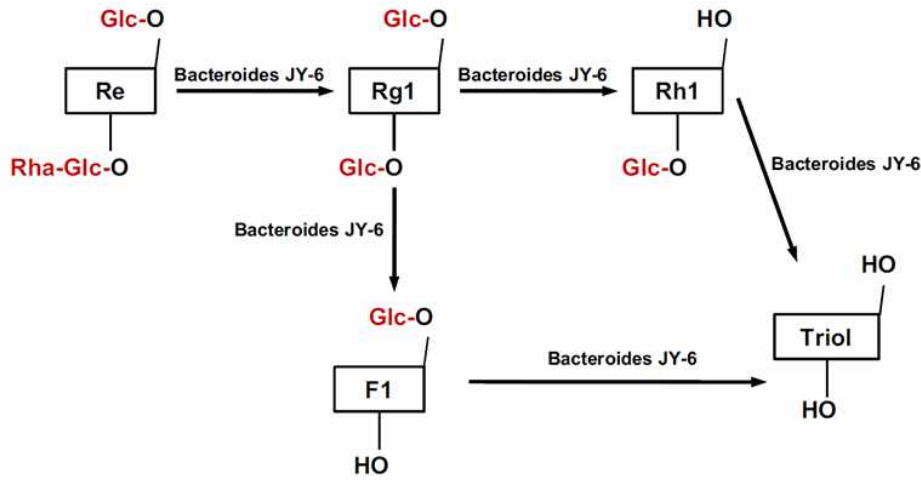
- 백삼추출물의 활성을 평가하기 위해 0.1, 0.25, 0.5 g/kg로 2주간 MCD 식이 기반 비알코올성 지방간 마우스에 동시 투여
- MCD 식이 모델에 백삼추출물을 동시 투여 후 몸무게, 간 무게, 간 내 중성지질, ALT, AST 독성 지표 평가를 통한 백삼추출물의 효능 탐색하였지만 뚜렷한 개선효과를 관찰하지 못함
- 백삼 추출물은 MCD 식이에 의해 유도되는 비알코올성 지방간을 생성에 유의하지 않는 것으로 추정됨



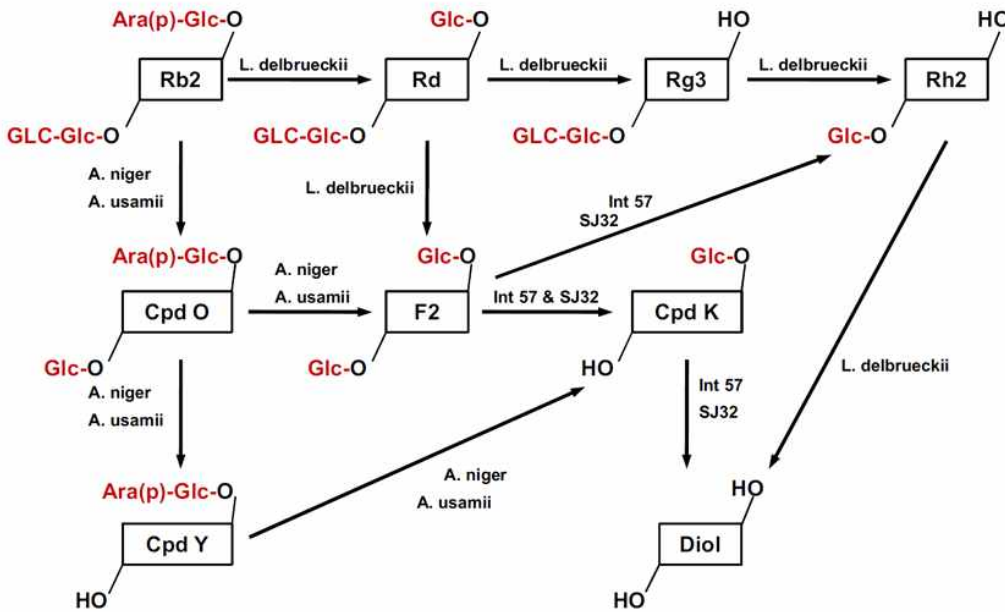
[MCD 식이 4주 투여 모델에서의 독성지표]

2-2. Ginsenoside 의 약동학 특성 평가

(1) Ginsenoside의 위장관내 대사과정 및 대사체



[Panaxadiol 계열 ginsenoside의 위장관내 대사경로 및 대사체]



[Panaxatriol 계열 ginsenoside의 위장관내 대사경로 및 대사체]

(2) 홍삼, 백삼, 수삼 추출물 1g/kg 용량을 단회 경구 투여하였을 경우 혈중 농도 비교

(가) 혈장 시료 중 ginsenoside 분석 (정량가능한 ginsenoside 확인)

- 수컷 흰쥐를 12시간이상 절식시킨 뒤 홍삼추출물 1g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도를 분석하였다.
- 공혈장에 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 표준시료를 spike 하여 표준시료의 피크를 확인한 뒤, 인삼추출물을 투여한

취에서 채취한 혈장 시료 중 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 피크를 공혈장 및 표준시료 피크와 비교한 결과, 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 4종 ginsenoside만 검출됨을 확인할 수 있었다.

- LC-MS/MS 분석조건

• LC Conditions

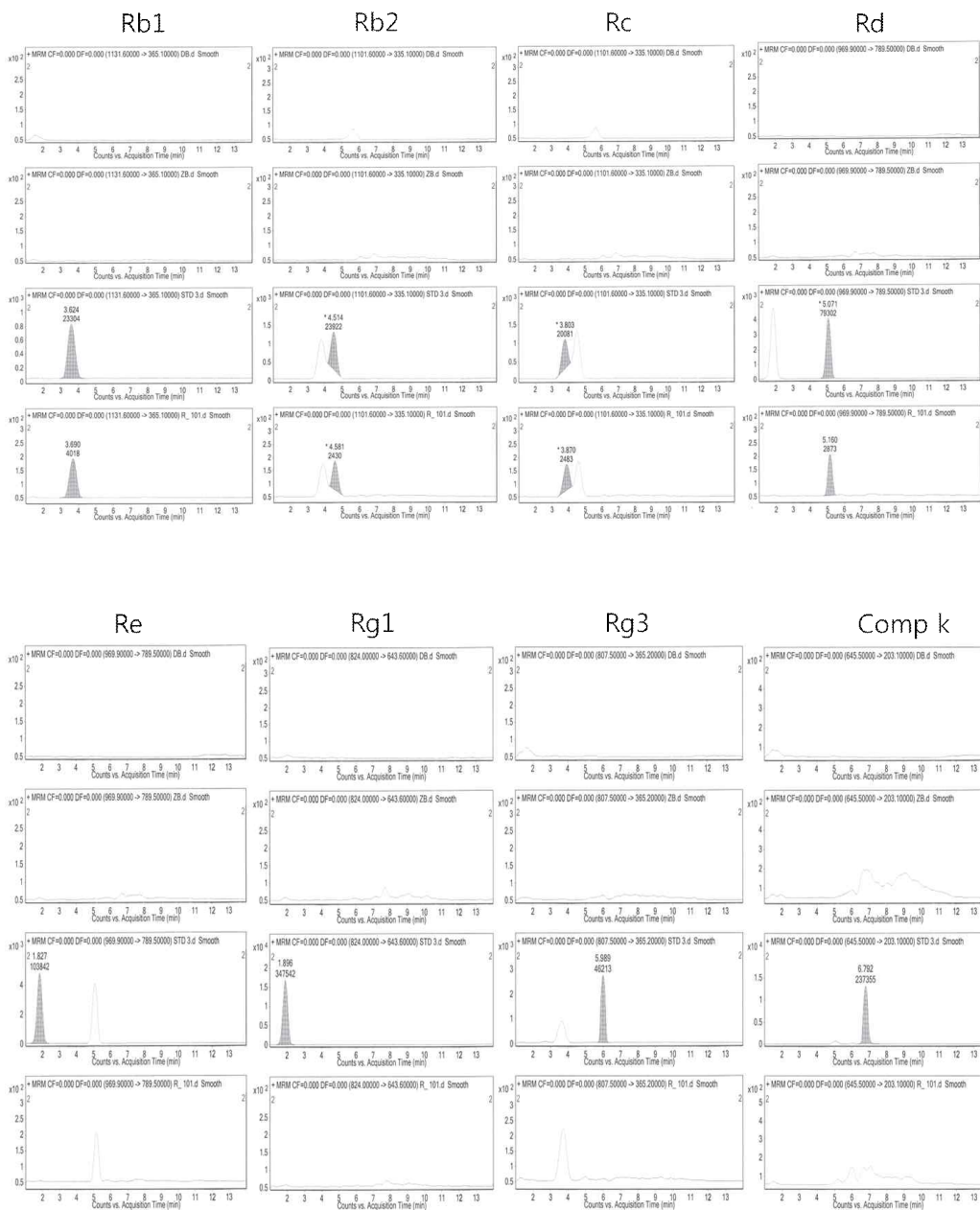
Instrument	Agilent Infinity 1260		
Analytical column	Synergi Hydro RP (2.5 mm, 2.0 mm i.d. x 100 mm, Phenomenex)		
Mobile phase	gradient elution of (A) 0.1% formic acid in DW and (B) 0.1% formic acid in methanol		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	30	70
	0.2	30	70
	1.0	10	90
	6.5	10	90
	7.0	30	70
	10.0	30	70
Flow rate	0.3 mL/min		
Column oven temperature	30 °C		
Auto sampler temperature	10 °C		
Injection volume	15 mL		
Run time	14 min		

• MS/MS Conditions

Instrument	Agilent 6470 Triple Quadrupole MS			
Ionization	Electrospray ionization with positive ion mode			
Gas temperature	300°C			
Gas flow	10 L/min			
Nebulizer	35 psi			
Capillary	4000 V			
Quantification	Multiple reaction monitoring (MRM) mode			
	Compound	Mass transition (<i>m/z</i>)	Retention time (min)	Collision energy (V)
	Rb1	1131.6→365.1	3.6	65
	Rb2	1101.6→335.1	4.5	60
	Rc	1101.6→335.1	3.8	60
	Rd	969.9→789.5	5.1	50
	Re	969.9→789.5	1.8	50
	Rf	823.5→365.1	2.7	55
	Rg1	824.0→643.6	1.9	40
	Rg3	807.5→365.2	6.0	60
	Rh1	661.5→203.1	3.2	40

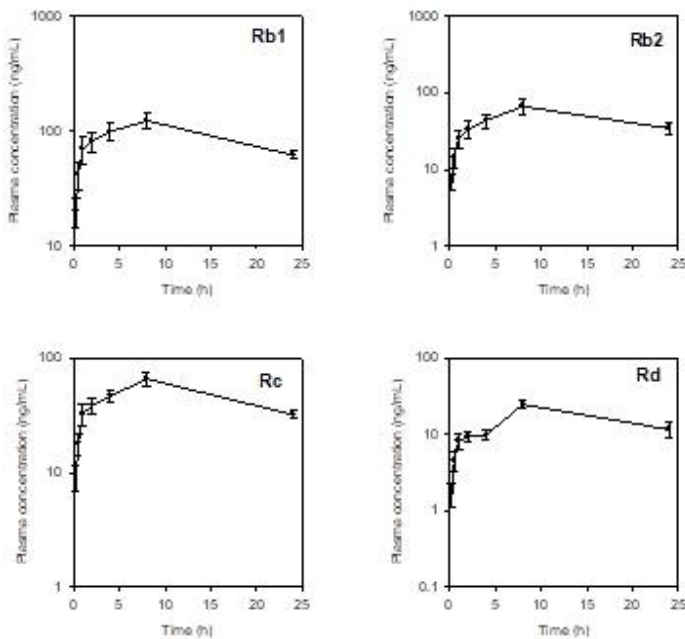
Rh2	645.5→645.5	6.9	45
F1	661.5→203.1	3.7	40
F2	807.5→627.5	6.1	40
Comp K	645.5→203.1	6.8	35
Diol	483.4→483.4	7.8	40
Triol	499.4→499.4	5.6	40
Berberine (IS)	336.1→320.0	3.8	30

- 분석 크로마토그램 (혈장)



(나) 홍삼추출물 1g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도

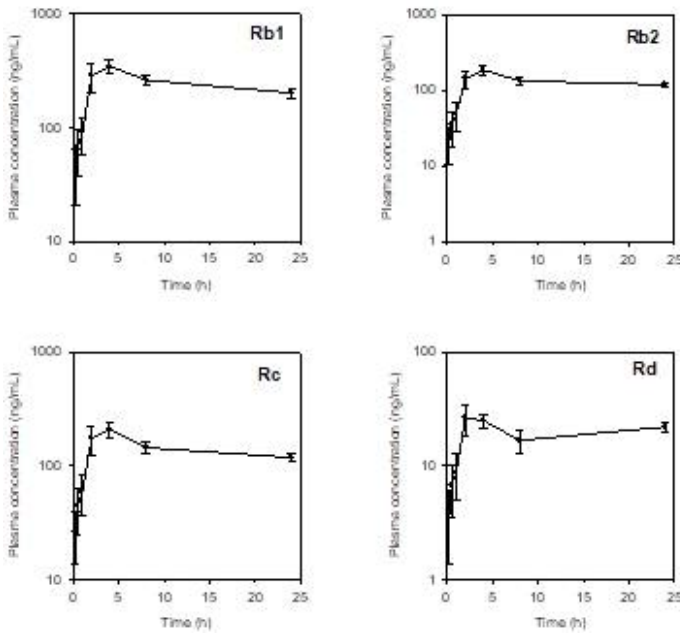
- 수컷 흰쥐를 12시간이상 절식시킨 뒤 홍삼추출물 1g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도를 분석하였다.
- 공혈장에 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 표준시료를 spike 하여 표준시료의 피크를 확인한 뒤, 인삼추출물을 투여한 쥐에서 채취한 혈장 시료 중 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 피크를 공혈장 및 표준시료 피크와 비교한 결과, 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 4종 ginsenoside만 검출됨을 확인할 수 있었다.
- 그러므로 각 추출물을 투여한 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd만 정량하였고, 아래 혈중 농도 결과와 약동학 파라미터를 산출하였다.



	Rb1	Rb2	Rc	Rd
Tmax (h)	8 ± 0	8 ± 0	8 ± 0	8 ± 0
Cmax (ng/mL)	123.25 ± 19.28	66.72 ± 16.07	65.21 ± 9.26	24.57 ± 2.62
AUC (ng × h/mL)	2223.33 ± 319.98	1152.8 ± 249.7	1137.19 ± 132.24	389.61 ± 45.7
MRT (h)	10.58 ± 0.23	11.09 ± 0.31	10.66 ± 0.32	11 ± 0.53

(다) 백삼추출물 1g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도

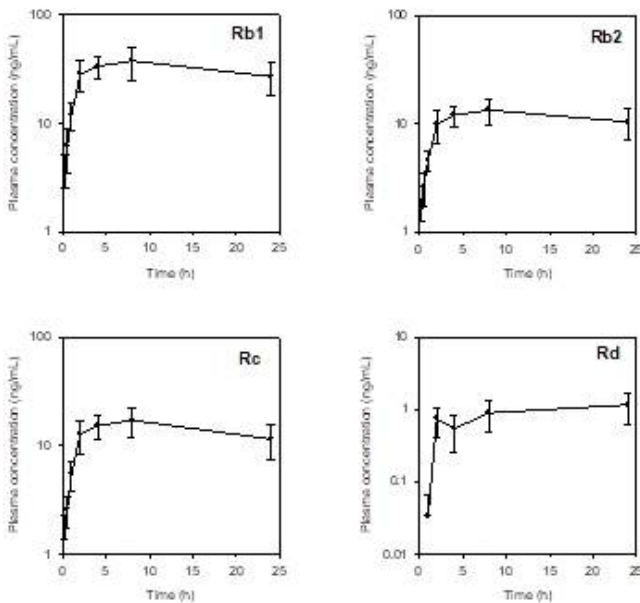
- 수컷 흰쥐를 12시간이상 절식시킨 뒤 백삼추출물 1g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도를 분석하였다.
- 공혈장에 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 표준시료를 spike 하여 표준시료의 피크를 확인한 뒤, 인삼추출물을 투여한 쥐에서 채취한 혈장 시료 중 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 피크를 공혈장 및 표준시료 피크와 비교한 결과, 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 4종 ginsenoside만 검출됨을 확인할 수 있었다.
- 그러므로 백삼 추출물을 투여한 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd만 정량하였고, 아래 혈중 농도 결과와 약동학 파라미터를 산출하였다.



	Rb1	Rb2	Rc	Rd
Tmax (h)	2.6 ± 0.6	3.4 ± 0.6	2.6 ± 0.6	3 ± 0.52
Cmax (ng/mL)	360.04 ± 54.79	189.1 ± 25.95	221.63 ± 32.16	34.55 ± 4.69
AUC (ng × h/mL)	5839.63 ± 577.72	3082.86 ± 315.82	3360.53 ± 351.33	470.08 ± 34.98
MRT (h)	11.27 ± 0.5	11.79 ± 0.55	11.29 ± 0.43	12.95 ± 0.9

(라) 수삼추출물 1g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도

- 수컷 흰쥐를 12시간이상 절식시킨 뒤 백삼추출물 1g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도를 분석하였다.
- 공혈장에 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 표준시료를 spike 하여 표준시료의 피크를 확인한 뒤, 인삼추출물을 투여한 쥐에서 채취한 혈장 시료 중 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 피크를 공혈장 및 표준시료 피크와 비교한 결과, 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 4종 ginsenoside만 검출됨을 확인할 수 있었다.
- 그러므로 백삼 추출물을 투여한 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd만 정량하였고, 아래 혈중 농도 결과와 약동학 파라미터를 산출하였다.



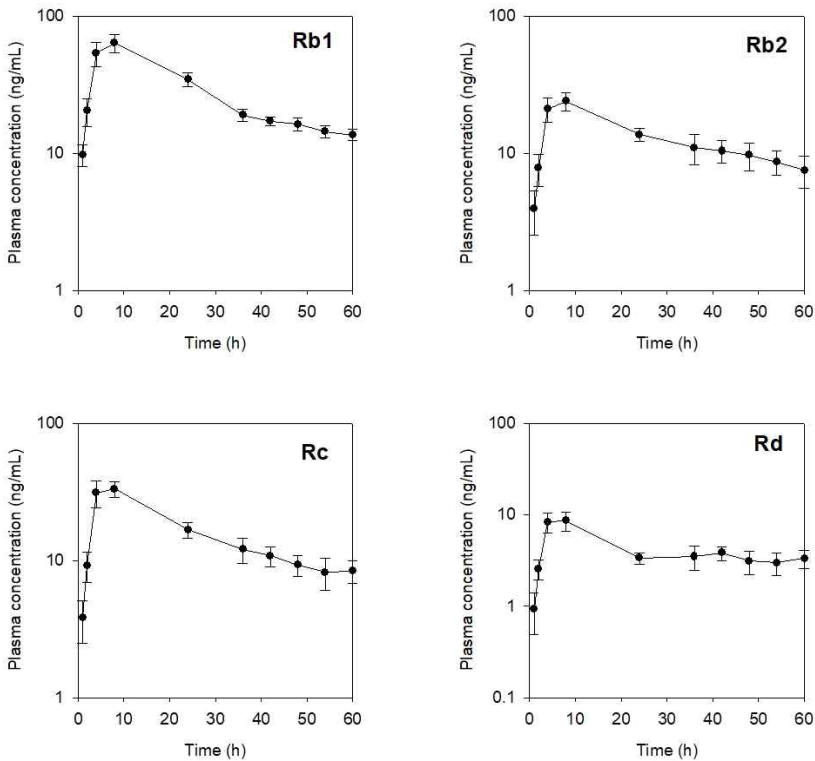
	Rb1	Rb2	Rc	Rd
Tmax (h)	5.6 ± 0.98	7.2 ± 0.8	6.4 ± 0.98	17.6 ± 3.92
Cmax (ng/mL)	39.2 ± 12.43	13.32 ± 3.61	17.74 ± 5.12	1.32 ± 0.5
AUC (ng×h/mL)	751.56 ± 236.66	271.61 ± 75.67	335.46 ± 103.44	19.93 ± 10.05
MRT (h)	11.56 ± 0.12	11.77 ± 0.24	11.24 ± 0.27	13.98 ± 1.67

- 추출물 중 ginsenoside의 함량이 높은 경우 혈중농도도 높게 나타나고, ginsenoside의 함량이 낮은 경우 혈중 농도도 낮게 나타났다. 결론적으로 사용한 백삼 추출물과 홍삼추출물에서는 모두 유의적으로 높은 농도의 Rb1, Rb2, Rc Rd 가 검출되었으므로, 향후의 in vivo 실험에서는 홍삼과 백삼 추출물을 병행하여 이용할 예정이다.

(2) 홍삼추출물 1.5 g/kg/day 용량으로 반복투여하였을 경우 혈중 농도 비교

(가) 홍삼추출물 1.5 g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도

- 수컷 흰쥐를 12시간이상 절식시킨 뒤 홍삼추출물 1.5 g/kg 단회 경구투여 후 ginsenoside의 혈중 농도를 분석하였다.
- 정확한 약동학 파라미터 산출을 위하여 60시간까지 혈액을 채취하고, 혈장 중 ginsenoside 농도를 분석하였다.



	Rb1	Rb2	Rc	Rd
t1/2 (h)	31.35 ± 9.59	32.04 ± 8.11	43.13 ± 15.74	37.89 ± 10.87
Tmax (h)	7.43 ± 0.57	6.86 ± 0.74	6.86 ± 0.74	10.86 ± 4.25
Cmax (ng/mL)	68.91 ± 10.75	26.75 ± 3.83	37.19 ± 5.12	10.01 ± 1.88
AUC60h (ng × h/mL)	1874.82 ± 206.51	828.29 ± 115.67	1007.25 ± 103.48	276.5 ± 48.71
AUCinf (ng × h/mL)	2539.24 ± 315.39	1292.53 ± 296.08	1482.05 ± 151.94	518.55 ± 139.38
MRT60h (h)	21.84 ± 1.26	24.06 ± 1.52	22.22 ± 1.67	23.65 ± 2.07
MRTinf (h)	45.98 ± 10.84	50.47 ± 12	58.27 ± 14.58	62.35 ± 17.08

- 약동학 분석결과 홍삼을 투여한 뒤 혈중 ginsenoside의 농도는 100 ng/mL 이하로 매우 낮은

값을 나타내지만, 반감기가 매우 길어서 반복투여시 정상상태의 혈중 농도는 단회투여의 경우보다 증가할 것으로 예상되었다. 이를 확인하기 위하여 홍삼추출물을 동일 용량으로 1주 및 2주간 반복투여한 뒤 ginsenoside의 혈중 농도를 평가하였다.

(나) 홍삼추출물을 반복투여한 후 혈중 농도 비교

Ginsenoside	Plasma concentration (ng/mL)			
	SA (1.5 g/kg/day)	1WRA (1.5 g/kg/day for 1 week)	2WRA (1.5 g/kg/day for 2 weeks)	
20(s)-protopanaxadiol	Rb1	8.9±2.3	33.6±10.1*	32.1±12.4*
	Rb2	7.2±1.6	25.1±6.4*	22.3±7.8*
	Rc	6.1±1.6	25.5±7.9*	25.1±8.5*
	Rd	1.8±0.6	9.8±2.5*	11.5±4.5*
	Rh2	ND	ND	ND
	Rg3	ND	ND	ND
	F2	ND	ND	ND
	Compound K Protopanaxadiol	ND	ND	ND
20(s)-protopanaxatriol	Re	ND	ND	ND
	Rh1	ND	ND	ND
	Rg1	ND	ND	ND
	F1	ND	ND	ND
	Protopanaxatriol	ND	ND	ND

Data were expressed as mean ± SD from four rats of control, SA, 1WRA, and 2WRA groups.

*p<0.05, significant compared with SA group by student t-test.

ND : Not detected

RGE : red ginseng extract

- SA : 홍삼추출물 1.5 g/kg, 단회 경구투여 후 2시간 후 혈중 농도
- 1W RA : 홍삼추출물 1.5 g/kg, 1주간 반복 경구투여 후 2시간 후 혈중 농도
- 2W RA : 홍삼추출물 1.5 g/kg, 2주간 반복 경구투여 후 2시간 후 혈중 농도
- Ginsenoside의 혈 중 농도는 단회투여에 비하여 반복투여시 증가함을 확인할 수 있었고, 1주 반복투여와 2주 반복투여의 경우에는 유의적인 차이가 없었으므로, 1주 반복투여 후 정상상태에 도달해있음을 확인할 수 있었다.
- 그러므로 이후의 대사효소 및 수송체 저해 및 유도의 in vivo 평가에서는 홍삼추출물 1.5 g/kg, 1주간 반복 경구투여 방법을 이용하여 홍삼추출물과 약물과의 상호작용을 평가하였다.

(다) 홍삼추출물을 반복투여한 후 안전성 평가

- 홍삼을 반복투여한 후 간독성, 지질대사의 변화, 신장기능의 변화를 확인하기 위하여 1.5 g/kg, 1주간 반복 경구투여 한 후 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, free fatty acids, blood urea nitrogen (BUN), creatinine 농도를 측정함
- 홍삼 1.5g/kg을 1주간 반복경구투여하여도 간기능, 신기능 또는 지질대사의 이상이 나타나지 않음

Biochemical parameters		control	1WRA
alanine aminotransferase (ALT)	Unit/L	72.7±13.3	66.3±28.0
aspartate aminotransferase (AST)	Unit/L	27.3±3.1	41.0±29.8
Triglyceride	mg/dL	80.3±57.0	73.7±10.5
Total cholesterol	mg/dL	62.7±13.3	53.7±9.1
HDL cholesterol	mg/dL	54.7±9.9	49.0±1.7
LDL cholesterol	mg/dL	9.0±1.0	7.7±1.2
Free Fatty acid	mg/dL	161.3±73.0	166.0±12.2
blood urea nitrogen (BUN)	mg/dL	34.9±7.2	33.4±12.1
Creatinine	mg/dL	0.5±0.1	0.5±0.1

Data were expressed as mean ± SD from three rats of control and 1WRA groups

2-3. 홍삼추출물 복용 후 사람에서의 혈중 ginsenoside 약동학 평가를 위한 임상 1상시험 수행

(1) 혈장 시료 중 ginsenoside 분석 (정량가능한 ginsenoside 확인)

- 공혈장에 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 표준시료를 spike 하여 표준시료의 피크를 확인한 뒤, 홍삼정 올데이를 복용한 사람에서 채취한 혈장 시료 중 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rh1, Rh2, Rg1, Rg3, Re, Rf, F1, F2, compound K, panaxadiol, panaxatriol의 피크를 공혈장 및 표준시료 피크와 비교한 결과, 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K의 5종 ginsenoside만 검출됨을 확인할 수 있었다.

- LC-MS/MS 분석조건

• LC Conditions

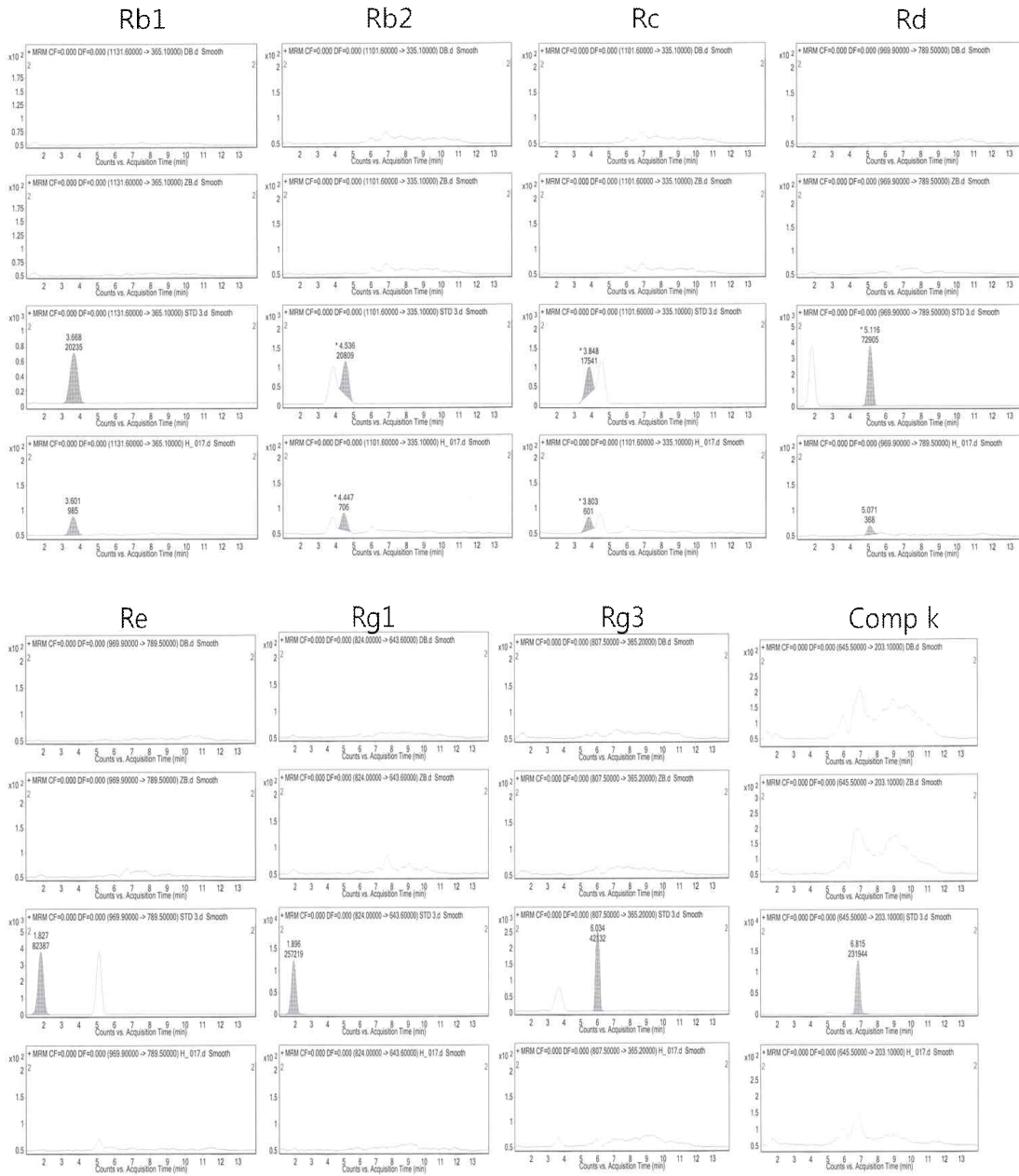
Instrument	Agilent Infinity 1260
Analytical column	Synergi Hydro RP (2.5 mm, 2.0 mm i.d. x 100 mm, Phenomenex)
Mobile phase	gradient elution of (A) 0.1% formic acid in DW and (B) 0.1%

	formic acid in methanol																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>0.2</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>6.5</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>7.0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	A (%)	B (%)	0	30	70	0.2	30	70	1.0	10	90	6.5	10	90	7.0	30	70	10.0	30	70
Time (min)	A (%)	B (%)																				
0	30	70																				
0.2	30	70																				
1.0	10	90																				
6.5	10	90																				
7.0	30	70																				
10.0	30	70																				
Flow rate	0.3 mL/min																					
Column oven temperature	30 °C																					
Auto sampler temperature	10 °C																					
Injection volume	15 mL																					
Run time	14 min																					

• MS/MS Conditions

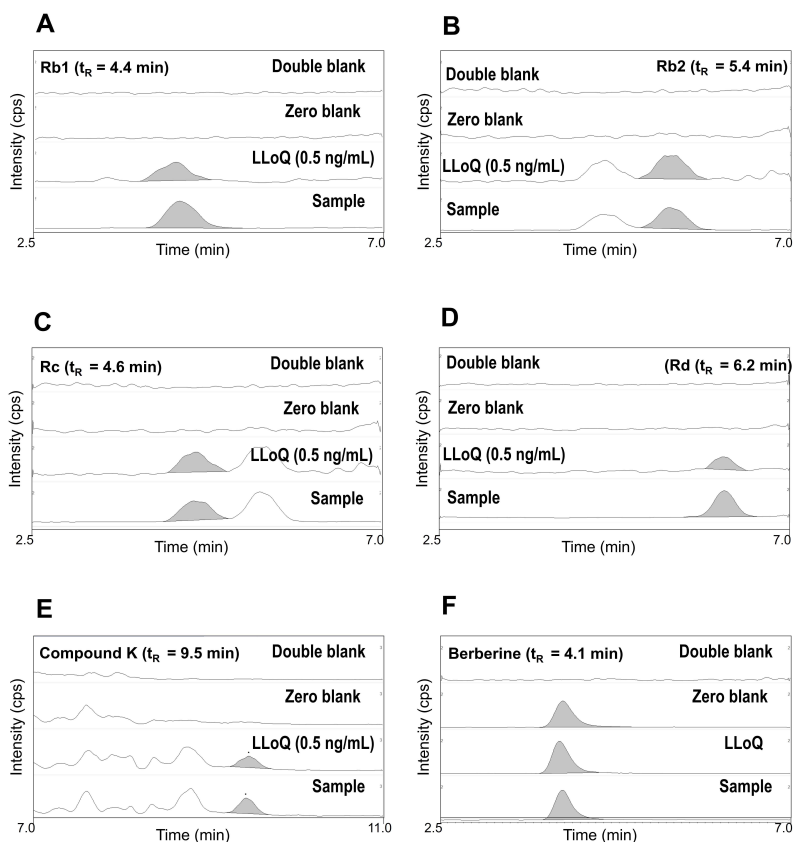
Instrument	Agilent 6470 Triple Quadrupole MS			
Ionization	Electrospray ionization with positive ion mode			
Gas temperature	300°C			
Gas flow	10 L/min			
Nebulizer	35 psi			
Capillary	4000 V			
	Multiple reaction monitoring (MRM) mode			
	Compound	Mass transition (<i>m/z</i>)	Retention time (min)	
			Collision energy (V)	
Quantification	Rb1	1131.6→365.1	3.6	65
	Rb2	1101.6→335.1	4.5	60
	Rc	1101.6→335.1	3.8	60
	Rd	969.9→789.5	5.1	50
	Re	969.9→789.5	1.8	50
	Rf	823.5→365.1	2.7	55
	Rg1	824.0→643.6	1.9	40
	Rg3	807.5→365.2	6.0	60
	Rh1	661.5→203.1	3.2	40
	Rh2	645.5→645.5	6.9	45
	F1	661.5→203.1	3.7	40
	F2	807.5→627.5	6.1	40
	Comp K	645.5→203.1	6.8	35
	Diol	483.4→483.4	7.8	40
Triol	499.4→499.4	5.6	40	
Berberine (IS)	336.1→320.0	3.8	30	

- 분석 크로마토그램 (혈장)



(2) 사람 혈장 중 5종 ginsenoside 분석법 validation

- LC-MS/MS를 이용하여 추출물 성분 및 인삼가공품 복용 후 검출을 위한 14 ginsenosides 동시 분석법 확립하였으며, 사람 혈중에서 검출되는 5종 ginsenoside 동시분석법 확립하였음.
- 사람 혈장중에서의 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K의 분석크로마토그램을 나타냄



- 확립된 분석법을 이용하여 ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, and compound K의 intra-day and inter-day precision and accuracy를 평가한 결과를 표로 정리함. 재현성있고 감도가 좋은 ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, and compound K 분석법을 확립하였음.

	(ng/mL)	Inter-day (n=3)			Intra-day (n=3)		
		Calculated (ng/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)	Calculated (ng/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Rb1	0.75	0.8	12.1	102.1	0.8	6.7	109.1
	4	3.9	7.9	98.4	3.8	4.5	96.2
	40	37.7	5.3	94.3	36.3	5.4	90.8
Rb2	0.75	0.7	11.3	92.2	0.7	9.3	99.8
	4	3.9	6.3	98.7	3.7	3.5	92.3
	40	39.3	4.7	98.2	37.9	5.1	94.7
Rc	0.75	0.8	6.3	104.2	0.8	7.2	107.0
	4	3.9	2.9	96.3	3.8	4.7	95.6
	40	37.3	2.1	93.2	37.1	4.6	92.7
Rd	0.75	0.7	9.6	98.8	0.7	5.5	95.2
	4	3.8	7.4	94.7	3.7	3.5	92.2
	40	40.0	3.3	100.0	39.2	3.7	97.9
CK	0.75	0.7	9.0	96.5	0.7	7.6	97.0
	4	3.6	7.2	91.1	3.5	3.6	87.1
	40	44.5	8.1	111.4	40.8	4.3	101.9

(2) 홍삼 2주간 반복투여시 안전성 평가

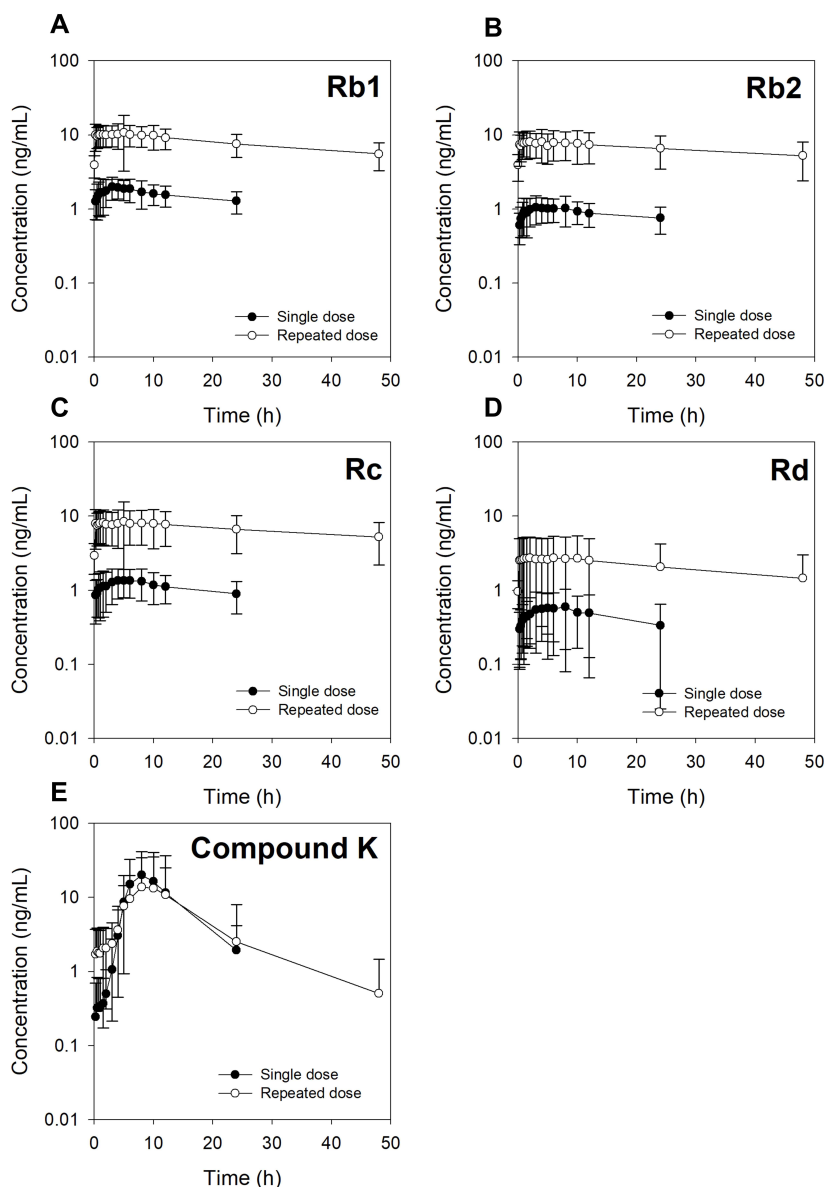
- 홍삼정올데이 3포씩 2주간 복용하는 동안 유의한 심전도 소견, 혈압 및 체온의 변화, ALT, AST 수치의 변화는 없었음

	Test time	On day 1	On day 15
Systolic blood pressure	0h (predose)	121.5±9.0	120.4±9.1
	2h	125.1±7.5	123.7±6.9
	4h	126.5±9.4	123.1±9.2
	8h	121.8±10.6	128.0±9.4
	12h	124.6±8.1	126.6±9.0
Dystolic blood pressure	0h (predose)	78.9±7.8	77.7±8.8
	2h	81.2±6.0	76.2±5.3
	4h	76.4±8.5	76.5±8.4
	8h	71.3±8.8	71.9±7.1
	12h	72.7±8.9	71.5±7.2
Body temperature	0h (predose)	36.3±0.1	36.3±0.3
	2h	36.3±0.2	36.4±0.2
	4h	36.5±0.3	36.5±0.2
	8h	36.7±0.2	36.7±0.2
	12h	36.7±0.2	36.6±0.2
Alanine transaminase		22.1±9.8	17.0±8.8
Aspartate transaminase		19.9±8.7	21.6±9.1

Data were expressed as mean ± SD of 15 subjects

(3) 홍삼 단회 투여 및 2주 반복투여시 ginsenoside 약동학 비교 평가

- 홍삼 단회 투여 및 2주 반복투여시 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K의 혈중 농도 결과와 약동학 파라미터를 그림으로 나타냄
- Ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd는 반감기가 길고 반복투여에 의해 축적되는 현상을 보이지만 compound K는 축적현상이 없이 단회와 2주 반복 투여시 유사한 혈중 농도를 나타냄



[Mean \pm standard deviation plasma concentration-time profiles for ginsenosides (A) Rb1, (B) Rb2, (C) Rc, (D) Rd, and (E) compound K after single (●) or repeated (○) administrations of Red ginseng extract.]

Pharmacokinetic parameters of ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, and compound K after single or repeated administrations of Red ginseng extract

Ginsenoside	PK parameters	Single dose	Repeated dose for 15 day	Accumulation factor
Rb1	T_{max} (h)	3.53 \pm 1.25	2.12 \pm 1.76	4.55
	C_{max} (ng/mL)	2.19 \pm 0.73	12.20 \pm 7.34 *	
	AUC (ng·h/mL)	82.68 \pm 26.26	375.93 \pm 128.17*	
	$t_{1/2}$ (h)	35.05 \pm 8.46	51.01 \pm 16.71*	
	MRT (h)	26.83 \pm 1.59	20.74 \pm 1.06*	

Rb2	T _{max} (h)	3.87±2.47	3.02±3.08	6.73
	C _{max} (ng/mL)	1.26±0.39	8.83±3.68*	
	AUC (ng·h/mL)	47.12±16.40	316.96±145.92*	
	t _{1/2} (h)	38.19±20.33	68.69±26.92*	
	MRT (h)	26.80±1.74	21.72±1.08*	
Rc	T _{max} (h)	3.68±1.70	2.08±2.76	5.44
	C _{max} (ng/mL)	1.50±0.63	9.69±7.08*	
	AUC (ng·h/mL)	59.40±22.95	323.21±169.61*	
	t _{1/2} (h)	35.63±14.79	59.09±14.96*	
	MRT (h)	27.39±2.34	21.58±0.78*	
Rd	T _{max} (h)	4.87±1.92	3.47±3.06	4.49
	C _{max} (ng/mL)	0.70±0.46	3.14±2.79*	
	AUC (ng·h/mL)	22.58±18.31	101.42±101.00*	
	t _{1/2} (h)	23.96±15.26	45.82±15.87	
	MRT (h)	24.67±2.23	20.50±1.41*	
Compound K	T _{max} (h)	7.87±2.03	6.93±2.46	0.85
	C _{max} (ng/mL)	24.80±23.25	18.24±27.11	
	AUC (ng·h/mL)	247.50±269.49	210.88±400.44	
	t _{1/2} (h)	9.95±4.91	7.58±4.12	
	MRT (h)	13.31±3.72	10.51±3.16	

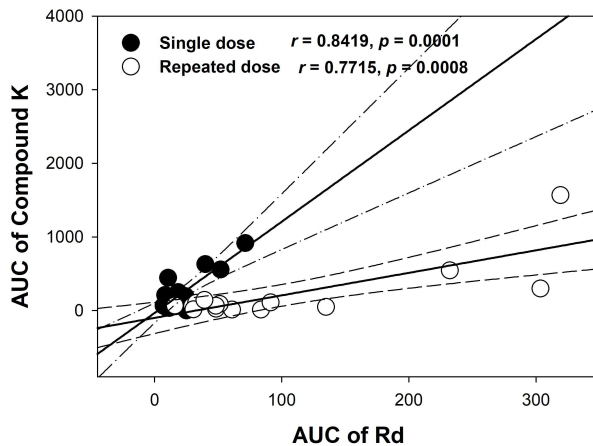
*: p<0.05 statistically significant from single dose group by unpaired t-test

(4) Ginsenoside의 위장관내 대사와 투과도 평가

- Coc-2 실험계를 이용하여 홍삼추출물에 고농도로 존재하는 6개 ginsenoside와 compound K의 위장관 투과도를 평가함
- 실험결과 Rg3를 제외한 6개 ginsenoside의 투과도는 큰 차이가 없었으나, Rg3와 Rh1은 efflux ratio가 크므로 흡수의 저해현상이 있어 혈중 농도가 낮을 수 있음을 확인하였다.
- 위장관 투과도와 함량, 혈중농도의 상관성이 성립하지 않는 것으로부터 ginsenoside의 혈중 농도는 위장관 투과도 보다는 장관내에서의 대사가 영향을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다.

Ginsenosides	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)		
	A to B	B to A	ER
Rb1	0.27±0.03	0.30±0.08	1.12
Rb2	0.28±0.02	0.24±0.05	0.88
Rc	0.28±0.09	0.33±0.06	1.28
Rd	0.22±0.02	0.31±0.04	1.45
Compound K	0.47±0.05	0.53±0.03	1.15
Rg3	0.05±0.01	0.14±0.06	2.97
Rh1	0.22±0.04	1.35±0.14	6.27

- 아래 위장관내 대사와 혈중 농도를 확인하기 위하여 각 개인의 ginsenoside 농도를 비교하였을 경우 Rd농도가 높은 사람은 compound K의 농도도 높고, 단회투여과 반복투여시 유사한 경향을 보임을 확인하였음.
- Rb1, Rb2, Rd --> Rd --> compound K로 대사되는 장내 대사과정을 생각하면 Rd와 compound K의 두 혈중 농도의 상관성은 장내 환경에 따른 대사율의 차이에 기인함을 유추할 수 있다.



[Correlations between the area under the curve (AUC) values for ginsenosides Rd and compound K after single dose (●) or 15 days-repeated administrations (○) of Red ginseng extract]

2-4. 고려인삼 제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 약물상호작용 평가

(1) In vitro 약물대사 / 수송활성 저해성 평가 결과 요약

(가) In vitro 약물대사 / 수송활성 저해성 평가 실험계 및 기질약물

	System	Substrate	Metabolite		
CYPs		CYP1A2	phenacetin	acetaminophen	
		CYP2A6	coumarin	OH-coumarin	
		CYP2B6	bupropion	OH-bupropion	
		CYP2C8	Human liver	paclitaxel	OH-paclitaxel
		CYP2C9	microsomes	diclofenac	OH-diclofenac
		CYP2C19	omeprazole	OH-omeprazole	
		CYP2D6	dextromethorphan	dextrorphan	
		CYP3A4	midazolam	OH-midazolam	
UGTs		UGT1A1	SN-38	SN-38-Glu	
		UGT1A3	chenodeoxycholic acid	chenodeoxycholate-Glu	
		UGT1A4	Human liver	trifluoperazine	trifluoperazine-Glu
		UGT1A6	microsomes	N-acetylserotonin	N-acetylserotonin-Glu
		UGT1A9	mycophenolic acid	nycophenolic acid-Glu	
		UGT2B7	naloxone	naloxone-Glu	
	Transporters		OCT1	[³ H]N-methyl-4-phenylpyridinium	
		OCT2	[³ H] N-methyl-4-phenylpyridinium		
		OAT1	HEK293 cells	[³ H]p-amino hippuric acid	
		OAT3	[³ H]estrone-3-sulfate		
		OATP1B1	[³ H]estrone-3-sulfate		
		OATP1B3	[³ H]estradiol-17- δ^2 -D-glucuronide		
		BCRP	LLC-PK1	[³ H]estrone-3-sulfate	
		P-gp	cells	[³ H]digoxine	

RG: red ginseng; CYP: Cytochrome P450; UGT: UDP-glucuronosyltransferases; OCT: organic cation transporter; OAT: organic anion transporter; OATP: organic anion transporting polypeptide; BCRP: breast cancer resistance protein; P-gp: P-glycoprotein; IC₅₀: half maximal inhibitory concentration; NI : no inhibition

(나) 인삼가공품의 저해활성 평가 결과

- 수삼, 백삼, 홍삼추출물은 약물대사, 수송활성에 유의적인 저해활성을 보이지 않음
- 아래 in vitro 실험계를 이용한 저해성 평가결과를 요약하였음

		IC ₅₀ (μg/mL)		
		홍삼	백삼	수삼
CYPs	CYP1A2	NI	NI	NI
	CYP2A6	NI	NI	NI
	CYP2B6	112	NI	NI
	CYP2C8	NI	NI	NI
	CYP2C9	NI	NI	NI
	CYP2C19	NI	NI	NI
	CYP2D6	NI	NI	NI
	CYP3A4	NI	NI	NI
UGTs	UGT1A1	NI	NI	NI
	UGT1A3	NI	NI	NI
	UGT1A4	NI	NI	NI
	UGT1A6	NI	NI	NI
	UGT1A9	NI	NI	NI
	UGT2B7	NI	NI	NI
Transporters	OCT1	NI	NI	NI
	OCT2	NI	NI	NI
	OAT1	NI	NI	NI
	OAT3	146	NI	NI
	OATP1B1	NI	NI	NI
	OATP1B3	104	62	104
	BCRP	NI	NI	NI
	P-gp	NI	NI	NI

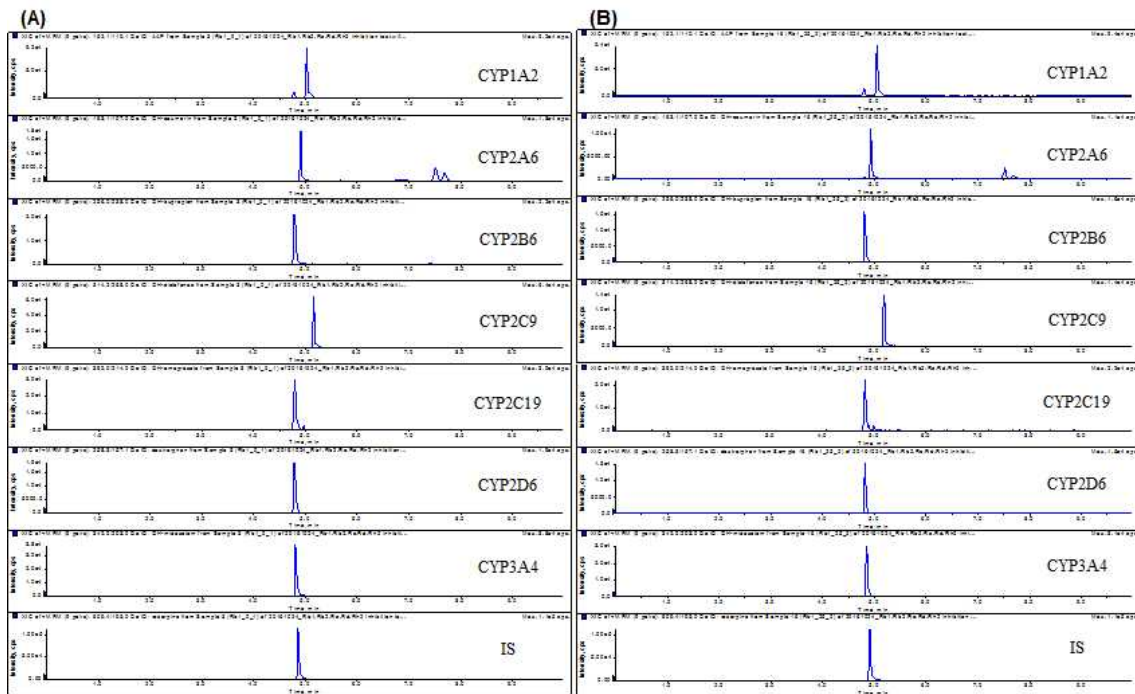
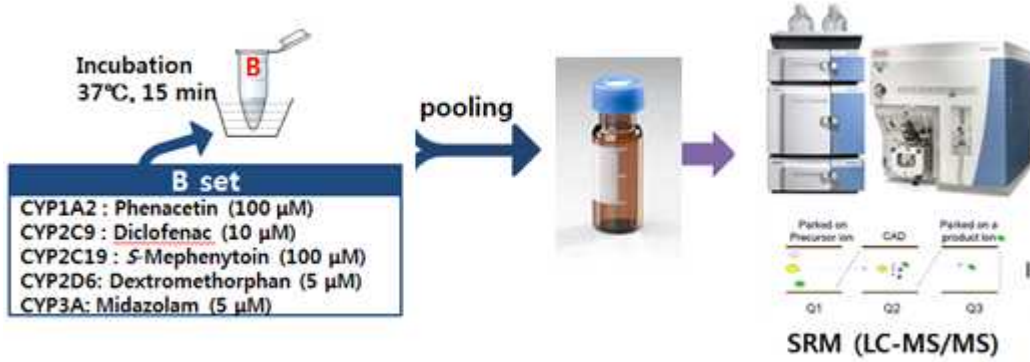
IC₅₀ : Half maximal inhibitory concentration

NI : no inhibition

(2) 고려인삼 제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 1상대사효소 억제능 평가

(가) 실험방법: CYP기질 각테일을 이용한 7종 CYP동효소 활성 평가

CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4



[MRM chromatogram of each CYP-specific metabolites and internal standard (IS). HLM incubation sample without ginsenoside (A) and 25 mM ginsenoside Rb1 (B)]

(나) 고려인삼 제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 1상 대사효소 억제능 평가

- 고려인삼 제제 3종의 0 - 0.2 mg/ml 농도로 사람 간 마이크로솜에서 7종의 CYP 효소 활성의 억제능 평가를 LC-MS/MS 기반 cocktail assay 적용하여 평가함
- 결과적으로 고려인삼 제제 3종에서의 7종의 CYP 활성의 유의적 억제능은 관찰되지 않았음
- in vitro에서의 1상 대사효소 활성화에 관련된 인삼-약물 상호작용 가능성이 적을 것으로 판단됨

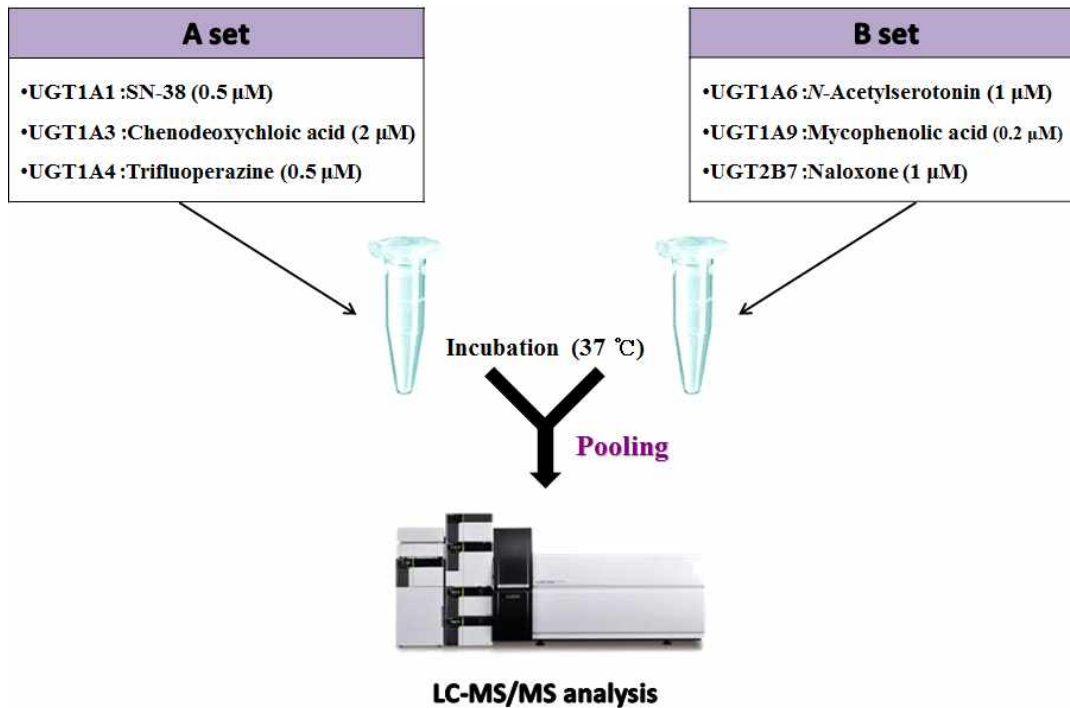
IC50 values ($\mu\text{g/mL}$) of the 3 type ginsengs against P450 enzymes

Ginseng	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)						
	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
홍삼추출물	> 200	nd	> 200	nd	> 200	> 200	nd
수삼추출물	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
백삼추출물	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd, not determined.

(3) 고려인삼 제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 2상 대사효소 억제능 평가

(가) 실험방법: UGT 기질 각테일을 이용한 6종 UGT 동효소 활성 평가



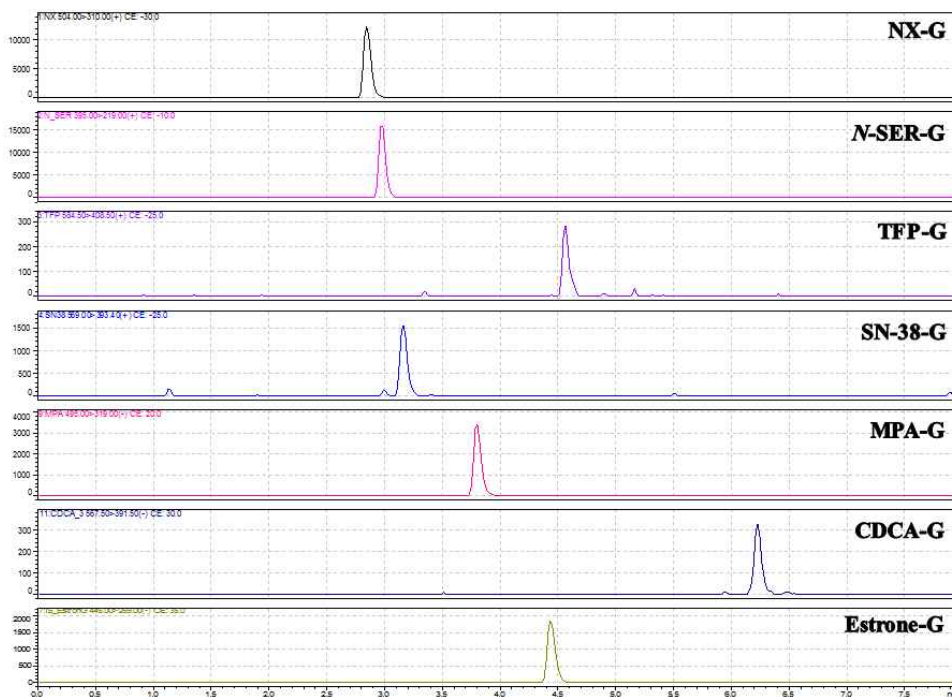
(나) HPLC 분석 조건

UPLC Operating condition					
Model	Shimadzu UPLC system				
Column	Kinetex, C18-XB 100 Å, 100 x 2.10 mm , 2.6 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) #10 column				
Run time	8 min	Flow rate	200 µL/min	Inj. volume	2 µL
Ret. time	SN-38-G (3.1 min), CDCA-G (6.2 min), TFP-G (4.6 min), N-SER-G (2.9 min), MPA-G (3.8 min), NX-G (2.8 min), Estrone-G(IS) (4.4 min)				
Solvent	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile				
Gradient	B : 8 % (0-0.5 min) → 8-60 % (0.5-5 min) → 60 % (5-6 min) → 8 % (6.1-9 min)				

(다) MS/MS 분석 조건

MS Operating condition						
Model	Shimadzu LC-MS/MS 8040					
Spray Vol.	Vaporizer Temp.	Capillary Temp.	Sheath (Neb) Gas	Ion Sweep Gas	Aux Gas	Drying Gas
(+) 4000 V (-) 3500 V	300°C	270°C	40 Ar	1.0 Arb	10 Arb	8 L/min
Gas	Neb/Dry/Aux gas	Nitrogen		Collision gas	Argon	
MS/MS	Collision energy	10-35 eV		CID gas pressure	1.5 mTorr	
SRM	SN-38-G (569>393.4 +), CDCA-G (567.5>391.5 -), TFP-G (584.5>408.5 +), N-SER-G (395>219 +), MPA-G (495>319 -), NX-G (504>310 +), Estrone-G(IS) (445>269 -)					

(라) MRM chromatogram



(마) 고려인삼 제제의 6종 UGT 동효소 저해능 평가

- 3종의 고려 인삼 추출물 모두 6종의 UGT 동효소에 대하여 저해능을 보이지 않음 ($IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$)
- 고려인삼 추출물은 UGT 동효소에 의해 대사가 일어나는 약물의 체내 동태에 영향을 주지 않을 것으로 판단됨

	IC50 (ug/mL)					
	UGT1A1	UGT1A3	UGT1A4	UGT1A6	UGT1A9	UGT2B7
백삼	>200	>200	>200	>200	>200	>200
홍삼	>200	>200	>200	>200	>200	>200
수삼	>200	>200	>200	>200	>200	>200

(3) 고려인삼 제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 수송체 활성 억제능 평가

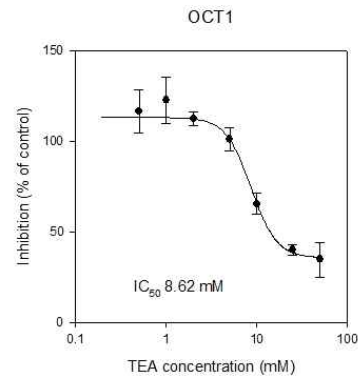
(가) 약물수송체 기반의 약물수송체 평가기술 요약



[약물수송체 기반의 약물상호작용 평가 기술 개요도]

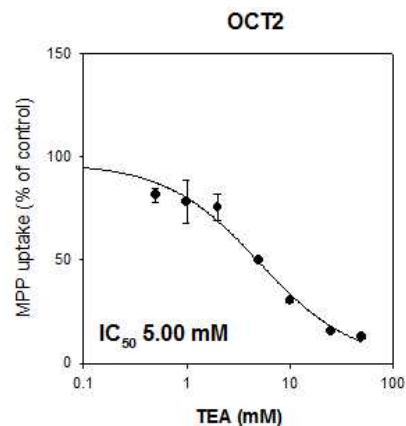
- OCT1 수송체 과발현 HEK293 세포에서 억제제인 tetraethyl ammonium (TEA)이 수송체 기질인 MPP^+ 의 세포내 수송에 대한 저해성을 측정하였다. TEA는 OCT1에 의한 MPP^+ 의 세포내 수송을 농도의존적으로 억제하였고, OCT2에 대한 IC_{50} 값은 8.62 mM임

- 과발현 세포주 : HEK293-OCT1 cells
- Seeding density : 10^5 cells/well, 96well plate
- 배지 : DMEM with 10% FBS, NEAA
- 배양조건 : 8% CO₂, 37 °C, low humidity, 24h
- 완충액 : HBSS
- 기질 : [3H]MPP 4 uCi/mL
- 저해제 : TEA (tetraethyl ammonium)
- 반응조건 : 37 °C, 10분, Thermo-mixer
- 평가 : $fu \cdot C_{max} / IC_{50} < 0.1$



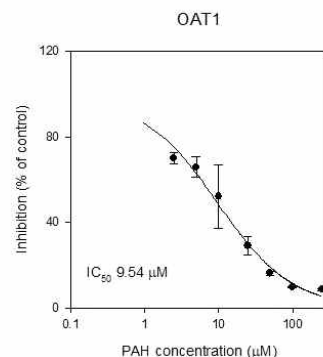
- OCT2 수송계 과발현 HEK293 세포에서 억제제인 tetraethyl ammonium (TEA)이 수송계 기질인 MPP⁺의 세포내 수송에 대한 저해성을 측정하였다. TEA는 OCT2에 의한 MPP⁺의 세포내 수송을 농도의존적으로 억제하였고, OCT2에 대한 IC₅₀값은 5.0 mM임

- 과발현 세포주 : HEK293-OCT2 cells
- Seeding density : 10^5 cells/well, 96well plate
- 배지 : DMEM with 10% FBS, NEAA
- 배양조건 : 8% CO₂, 37 °C, low humidity, 24h
- 완충액 : HBSS
- 기질 : [3H]MPP 4 uCi/mL
- 저해제 : TEA (tetraethyl ammonium)
- 반응조건 : 37 °C, 10분, Thermo-mixer
- 평가 : $fu \cdot C_{max} / IC_{50} < 0.1$

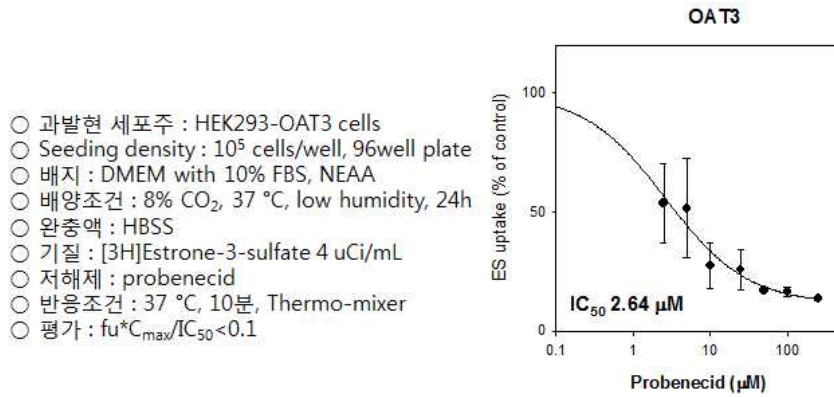


- OAT1 수송계 과발현 HEK293 세포에서 억제제인 probenecid가 수송계 기질인 [3H]para-aminohipuric acid (PAH)의 세포내 수송에 대한 저해성을 측정하였다. Probenecid는 OAT1에 의한 [3H]PAH의 세포내 수송을 농도의존적으로 억제하였고, OAT1에 대한 IC₅₀값은 9.54 μM임

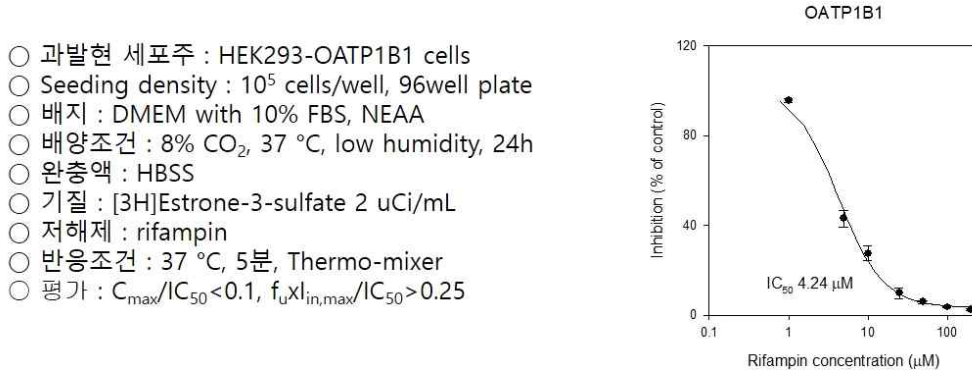
- 과발현 세포주 : HEK293-OAT1 cells
- Seeding density : 10^5 cells/well, 96well plate
- 배지 : DMEM with 10% FBS, NEAA
- 배양조건 : 8% CO₂, 37 °C, low humidity, 24h
- 완충액 : HBSS
- 기질 : [3H]PAH 4 uCi/mL
- 저해제 : probenecid
- 반응조건 : 37 °C, 10분, Thermo-mixer
- 평가 : $fu \cdot C_{max} / IC_{50} < 0.1$



- OAT3 수송계 과발현 HEK293 세포에서 억제제인 probenecid가 수송계 기질인 [³H]estrone-3-sulfate의 세포내 수송에 대한 저해성을 측정하였다. Probenecid는 OAT3에 의한 [³H]estrone-3-sulfate의 세포내 수송을 농도의존적으로 억제하였고, OAT3에 대한 IC₅₀값은 2.64 mM임

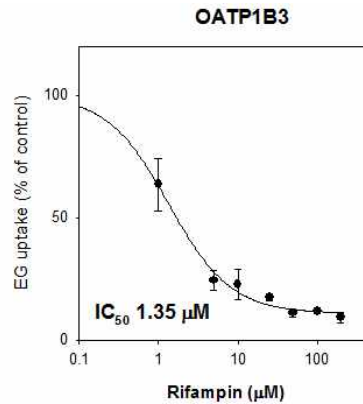


- OATP1B1 수송계 과발현 HEK293 세포에서 억제제인 rifampin이 수송계 기질인 [³H]estrone-3-sulfate의 세포내 수송에 대한 저해성을 측정하였다. Rifampin은 OATP1B3에 의한 [³H]estrone-3-sulfate의 세포내 수송을 농도의존적으로 억제하였고, OATP1B3에 대한 IC₅₀값은 1.35 mM임



- OATP1B3 수송계 과발현 HEK293 세포에서 억제제인 rifampin이 수송계 기질인 [³H]estradiol-17b-D-glucuronide의 세포내 수송에 대한 저해성을 측정하였다. Rifampin은 OATP1B3에 의한 [³H]estradiol-17b-D-glucuronide의 세포내 수송을 농도의존적으로 억제하였고, OATP1B3에 대한 IC₅₀값은 1.35 mM임

- 과발현 세포주 : HEK293-OATP1B1 cells
- Seeding density : 10^5 cells/well, 96well plate
- 배지 : DMEM with 10% FBS, NEAA
- 배양조건 : 8% CO₂, 37 °C, low humidity, 24h
- 완충액 : HBSS
- 기질 : [3H]Estradiol-17b-D-glucuronide 2 uCi/mL
- 저해제 : rifampin
- 반응조건 : 37 °C, 5분, Thermo-mixer
- 평가 : $C_{max}/IC_{50} < 0.1$, $f_{u, in, max}/IC_{50} > 0.25$

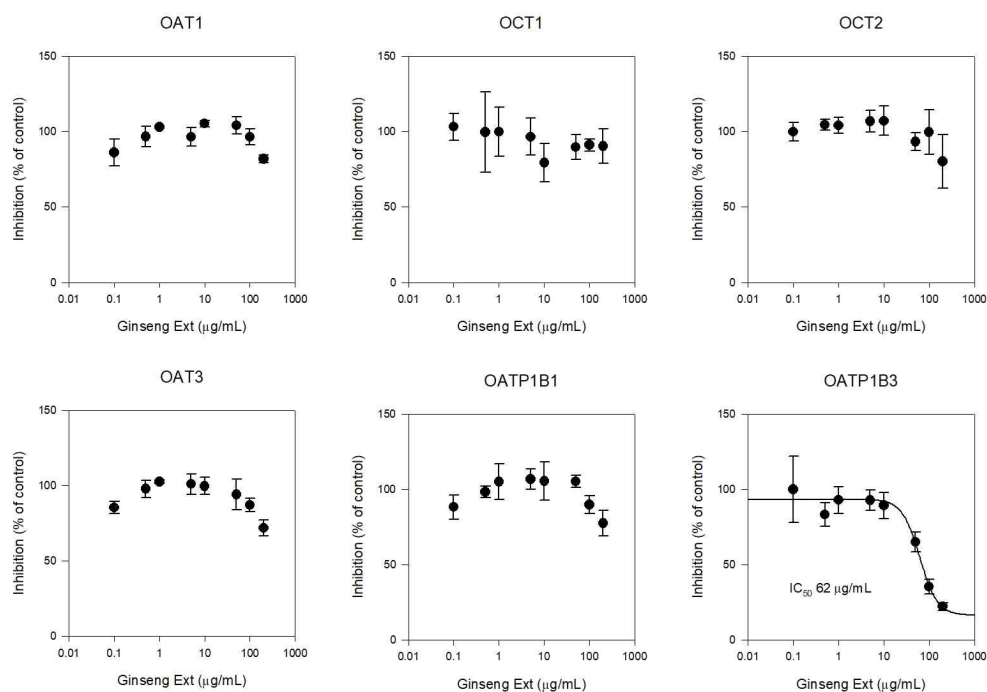


(나) 백삼, 홍삼, 수삼 추출물의 수송계 저해성 평가

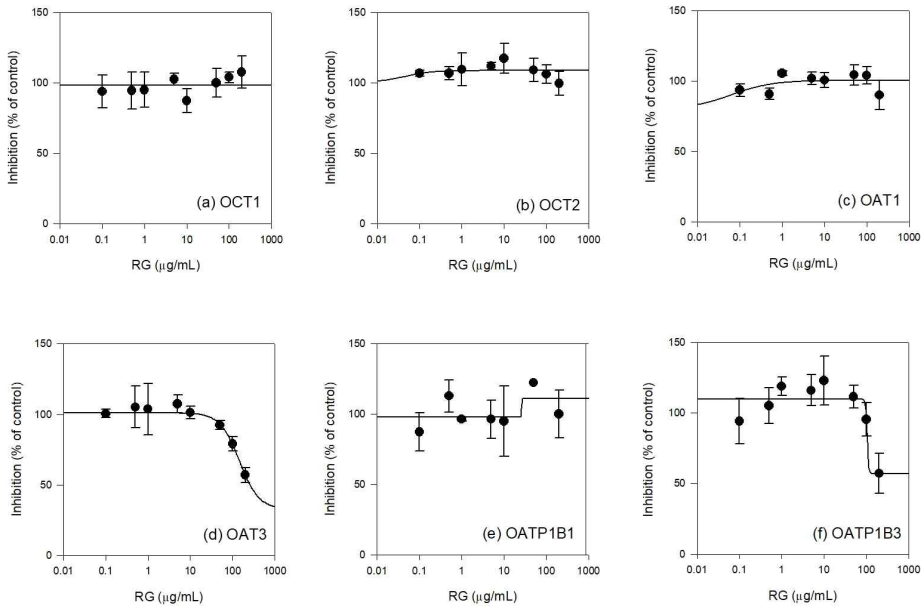
- 백삼, 홍삼, 수삼 추출물의 수송계저해성 평가 요약

	IC50 (ug/mL)					
	OCT1	OCT2	OAT1	OAT3	OATP1B1	OATP1B3
백삼	>200	>200	>200	>200	>200	62
홍삼	>200	>200	>200	>200	>200	>200
수삼	>200	>200	>200	>200	>200	>200

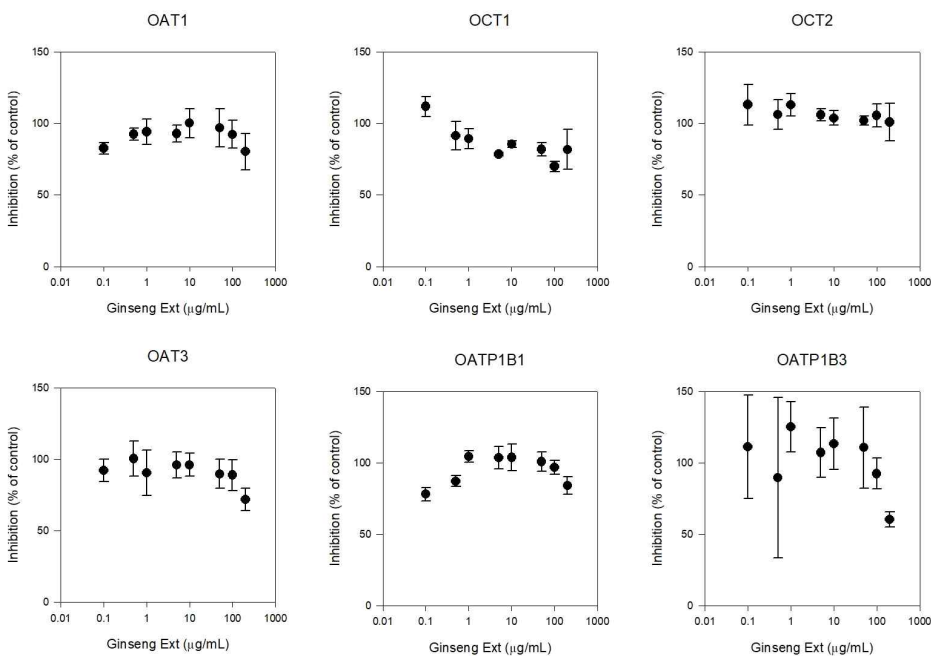
- 백삼 추출물의 수송계 저해성 평가 : 0.1-200 ug/mL 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으나, 백삼 추출물은 OATP1B3의 활성을 농도의존적으로 저해하였으며, 저해 상수 IC₅₀값은 62 ug/mL임.



- 홍삼 추출물의 수송체 저해성 평가 : 0.1-200 ug/mL 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1, OATP1B3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았다.



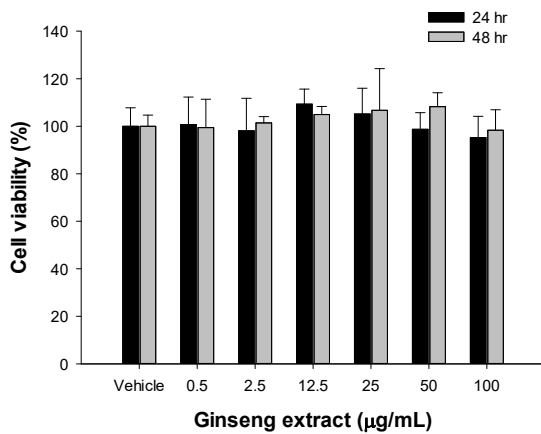
- 수삼 추출물의 수송체 저해성 평가 : 0.1-200 ug/mL 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1, OATP1B3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았다.



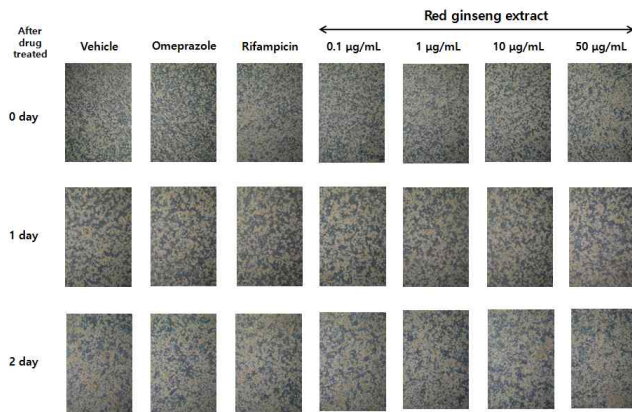
(4) 고려인삼 제제 (홍삼, 백삼 추출물)의 대사/수송체 활성 유도능 평가

(가) 사람 hepatocytes에서 홍삼추출물의 간세포독성에 미치는 영향

- 사람 hepatocytes HMC467에 홍삼추출물을 0.5~100 µg/mL 농도로 처리 후 MTS법으로 세포독성을 측정한 결과, 세포 독성이 나타나지 않았다 (그림 1). 3종의 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 홍삼추출물을 0.1, 1, 10, 50 µg/mL를 2일간 처리하였을 때, 세포 독성은 관찰되지 않았다.



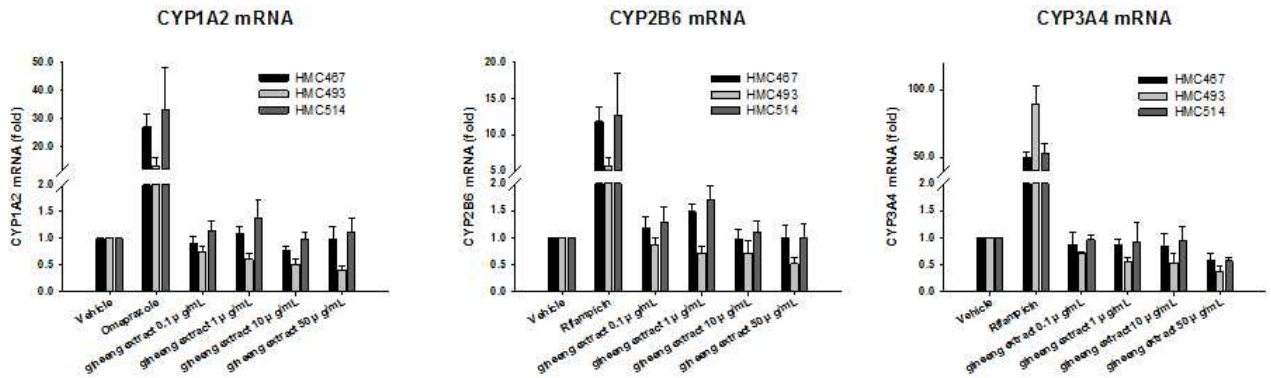
Cytotoxicity of red ginseng extract in cryopreserved human hepatocytes, HMC467 using MTS assay.



Cell morphology after 48 h-treatment of red ginseng extract at 0.1, 1, 10, and 50 µg/mL in hepatocytes HMC467.

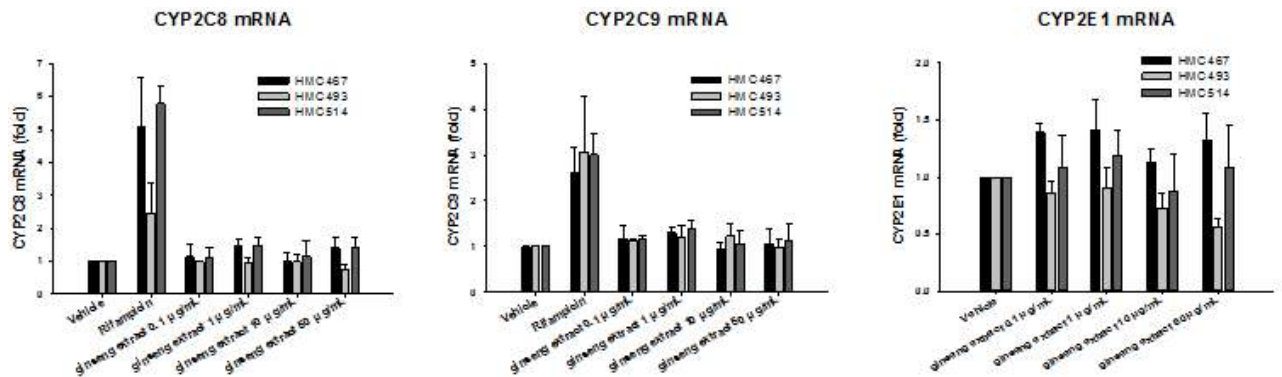
(나) 사람 hepatocytes에서 홍삼추출물의 대사/수송체 활성 유도능 평가

- CYP3A4 mRNA 발현이 vehicle 대비 58~38%까지 감소하였으므로 고용량에서 CYP3A4 억제에 의한 약물상호작용 유발 가능성이 있을 것으로 예측됨
- CYP2C8, CYP2C9, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9 및 UGT2B7 mRNA 발현은 vehicle 대비 변화되지 않았으므로 약물상호작용 유발 가능성은 낮을 것으로 예측됨
- CYP1A2, CYP2B6, CYP2E1, SULT2A1 mRNA 발현은 개체차이가 있을 것으로 예측됨



Effect of red ginseng extract on the mRNA levels of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 after 48 h treatment at 0.1, 1, 10, and 50 µg/mL in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.

- 3종의 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 홍삼추출물 0.1, 1, 10, 50 µg/mL 처리 후 고농도인 50 µg/mL 처리군에서 CYP3A4 mRNA 발현이 vehicle 대비 58~38%까지 감소하였으므로 고용량에서 CYP3A4 억제에 의한 약물상호작용 유발 가능성이 있을 것으로 예측된다.

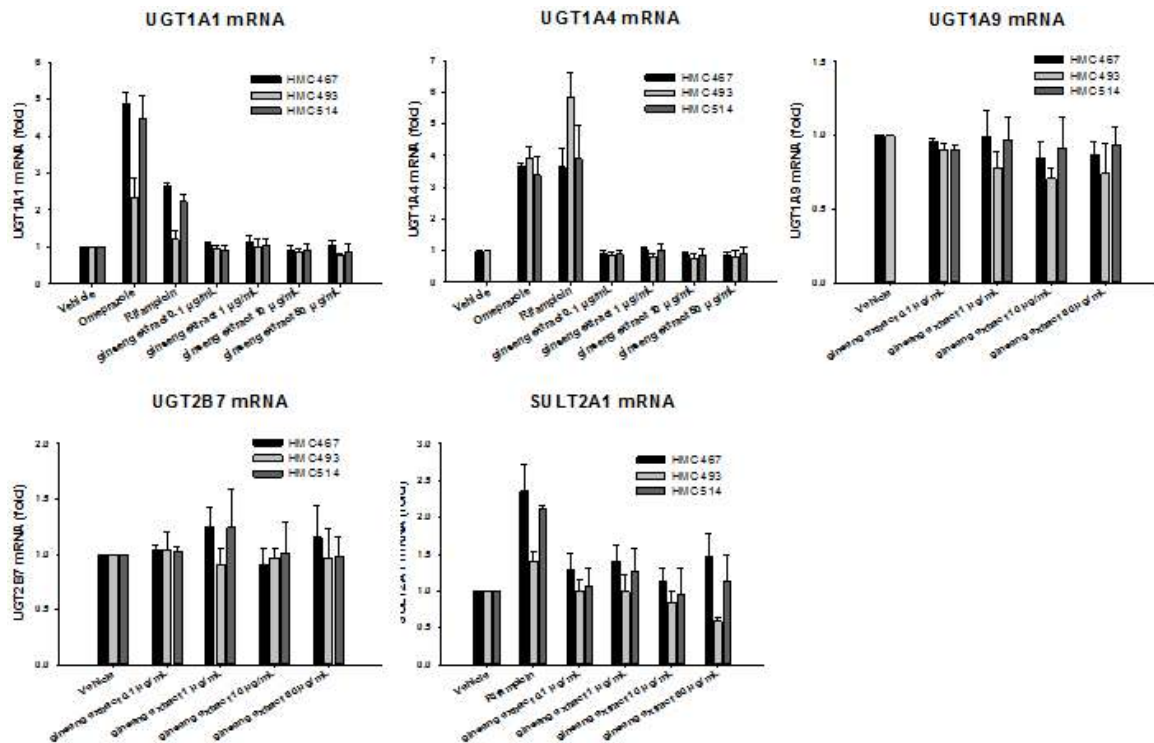


Effect of red ginseng extract on the mRNA levels of CYP2C8, CYP2C9, and CYP2E1 after 48 h treatment at 0.1, 1, 10, and 50 µg/mL in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.

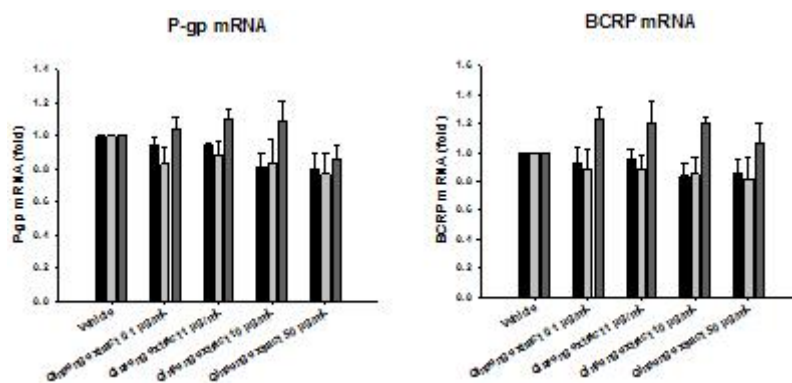
- 사람 hepatocytes HMC467과 HMC514에 홍삼추출물 0.1, 1, 10, 50 µg/mL 처리 후 CYP1A2, CYP2B6, CYP2E1, SULT2A1 mRNA 발현 변화가 없었으나, HMC493에서 CYP1A2, CYP2B6, CYP2E1, SULT2A1 mRNA 발현이 농도의존적으로 감소하였으므로 개체차이가 있을 것으로 예측된다.
- 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 홍삼추출물 0.1, 1, 10, 50 µg/mL 처리 후 CYP2C8, CYP2C9, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9 및 UGT2B7 mRNA 발현은 vehicle 대비 변화되지 않았으므로 약물상호작용 유발 가능성은 낮을 것으로

예측된다.

- 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 홍삼추출물 0.1, 1, 10, 50 mg/mL 처리 후 P-gp 및 BCRP mRNA 발현은 vehicle 대비 변화되지 않았으므로 약물 상호작용 유발 가능성은 낮을 것으로 예측된다.



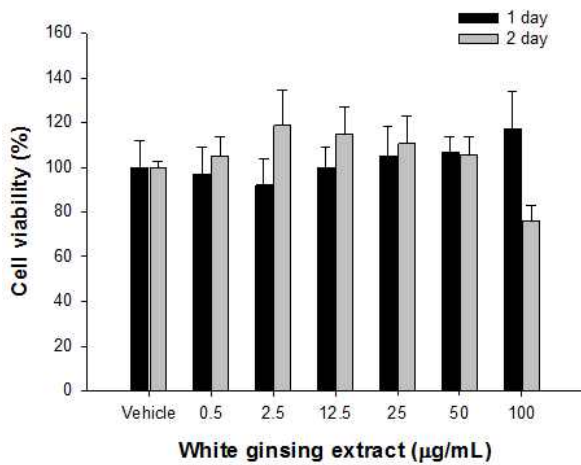
Effect of red ginseng extract on the mRNA levels of UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B7, and SULT2A1 after 48 h treatment at 0.1, 1, 10, and 50 μg/mL in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.



Effect of red ginseng extract on the mRNA levels of P-gp and BCRP after 48 h treatment at 0.1, 1, 10, and 50 μg/mL in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.

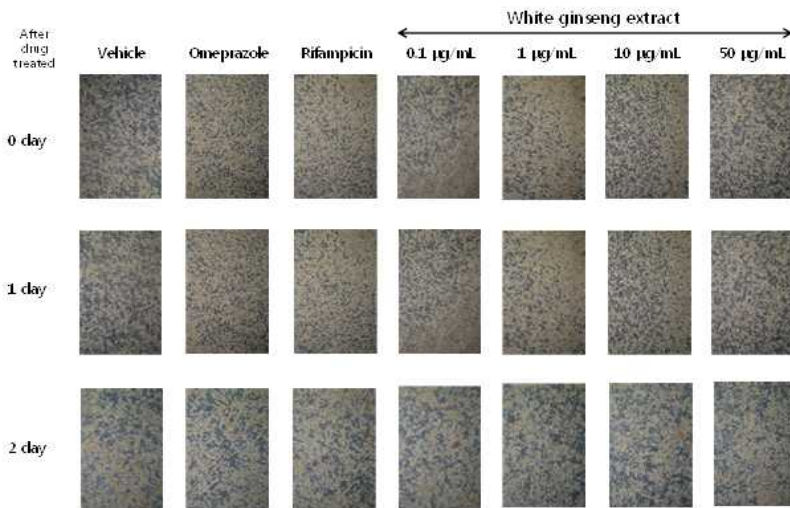
(다) 사람 hepatocytes에서 백삼추출물의 간세포독성에 미치는 영향

- 사람 hepatocytes HMC467에 백삼추출물을 0.5, 2.5, 12.5, 25, 50, 100 mg/mL 농도로 처리 후 MTS법으로 세포독성을 측정된 결과, 백삼추출물은 0.5-50 mg/mL 농도 범위에서 세포 독성이 나타나지 않았다. 3종의 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 백삼추출물을 0.1, 1, 10, 50 mg/mL을 2일간 처리하였을 때, 세포 독성은 관찰되지 않았다.



Cytotoxicity of red ginseng extract in cryopreserved human hepatocytes, HMC467 using MTS assay.

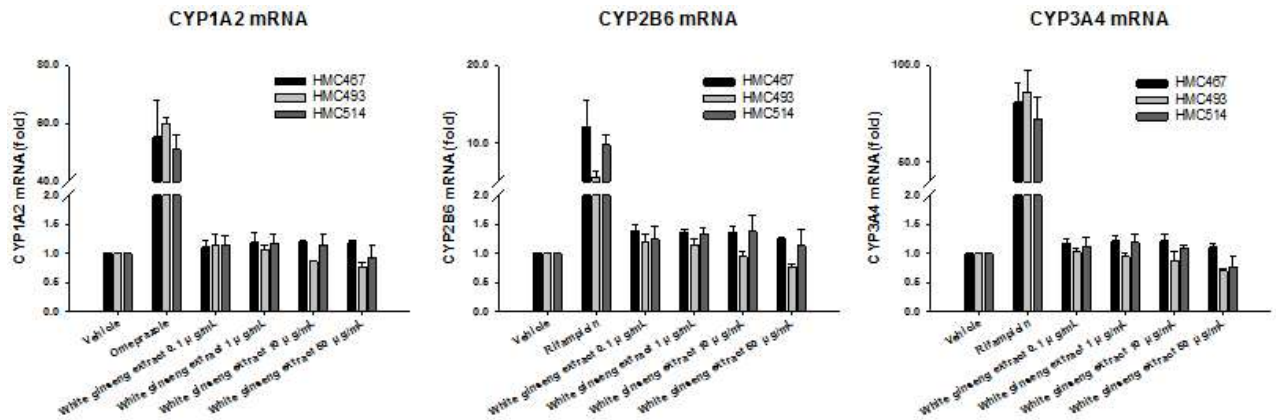
HMC467(296) White ginseng extract (hepatocyte cell culture - matrigel)



Cell morphology after 48 h-treatment of white ginseng extract at 0.1, 1, 10, and 50 µg/mL in hepatocytes HMC467.

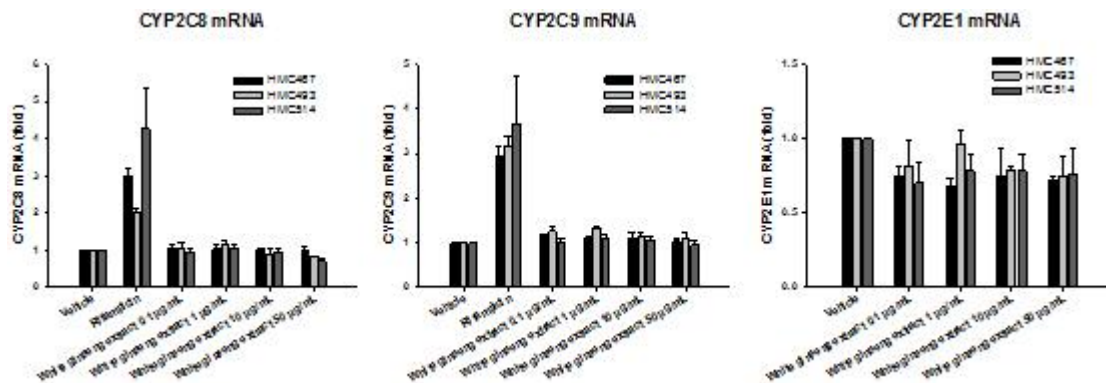
(라) 사람 hepatocytes에서 백삼추출물의 대사/수송체 활성 유도능 평가

- 3종의 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 백삼추출물 0.1, 1, 10, 50 µg/mL 처리 후 CYP1A2, CYP2B6 및 CYP3A4 mRNA 발현은 vehicle 대비 변화되지 않았으므로 약물상호작용 유발 가능성은 낮을 것이다.

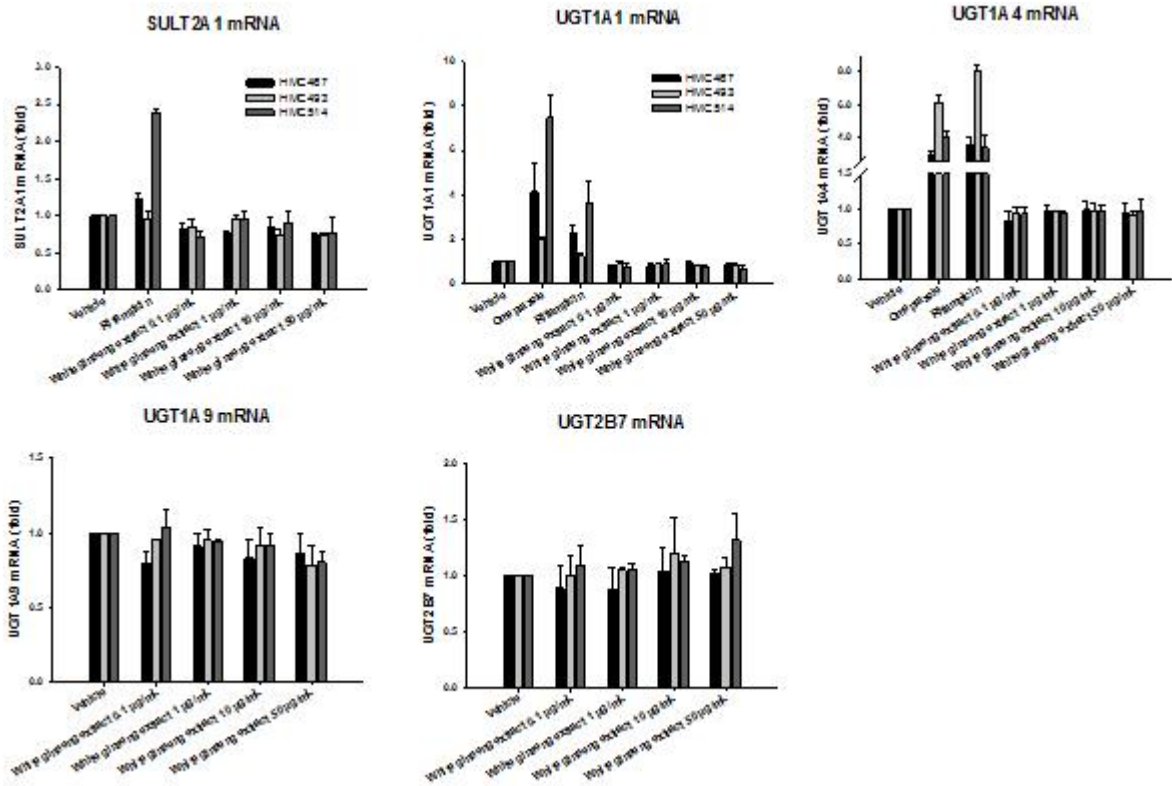


Effect of White ginseng extract on the mRNA levels of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 after 48 h treatment in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514

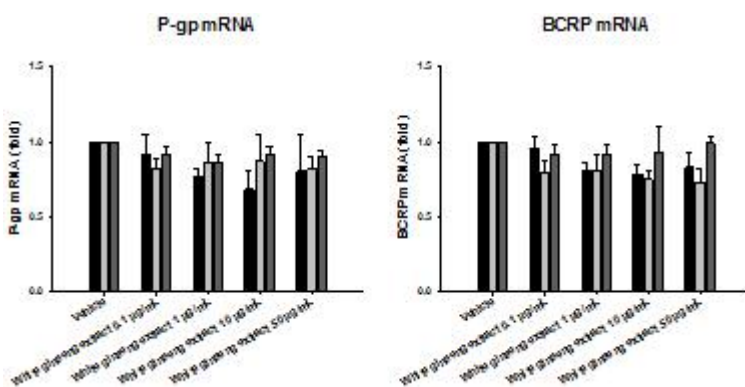
- 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 백삼추출물 0.1, 1, 10, 50 µg/mL 처리 후 CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1, SULT2A1, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B7, P-gp 및 BCRP mRNA 발현은 vehicle 대비 변화되지 않았으므로 약물상호작용 유발 가능성은 낮을 것으로 예측된다.



Effect of White ginseng extract on the mRNA levels of CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 after 48 h treatment in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.



Effect of White ginseng extract on the mRNA levels of SULT2A1, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B7 after 48 h treatment in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.



Effect of White ginseng extract on the mRNA levels of P-gp, and BCRP after 48 h treatment in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.

2-5. 인삼의 활성물질 Ginsenosides의 약물상호작용 평가

(1) 인삼의 활성물질 12종의 1상 대사효소 억제능 평가

(가) 실험결과 요약

-인삼의 활성물질인 ginsenoside 11 종 및 compound K의 사람 간 마이크로솜에서의 1상 대사효소 활성 억제능을 LC-MS/MS기반 cocktail assay로 7종의 CYP 활성 평가

- CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4에 대한 억제능 평가

- 각 ginsenoside의 억제능은 Table에 표시하였음

- Ginsenoside Rb1이 CYP2C9에 유의적인 억제능을 나타냈으며, ginsenoside F2가 CYP2B6에 대해 강한 억제능을 나타냄

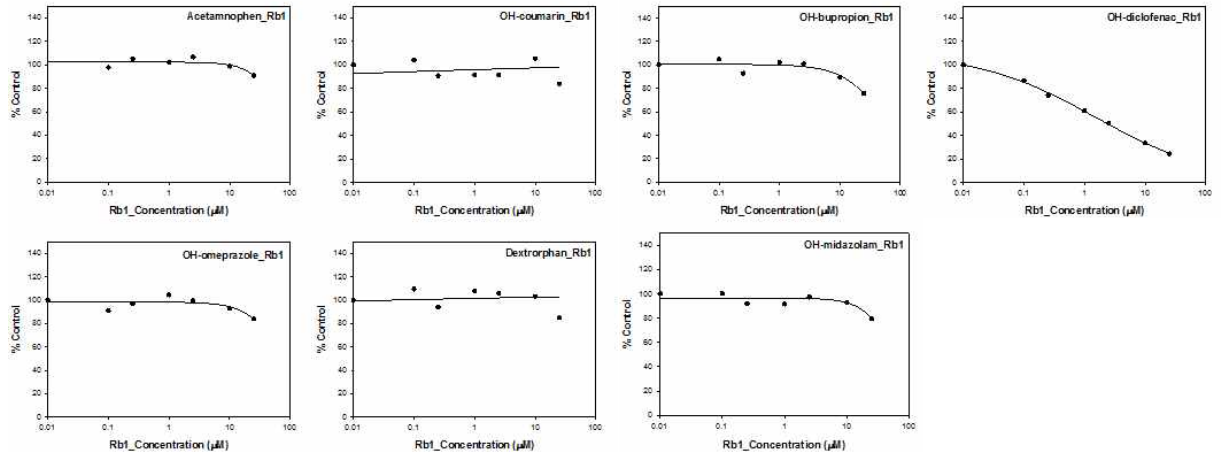
- 주요 대사체인 compound K는 CYP2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4에 미약한 억제능을 나타냄

IC₅₀ values of the 12 ginsenosides against 7 CYPs activities in human liver microsomes

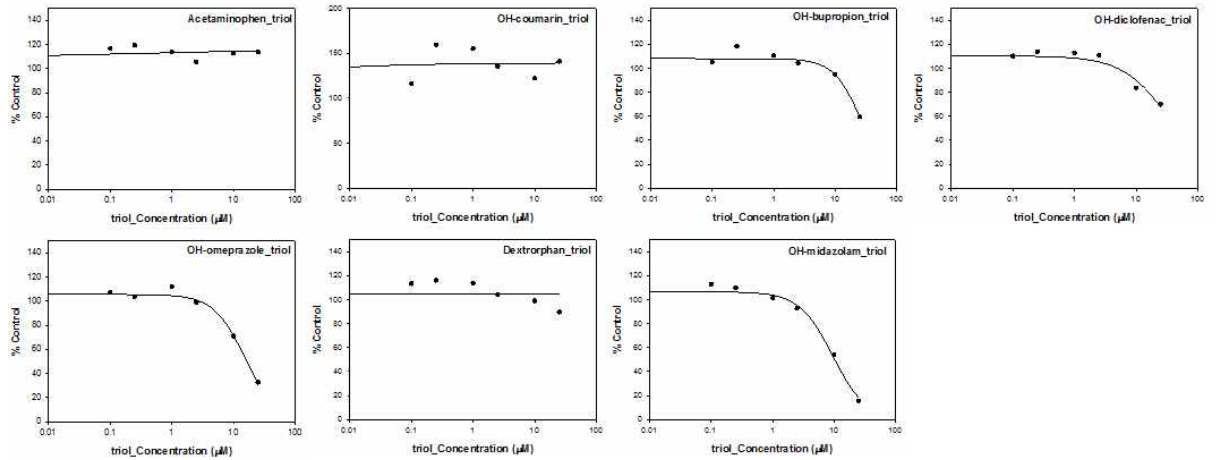
Ginsenosides	IC ₅₀ (μ M)						
	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Rb1	> 50	nd	> 50	2.4	> 50	nd	> 50
Rb2	nd	nd	30.1	nd	> 50	47.0	> 50
Rc	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rd	nd	nd	24.6	42.8	34.3	37.6	32.4
F2	nd	> 50	3.9	> 50	> 50	> 50	> 50
K	nd	> 50	20.8	> 50	> 50	nd	> 50
Rg3	nd	nd	37.7	nd	27.0	> 50	> 50
F1	nd	nd	41.5	43.9	> 50	nd	> 50
Rg1	nd	nd	nd	nd	> 50	nd	nd
Rh1	nd	nd	nd	nd	nd	> 50	46.7
Rf	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Re	> 50	nd	> 50	> 50	nd	nd	nd
panaxadiol	> 50	> 50	9.1	67.9	7.8	32.0	10.9
pnaxatriol	> 50	> 50	25.8	31.8	14.5	> 50	8.8

To determine the inhibitory effects of 12 ginsenosides on the activities of 7 CYPs, a cocktail probe was incubated with each ginsenoside at 0 to 25 mM in HLMs. The data shown represent the means of duplicate experiments. nd, not determined

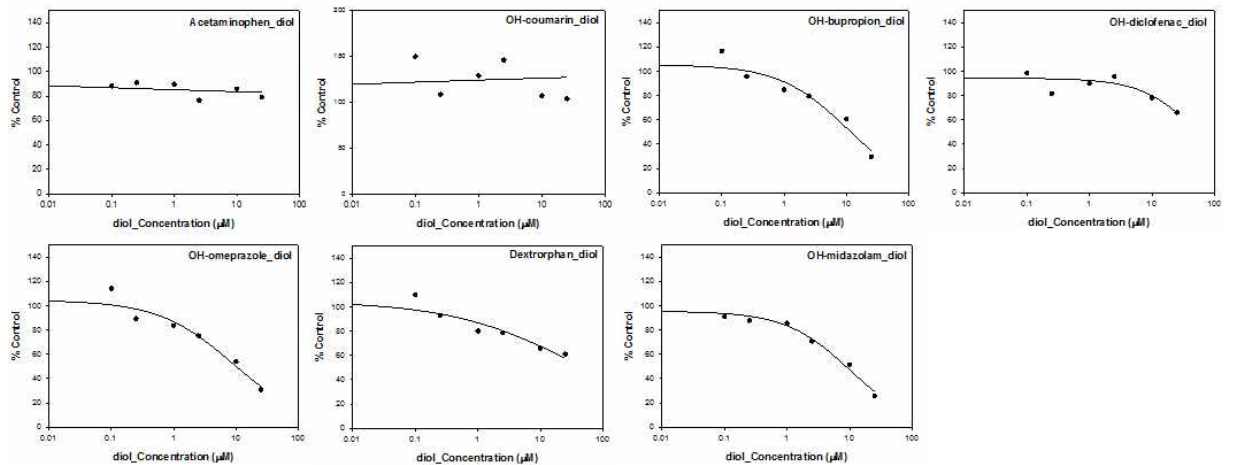
(나) 진세노사이드 Rb1의 7종 CYP 동효소 저해능 평가



(다) 진세노사이드 panaxadiol의 7종 CYP 동효소 저해능 평가



(라) 진세노사이드 panaxatriol의 7종 CYP 동효소 저해능 평가



(2) 인삼의 활성물질 12종의 2상 대사효소 억제능 평가

(가) 진세노사이드 12종 UGT 동효소 저해능 결과 요약

Ginsenosides	IC ₅₀ (μ M)					
	UGT1A1	UGT1A3	UGT1A4	UGT1A6	UGT1A9	UGT2B7
Rb1	> 50	> 50	> 50	> 50	21.3	> 50
Rb2	> 50	> 50	> 50	> 50	22.7	> 50
Rc	> 50	> 50	> 50	> 50	6.3	> 50
Rd	> 50	> 50	> 50	> 50	17.4	> 50
F2	> 50	> 50	> 50	> 50	44.0	> 50
K	> 50	23.4	> 50	> 50	> 50	> 50
Rg3	> 50	20.1	> 50	> 50	10.2	9.6
F1	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Rg1	> 50	> 50	37.1	> 50	> 50	> 50
Rh1	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Rf	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Re	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

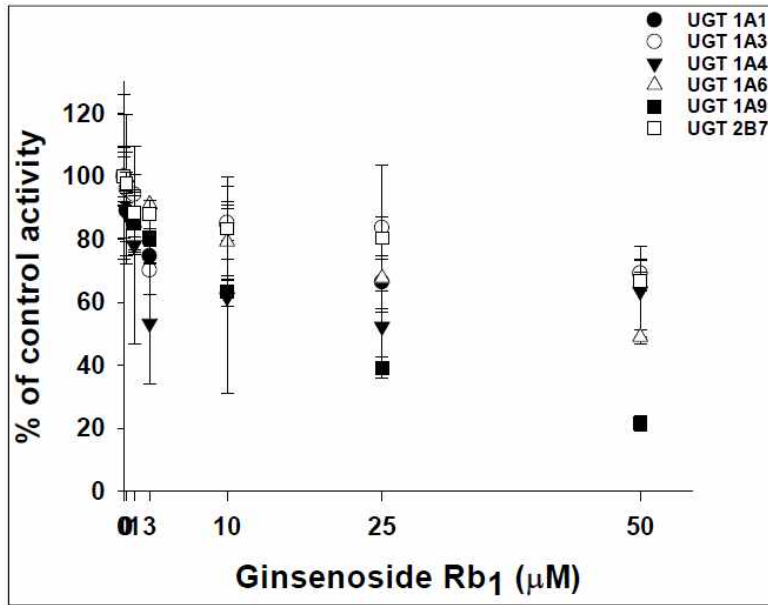
- 진세노사이드 Rb1을 포함한 6종 진세노사이드는 UGT1A9에 대하여 저해능을 나타냄

- 진세노사이드 Rg3는 UGT1A3, UGT1A9 및 UGT2B7에 대해서 저해능을 나타냄

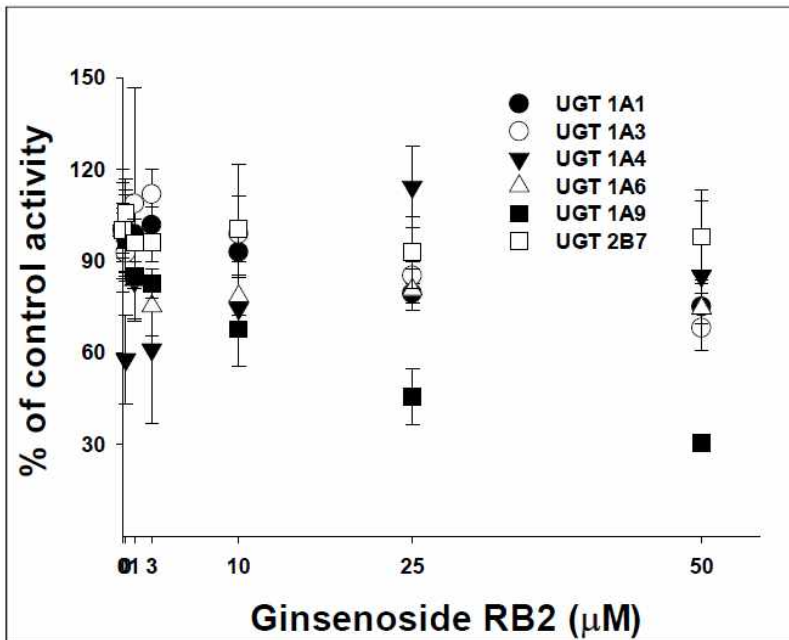
- Compound K의 경우는 UGT1A3에 대해서만 약한 저해능을 나타냄

- 진세노사이드 Rg1은 UGT1A4에 대하여 저해능을 나타냄

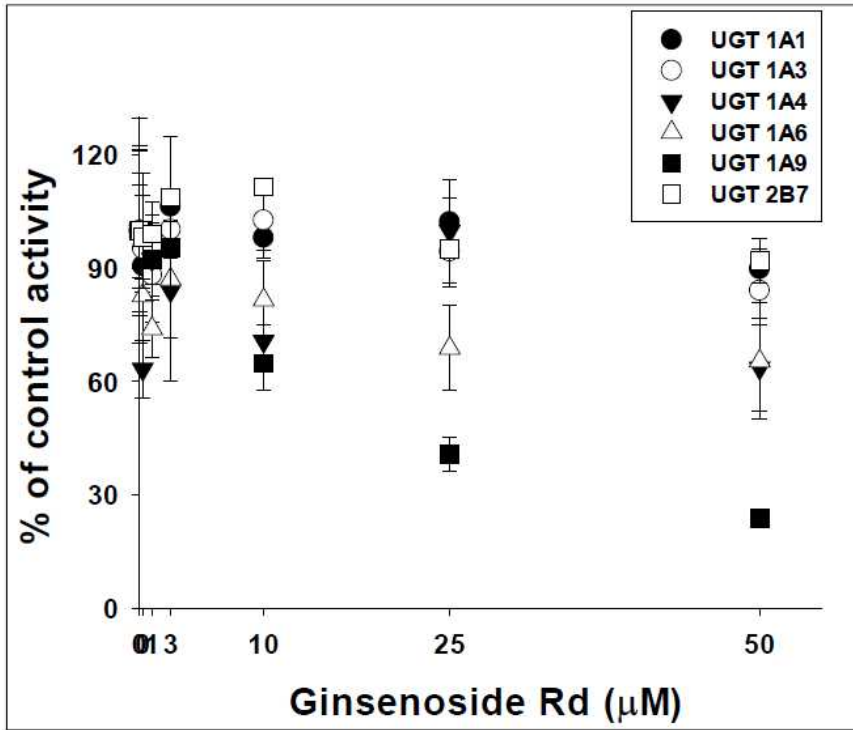
(나) 진세노사이드 Rb1의 6종 UGT 동효소 저해능 평가



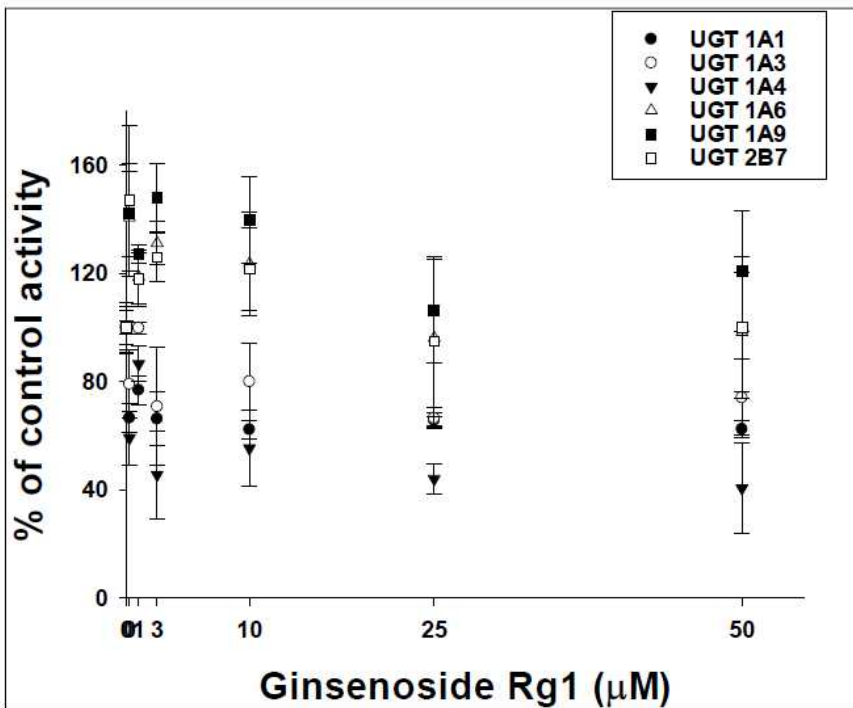
(다) 진세노사이드 Rb2의 6종 UGT 동효소 저해능 평가



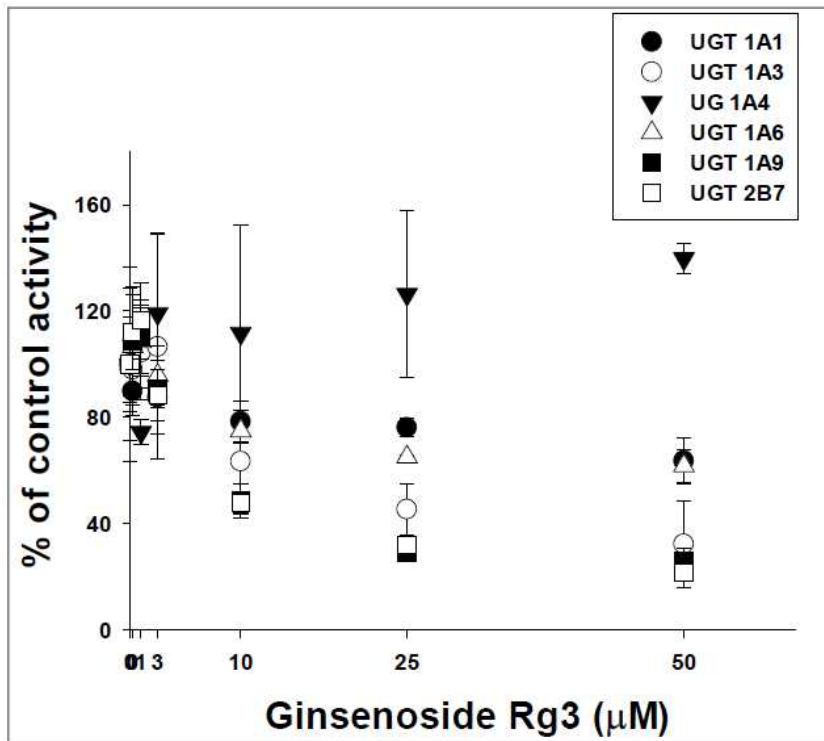
(라) 진세노사이드 Rd의 6종 UGT 동효소 저해능 평가



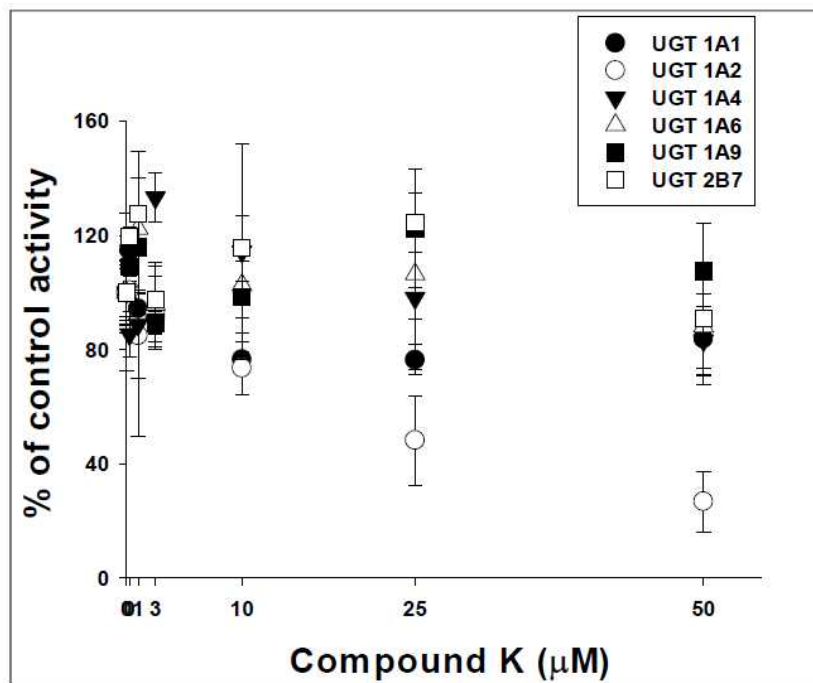
(마) 진세노사이드 Rg1의 6종 UGT 동효소 저해능 평가



(바) 진세노사이드 Rg3의 6종 UGT 동효소 저해능 평가



(사) 진세노사이드 compound K의 6종 UGT 동효소 저해능 평가



(3) 인삼의 활성물질의 수송활성 억제능 평가

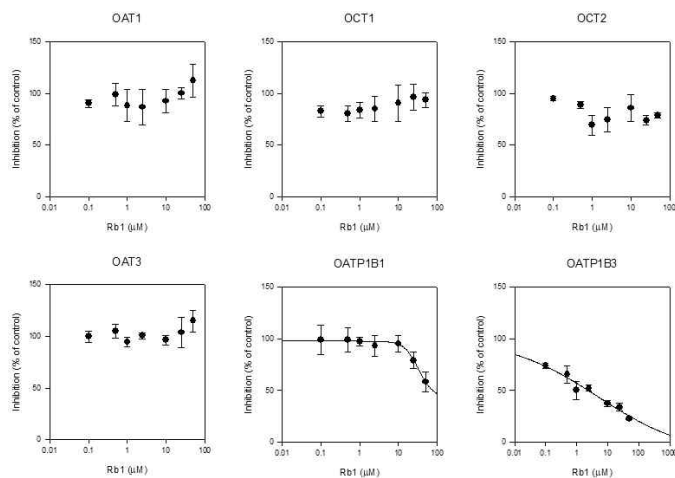
(가) Ginsenoside 9종의 수송계 저해성 평가 요약

Ginsenosides	IC ₅₀ (μM)					
	OCT1	OCT2	OAT1	OAT3	OATP1B1	OATP1B3
Rb1	> 50	> 50	> 50	> 50	33.1	4.8
Rb2	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	1.2
Rc	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	1.2
Rd	> 50	> 50	> 50	> 50	33.4	1.9
F2	> 50	> 50	27.8	> 50	> 50	> 50
Compound K	> 50	> 50	50.7	> 50	> 50	11.4
Panaxadiol	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Rg3	> 50	> 50	> 50	> 50	15.6	7.1
F1	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Rg1	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Rh1	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Rf	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Re	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Panaxatriol	nd	nd	> 50	10	48	32

nd: not determined

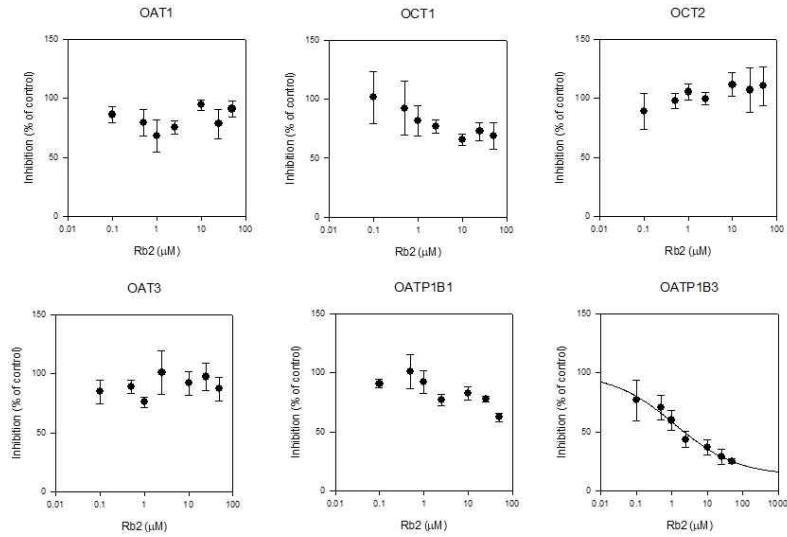
(나) Ginsenoside Rb1의 수송계 저해성 평가

- 0.1-50 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으며, OATP1B1과 OATP1B3에 대해서는 농도의존적 저해성을 나타내었다. 저해상수는 각각 33.1 μM 93.6 μM 이다.



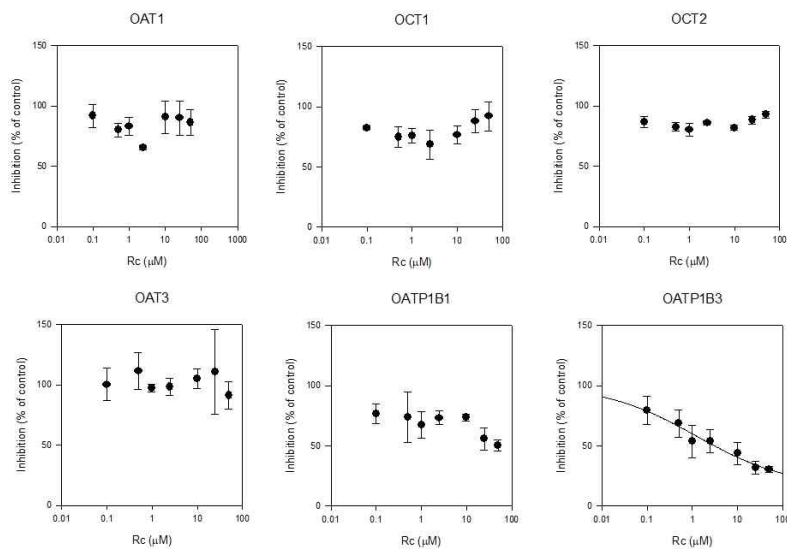
(다) Ginsenoside Rb2의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-50 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으며, OATP1B3에 대해서는 농도의존적 저해성을 나타내었다. 저해상수는 1.2 μM 이다.



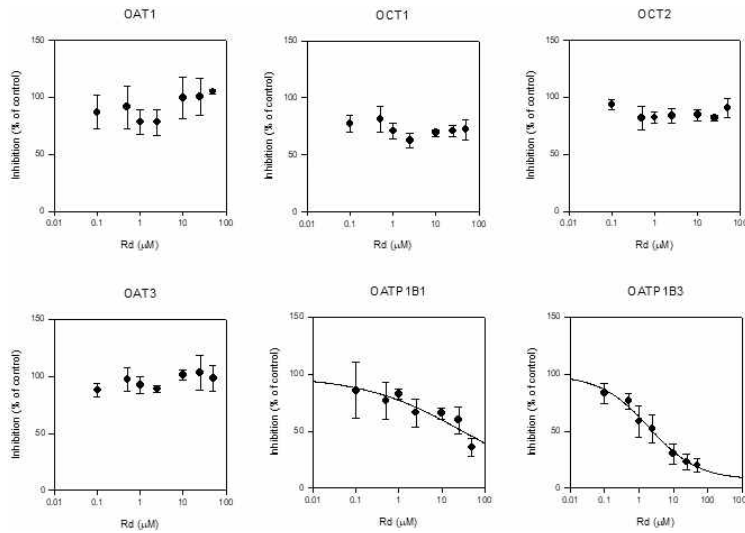
(라) Ginsenoside Rc의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-50 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으며, OATP1B3에 대해서는 농도의존적 저해성을 나타내었다. 저해상수는 1.2 μM 이다.



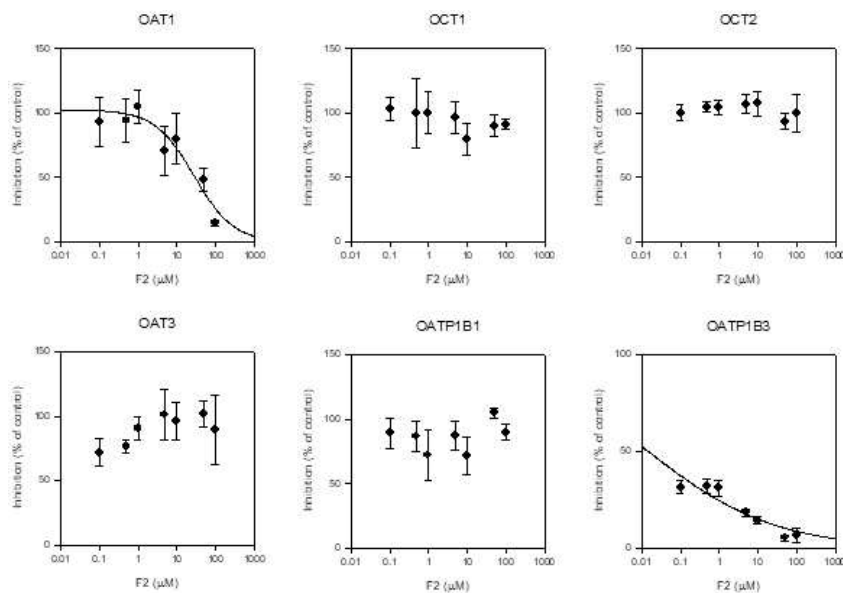
(마) Ginsenoside Rd의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-50 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으며, OATP1B1과 OATP1B3에 대해서는 농도의존적 저해성을 나타내었다. 저해상수는 각각 33.4 μM 과 1.2 μM 이다.



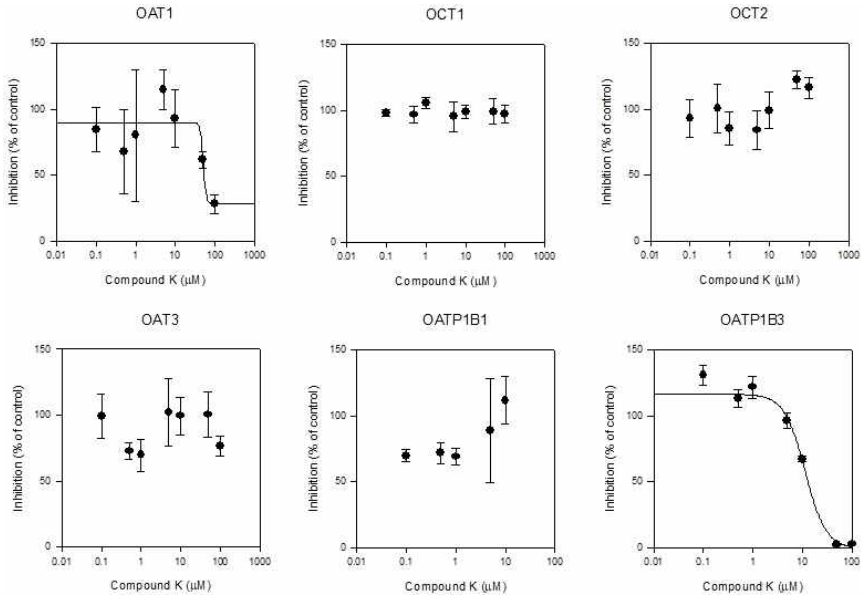
(바) Ginsenoside F2의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-100 μM 농도 범위에서 OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으며, OAT1, OATP1B3에 대해서는 농도의존적 저해성을 나타내었다. 저해상수는 각각 27.8, 0.01 μM 이다.



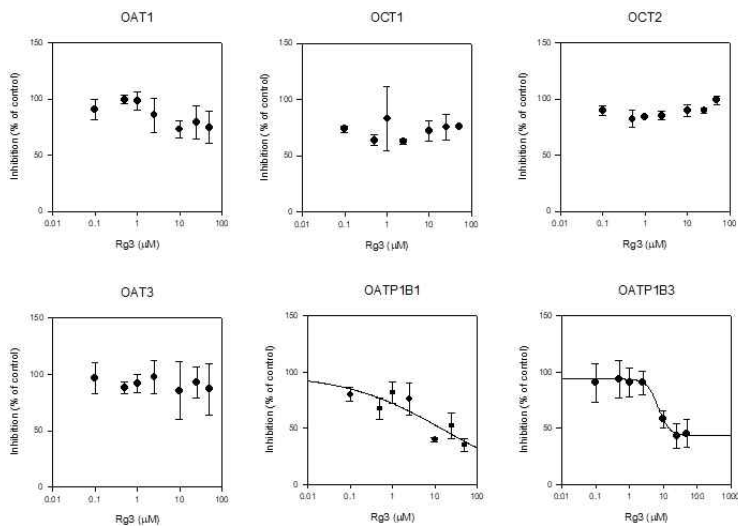
(사) Compound K의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-100 μM 농도 범위에서 OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으며, OAT1과 OATP1B3에 대해서는 농도의존적 저해성을 나타내었다. 저해상수는 각각 15.6, 7.1 μM 이다.



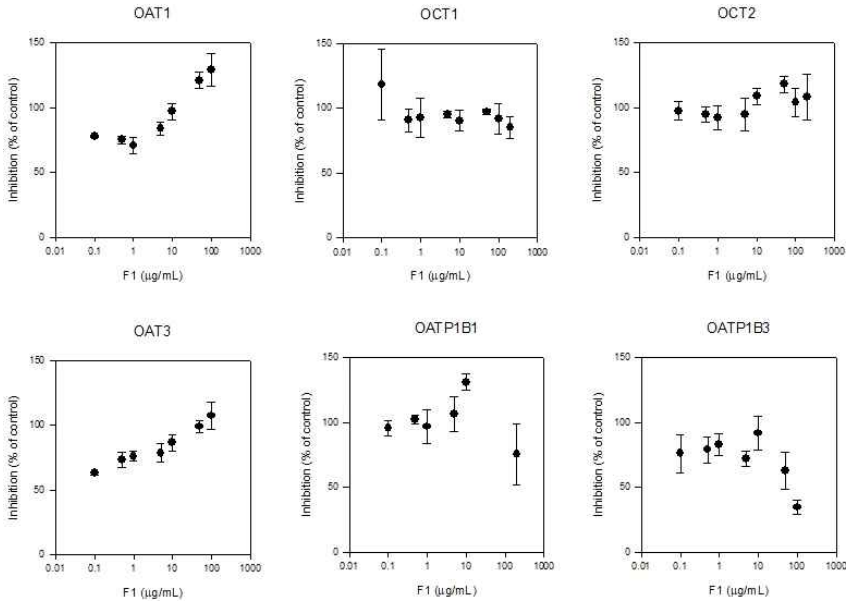
(아) Ginsenoside Rg3의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-50 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으며, OATP1B1과 OATP1B3에 대해서는 농도의존적 저해성을 나타내었다. 저해상수는 각각 33.4 μM 과 1.2 μM 이다.



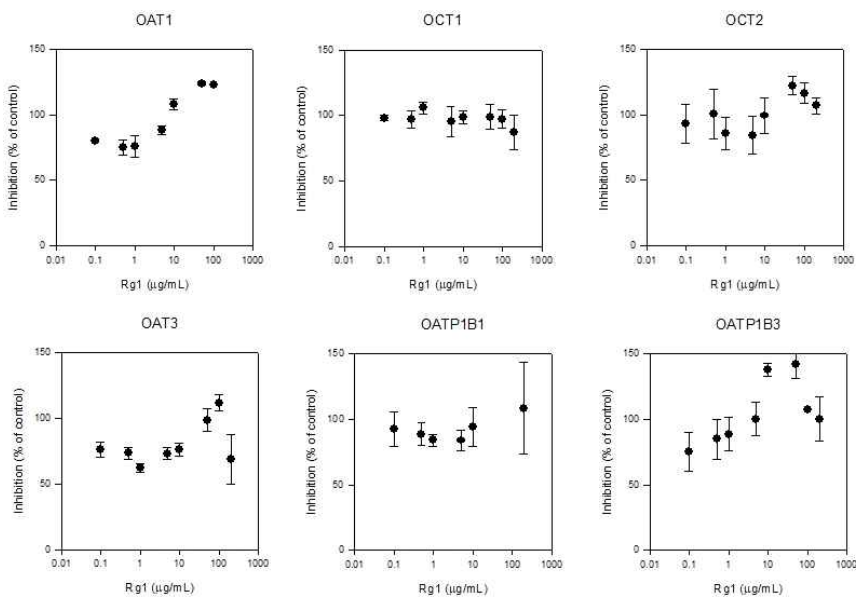
(자) Ginsenoside F1의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-100 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았으며, OATP1B3에 대해서는 농도의존적 저해성을 나타내었다. 저해상수는 52.4 μM 이다.



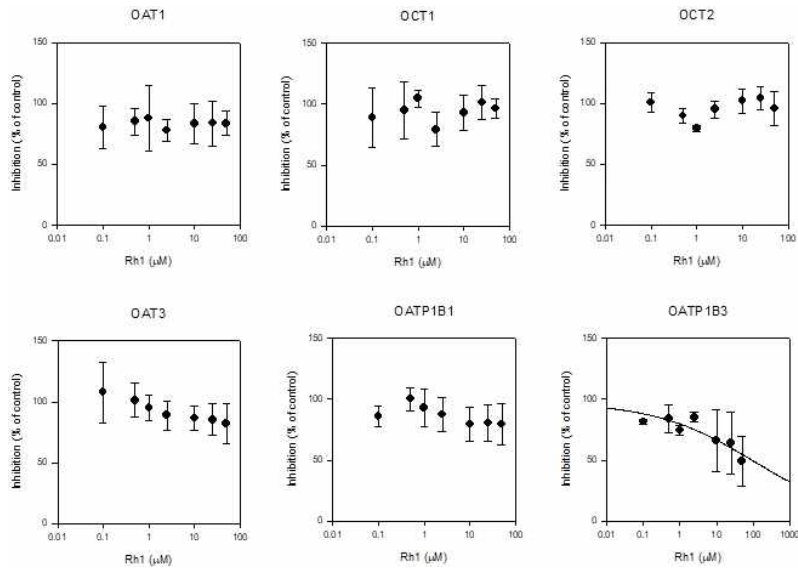
(차) Ginsenoside Rg1의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-100 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1, OATP1B3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았다.



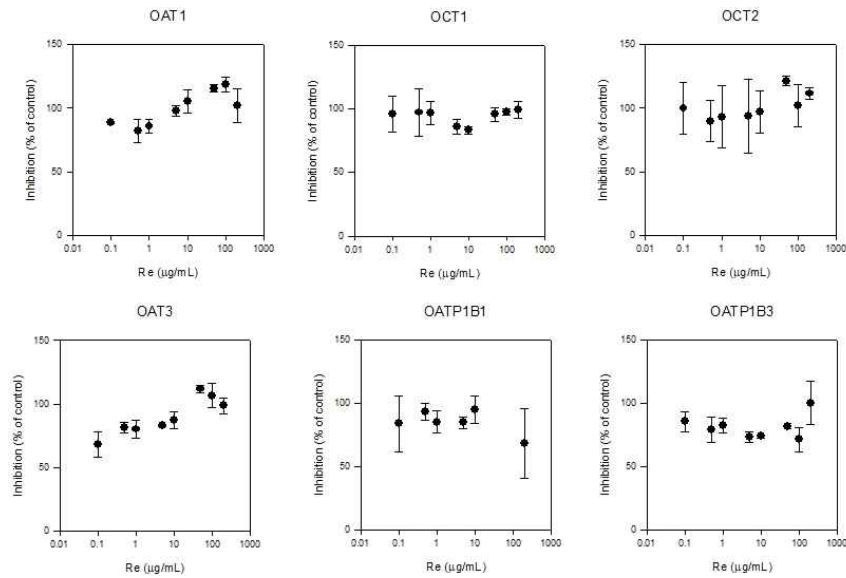
(카) Ginsenoside Rh1의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-50 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1과 OATP1B3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았다.



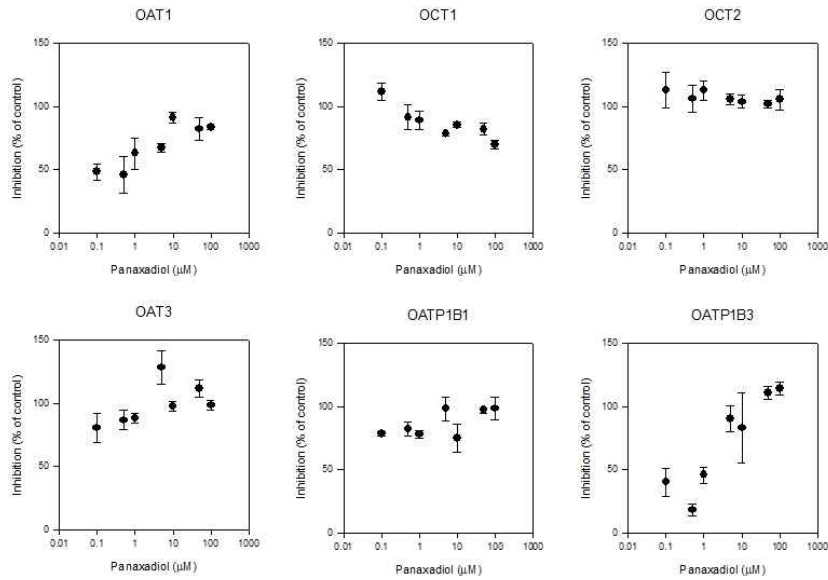
(타) Ginsenoside Re의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-100 μM 농도 범위에서 OAT1, OCT1, OCT2, OAT3, OATP1B1, OATP1B3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았다.



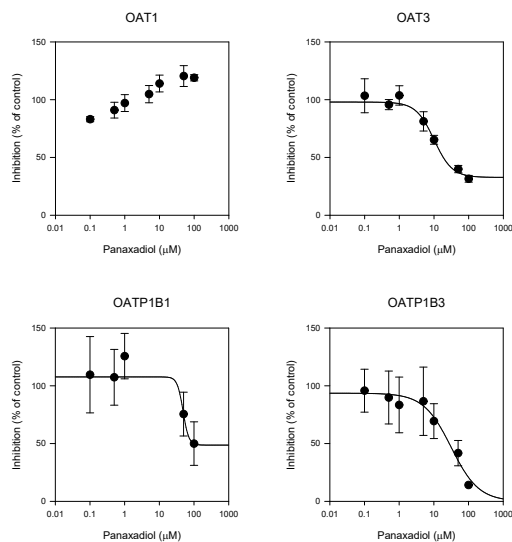
(과) Protopanaxadiol의 수송체 저해성 평가 :

- 0.1-100 μM 농도 범위에서 OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 유의적인 저해성은 보이지 않았다.



(하) Protopanaxatriol의 수송체 저해성 평가 :

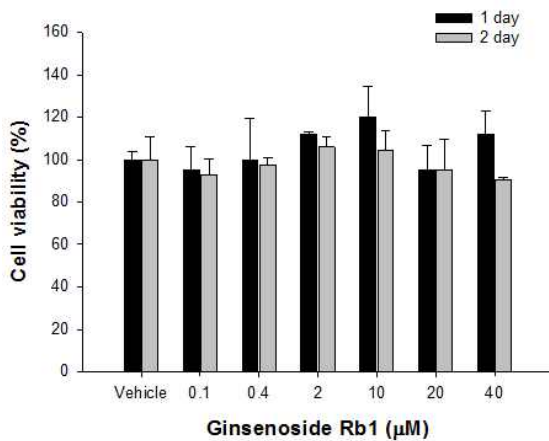
- 0.1-100 μM 농도 범위에서 OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3의 수송활성에 대한 저해성을 평가한 결과 OAT1에 대해 유의적인 저해성은 보이지 않았으나, OAT3, OATP1B1, OATP1B3의 수송활성을 농도의존적으로 저해하였으며, 저해상수 IC_{50} 값은 10, 48, 32 μM 임.



(4) Ginsenoside의 대사/수송체 활성 유도능 평가

(가) 사람 hepatocytes에서 ginsenoside Rb1의 간세포독성에 미치는 영향

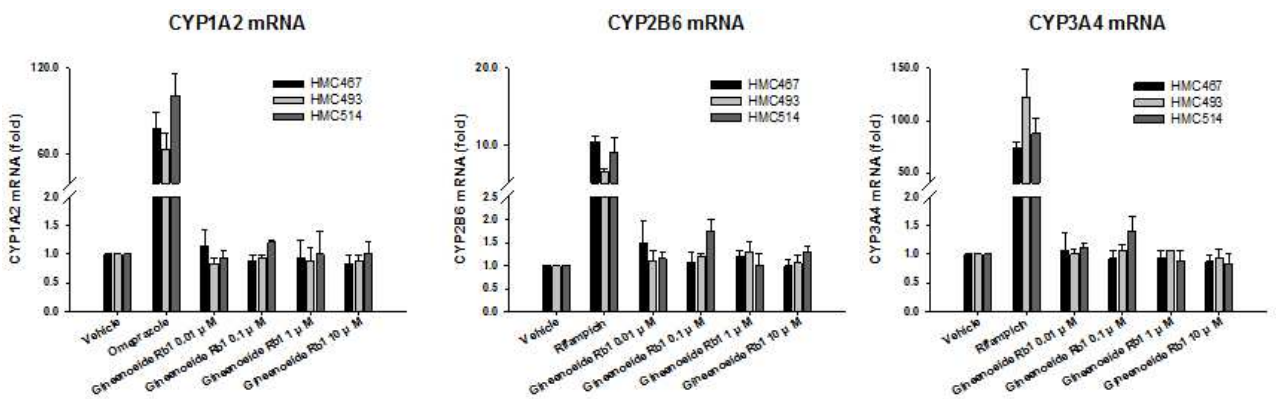
- 사람 hepatocytes HMC467에 Ginsenoside Rb1을 0.1, 0.4, 2, 10, 20, 40 mM 농도로 처리 후 MTS법으로 세포독성을 측정한 결과, Ginsenoside Rb1은 0.1-40 mM 농도 범위에서 세포 독성이 나타나지 않았다.
- 3종의 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 Ginsenoside Rb1을 0.01, 0.1, 1, 10 mM을 2일간 처리하였을 때, 세포 독성은 관찰되지 않았다.



Cytotoxicity of Ginsenoside Rb1 in cryopreserved human hepatocytes, HMC467 using MTS assay

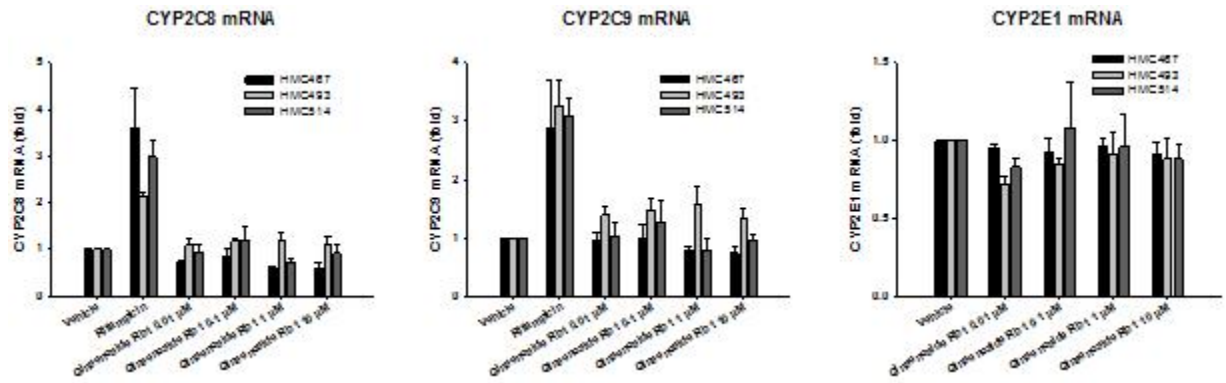
(나) 사람 hepatocytes에서 ginsenoside Rb1의 대사/수송체 활성 유도능 평가

- 3종의 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 Ginsenoside Rb1 0.01, 0.1, 1, 10 mM 처리 후 CYP1A2, CYP2B6 및 CYP3A4 mRNA 발현은 vehicle 대비 변하지 않았으므로 약물상호작용 유발 가능성은 낮을 것이다

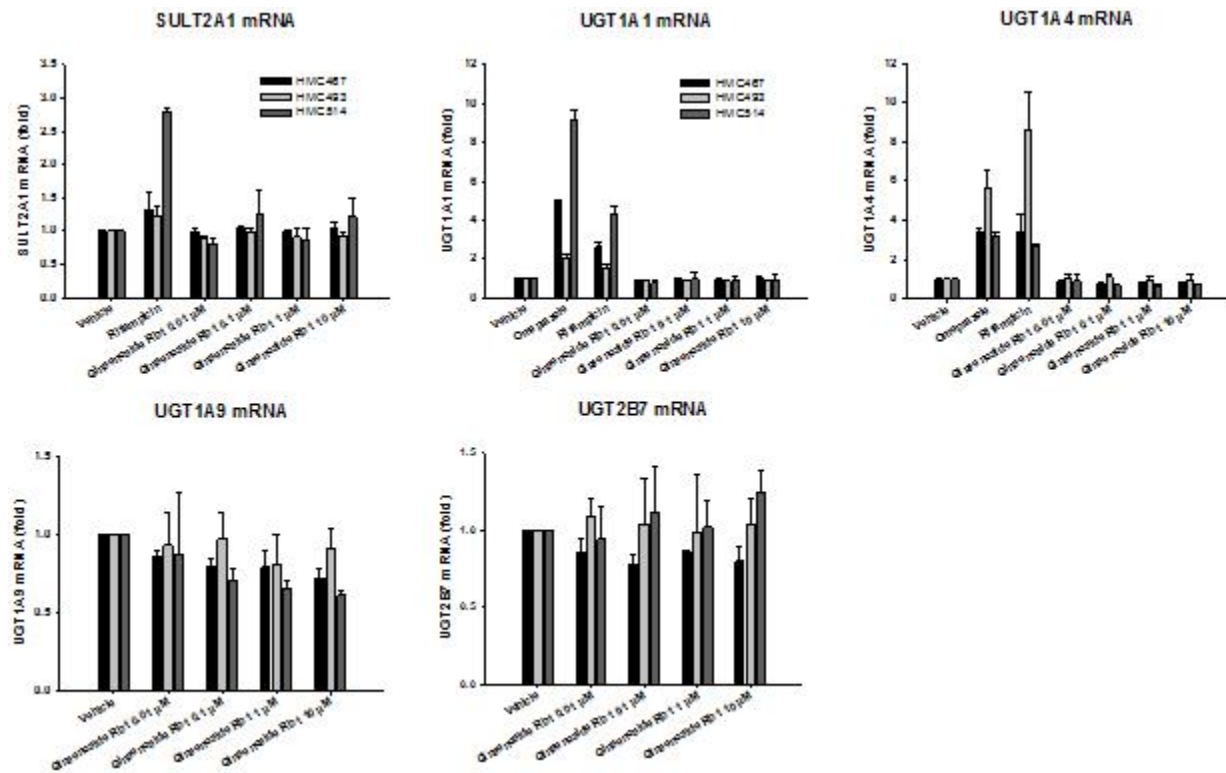


Effect of Ginsenoside Rb1 on the mRNA levels of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 after 48 h treatment in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514

- 사람 hepatocytes HMC467, HMC493, HMC514에 Ginsenoside Rb1 0.01, 0.1, 1, 10 mM 처리 후 CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1, SULT2A1, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B7, P-gp 및 BCRP mRNA 발현은 vehicle 대비 변화되지 않았으므로 약물상호작용 유발 가능성은 낮은 것으로 예측된다

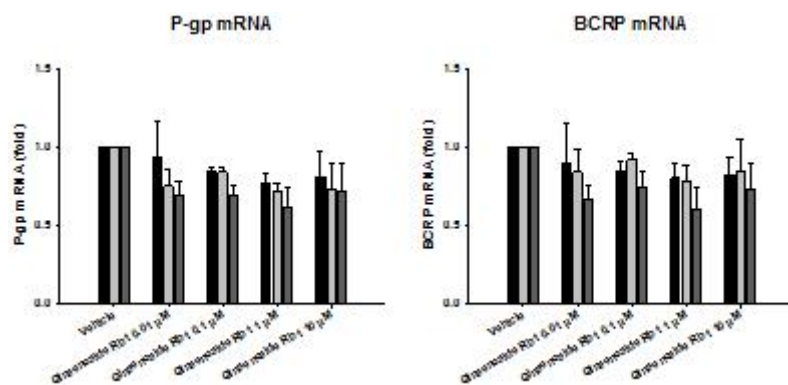


Effect of Ginsenoside Rb1 on the mRNA levels of CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 after 48 h treatment in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.



Effect of Ginsenoside Rb1 on the mRNA levels of SULT2A1, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9, UGT2B7 after 48 h treatment in the cryopreserved three independent human hepatocytes,

HMC467, HMC493 and HMC514.



Effect of Ginsenoside Rb1 on the mRNA levels of P-gp, and BCRP after 48 h treatment in the cryopreserved three independent human hepatocytes, HMC467, HMC493 and HMC514.

2-6. 홍삼 반복투여 시 CYP 약물대사효소(CYP3A, CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19) 및 수송체 (OATP1B1)에 미치는 영향을 평가하여 약동학적 상호작용을 확인하기 위한 1상 임상시험 수행

(1) 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립

(가) 홍삼과 ‘in vivo cocktail’ 약물 투여 용량 및 용법 확립

- in vivo cocktail에 사용된 약물 및 용량은 다음 표와 같음

약물 및 용량	대사효소
midazolam 2 mg	CYP3A
dextromethophan 30 mg	CYP2D6
caffeine 100 mg	CYP1A2
losartan 50 mg	CYP2C9
omeprazole 20 mg	CYP2C19
pitavastatin 2 mg	OATP1B1

- 각 기질은 인체 대사효소 및 수송체의 가장 대표적인 기질로 FDA/EMA의 임상 1상 상호작용 연구시 명시되어 있는 기질이며 다른 효소에 대한 저해성이 없어 상호간의 영향을 주지않는 기질과 투여용량으로 선정하였고, clinical pharmacology and therapeutics (2007)에 게재된 in vivo cocktail 조성임

(나) 홍삼 및 ‘in vivo cocktail’ 약물 선정

- 홍삼

- 제품명: 홍삼정올데이
- 제조회사: 풍기인삼농협
- 제형 및 성상: 갈색의 액상제품

- Midazolam

- 제품명: 부광미다졸람주사
- 제조회사: 부광약품(주)
- 주성분: 1정 중 midazolam 3mg
- 제형 및 성상: 무색 맑은 용액이 충전된 무색의 앰플 주사제
- 효능 및 효과:
 - 1) 수면 리듬 변화 및 수면장애, 특히 잠들기 어려운 불면증이나 새벽에 잠이 깬 후의 수면발현 곤란
 - 2) 외과수술 또는 진단 처치 전 진정

· 용법 및 용량:

1) 수면장애

성인: 미다졸람으로서 7.5-15 mg 취침 전에 경구 투여한다.

고령자, 쇠약환자 및 간·신기능장애 환자: 이 약으로서 7.5mg 취침 전에 투여한다.

2) 진정

주사제가 선택되지 않는 한 이 약으로서 15 mg을 수술 30-60분 전에 투여한다.

· CYP3A probe drug

- Dextromethorphan

· 제품명: Robitussion Long-Acting CoughGels®

· 제조회사: Pfizer Inc., USA

· 주성분: 1정 중 dextromethorphan hydrobromide 15 mg

· 제형 및 성상: 유상의 내용물이 든 R이 새겨진 붉은색의 연질캡슐

· 효능 및 효과: 감기와 함께 발생할 수 있는 인후통과 기관지염의 일시적 진해 작용

· 용법 및 용량: 성인 또는 12세 이상 소아에 한해서 필요시 6-8시간 마다 2정 복용하며 1일 최대 복용량은 8정으로 제한한다.

· CYP2D6 probe drug

- Caffeine

· 제품명: JET-ALERTTM

· 제조회사: Bell pharmaceuticals Inc., USA

· 주성분: 1정 중 caffeine 200 mg

· 제형 및 성상: 한면에 200이 새겨진 노란색의 타원형 캡슐 형상

· 효능 및 효과: 피로 또는 졸음 시 정신적 또는 신체적 각성

· 용법 및 용량: 성인 또는 12세 이상 소아에 한해서 필요시 6-8시간 마다 2정 복용하며 1일 최대 복용량은 8정으로 제한한다.

· CYP1A2 probe drug

- Losartan

· 제품명: 코자®정

- 제조회사: 한국엠에스디(유)
- 주성분: 1정 중 losartan potassium 50 mg
- 제형 및 성상: 한면에 952가 새겨진 백색의 타원형 필름코팅정
- 효능 및 효과:
 - 1) 고혈압
 - 2) 고혈압의 치료요법으로서, 고혈압을 가진 제 2형 당뇨병 환자의 신장병
- 용법 및 용량:
 - 1) 고혈압(성인) 초회량과 유지량은 로사르탄칼륨으로서 1일 1회 50mg 경구투여
- CYP2C9 probe drug

- Omeprazole

- 제품명: 유한로섹®캡슐
- 제조회사: (주)유한양행
- 주성분: 1정 중 omeprazole 20 mg
- 제형 및 성상: 백색 내지 옅은 다갈색의 장용성 과립이 충전된 상부 적갈색 하부 분홍색의 경질 캡셀
- 효능 및 효과:
 - 1) 위궤양, 십이지장궤양의 단기치료
 - 2) 역류성 식도염 및 위식도 역류질환(GERD)의 증상(가슴앓이, 토출 등) 치료
- 용법 및 용량: 오메프라졸로서 1회 1캡셀(20mg), 1일 1회 경구 투여한다.
- CYP2C19 probe drug

- Pitavastatin

- 제품명: 리바로®정
- 제조회사: 제이더블유중외제약(주)
- 주성분: 1정 중 pitavastatin calcium 2 mg
- 제형 및 성상: 활선이 추가된, 매우 얇은 황적색의 원형필름코팅정
- 효능 및 효과:
 - 1) 원발성 고콜레스테롤 혈증(이형접합 가족형 및 비가족형, Fredrickson type IIa) 및 혼합형 이 상지질혈증환자(Fredrockson type IIb)의 상승된 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 아포-B 단백 및 트리글리세라이드치를 감소시키고 HDL-콜레스테롤을 증가시키는 식이요법의 보조제

2) 이형접합 가족형 고콜레스테롤혈증을 가진 10세 이상 ~ 16세 이하의 소아환자의 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 아포-B 단백 수치를 감소시키는 식이요법의 보조제

① LDL-콜레스테롤이 여전히 190 mg/dL 이상(≥ 190 mg/dL) 이거나

② LDL-콜레스테롤이 여전히 160 mg/dL 이상(≥ 160 mg/dL) 이고, 조기 심혈관 질환의 가족력이 있는 경우 또는 해당 소아환자에서 한 가지 이상의 다른 심혈관계 질환의 위험인자가 있는 경우

· 용법 및 용량:

이 약을 투여전 및 투여중인 환자는 반드시 표준 콜레스테롤 저하식을 해야 한다

1) 성인의 경우 통상 초회용량으로 피타바스타틴칼슘으로서 1회 1~2밀리그램을 1일 1회 복용한다. LDL-콜레스테롤치의 저하효과가 충분하지 않은 경우 1일 최대 4 밀리그램까지 증량할 수 있다. LDL-콜레스테롤치, 치료목표 및 환자의 반응에 따라 4주 또는 그 이상의 간격을 두고 용량을 적절히 증감하며, 이약의 치료효과는 지속적인 투여로 유지된다.

2) 이형접합 가족형 고콜레스테롤혈증 소아환자(10세~16세): 피타바스타틴칼슘으로서 1밀리그램을 1일 1회 복용한다. LDL-콜레스테롤치의 저하효과가 충분하지 않은 경우, 1일 최대 2밀리그램까지 증량할 수 있다.

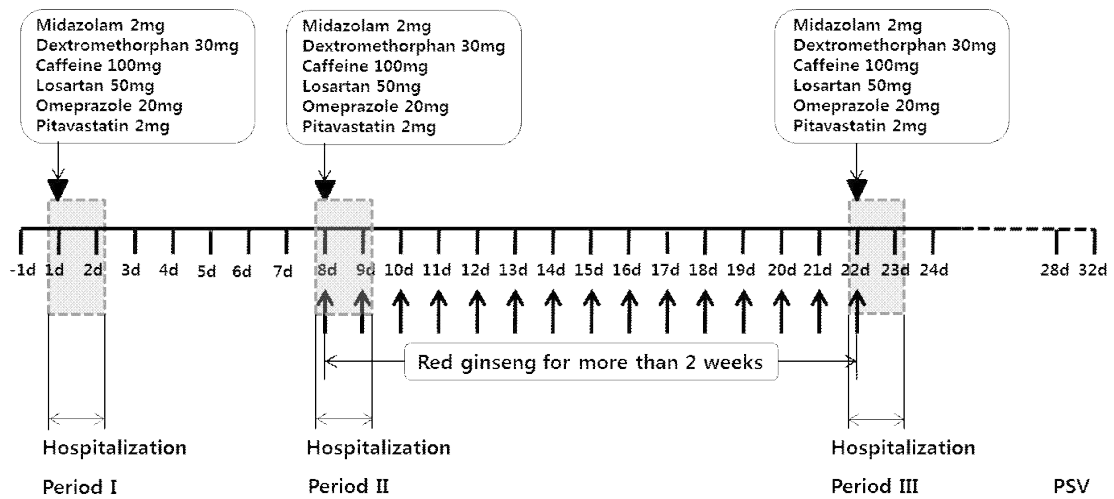
· OATP1B1 probe drug

(다) 시험디자인 확립

- open-label, randomized, three-period, single-sequence design

- 건강한 대상자에게 공복 상태에서 in vivo cocktail 약물(midazolam, dextromethorphan, caffeine, losartan, omeprazole, pitavastatin)을 각 시기별로 단회 투여

-홍삼과 in vivo cocktail 약물 간 상호작용 평가를 위하여 2기와 3기(8d~22d)는 홍삼농축액을 반복 투여한 후 정해진 일정에 따라 채혈 및 채뇨를 시행하였음



(2) 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 작성 : 본 임상시험은 경북대학교병원 임상시험 센터에서 실시하였고, 임상연구책임자는 윤영란 교수이며 2017년 06월 01일부터 2017년 07월 18일에 수행하였음.

○ 대상자 선정·제외 기준 확립 및 대상자수 산출

- 선정기준

- 스크리닝 검사 당시 연령이 만 19세 이상 건강한 한국인 성인 남성
- 체중이 50kg 이상이면서, 계산된 이상체중(IBW)의 ± 20% 범위 이내에 해당하는 자
 - ☞ $IBW(kg) = \{신장(cm) - 100\} * 0.9$
- 선천성 또는 만성질환이 없고 내과적인 진찰결과 병적 증상 또는 소견이 없는 자
- 임상연구용 제제 투여 전 4주 이내에 담당의사가 제제의 특성에 따라 설정·실시한 혈청검사, 혈액화학검사, 혈액화학검사, 요검사 등 임상실험실검사와 심전도 검사 결과 대상자로 적합하다고 판정된 자
- 본 임상시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

- 제외기준

- 임상연구용 제제의 주성분 또는 다른 구성성분에 과민증 환자나 기타 다른 약물 혹은 첨가제 등에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
- 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설에 영향을 미칠 수 있는 병력 (간/담도계, 신장, 심혈관계, 내분비계, 호흡기계, 소화기계, 혈액종양, 중추신경계, 정신질환,

- 근골격계 등)을 가진 자
- 임상연구용 제제의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(염증성장질환, 활동성 소화성 궤양 등)이 있거나 위장관계 수술(단, 단순 맹장 수술이나 탈장 수술은 제외)을 받은 자
- 활력징후에서 좌위수축기혈압 $\geq 140\text{mmHg}$ 또는 $< 115\text{mmHg}$, 좌위이완기혈압 $\geq 90\text{mmHg}$ 또는 $< 70\text{mmHg}$ 에 해당하는 자
- 약물남용의 과거력이 있는 자
- 약물의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 영향을 줄 수 있는 비정상적인 식사를 해온 자(예: 자몽주스(하루 1L이상)를 임상연구용 제제 투여 이전 7일 이내에 섭취)
- 혈청검사(HBsAg, HCV Ab, HIV Ag/Ab, VDRL)결과 양성인 자
- 갈락토오스 불내성(galactose intolerance), Lapp 유당분해효소 결핍증(Lapp lactase deficiency) 또는 포도당-갈락토오스 흡수장애 (glucose-galactose malabsorption) 등의 유전적인 문제가 있는 자
- 유전성 혈관부종 환자이거나 ACE 억제제 혹은 안지오텐신 II 수용체 차단제 치료 시 혈관부종의 병력이 있거나 원발 고알도스테론증 환자
- 연구책임자 및 연구담당자(담당의사)의 판단에 따라 임상연구 참여가 부적합하다고 판단된 자

- 대상자수

- 홍삼 투여에 의한 주요 약물대사효소 및 수송체 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위한 약물상호작용 시험으로, 연구의 성격이 통계적 가설을 검증하는 것이 아니기 때문에 연구목적에 충족시키는 한도 내에서 최소한의 대상자 수로 진행하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.
- 제 1상 임상시험에서 단일 용량에 배정되는 대상자 수가 통상 6~10명 정도임을 감안하고 중도탈락율을 고려하여 본 임상시험에서는 총 15명을 대상으로 임상시험을 수행하였음.

○ 채혈시점, 횟수, 채혈량 등 채혈방법에 관한 문헌고찰 및 확립

- 약물 투여 전 시험대상자의 팔 또는 손등의 정맥부위에 saline-locked angiocatheter를 삽입하여, 기저치 혈액(0h)을 채취하고 saline 1.5 mL를 주입하여 혈액응고를 방지하였음.
- 약동학적 평가를 위해 각 시기별 투약 전(1d, 8d, 22d) 0h 및 투약 후 0.25,

0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 48h(총 16회)에 걸쳐 채혈하였음.

- 채혈된 혈액은 EDTA tube에 취해 30분 이내에 3000rpm으로 10분 동안 원심 분리하고 상층액의 혈장만을 취하여 분석 시까지 -70℃에 냉동 보관하였음.
- 채혈 시 감염을 방지하기 위하여 대상자들의 혈액채취는 일반인들의 출입이 통제된 격리된 방에서 실시하였으며, 사용하는 기구는 완전 멸균된 1회용으로 하였음.

(3) 경북대병원 임상시험심사위원회(IRB) 심의

- 연구계획서 및 CRF 등 IRB 제출서류 filing
- IRB 심의 및 승인 득함
 - 승인일: 2017년 5월 17일

KNUH201704010001-HE001		2013.12.23 개정본	
통지서			
본 연구의 문서보존기간은 15년입니다.			
수신	의뢰(지원)기관	농림수산식품부	
연구책임자	의상시험센터	윤영만	
IRB File No.	KNUH 2017-04-010-001	심사내용	시정계획서
		총지명자	2017.05.17
연구과제명	국문	건강한 한국인 성인에서 홍삼 투여 시 CYP 약물대사효소 및 수송체에 미치는 영향을 평가하여 약동학적 상호작용을 확인하기 위한 연구	
	영문	A study to assess pharmacokinetic interactions by evaluating the effect of red ginseng on CYP drug metabolizing enzymes and transporter in healthy Korean adults	
임상시험코드	Study Nick Name		
연구분류1	<input checked="" type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 의료기술 <input type="checkbox"/> 의료기기 (○ 1등급 ○ 2등급 ○ 3등급 ○ 4등급) <input type="checkbox"/> 해당사항 없음		
	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 기타 ()		
연구분류2	<input type="checkbox"/> 인체유래물(검체)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료 <input type="checkbox"/> 체세포핵재배연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구 <input type="checkbox"/> 기타 ()		
연구분류3	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구 <input type="checkbox"/> 후향적 연구 <input type="checkbox"/> 전향적 & 후향적 병행연구		
연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구 <input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 종단조사연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구) <input type="checkbox"/> 기타 ()		
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)		
일반명	midazolam 3mg/3ml, dextromethorphan 15mg,caffeine 100mg,losartan potassium 50mg, omeprazole 20mg,pitavastatin calcium 2mg,홍삼농축액 10ml	상품명	부경미디올(주)사.Tussin Cough, JET-TM,쿠치,유한로식,리바로 2mg,홍삼농축액
현재	15명	국내	15명
본원	15명		
연구승인기간	2017.05.17 ~ 2018.05.16		
지원의뢰기관	기관명	농림수산식품부	대표(직위)
			성명

(4) 대상자 모집 및 스크리닝 검사 시행

- 지원자는 건강한 한국인 성인 남성으로 본 시험 참여에 서면 동의한 자 가운데 선정기준을 만족하고, 제외기준에 해당하지 않으며 시험자가 본 시험에 적합하다고 확인한 자를 최종 대상자로 선정하였음.
- 대상자는 시험에 참여하기 전에 해당 임상시험과 관련된 충분한 정보를 대상자 설명서를 통해 제공받았고, 대상자의 자유의사에 따라 서면 동의서를 받았음.

- 대상자의 동의서에는 대상자의 서명과 동의일을 기록하였고 서명된 동의서와 동의 설명문의 사본 1부는 시험대상자 본인에게 배부되었으며, 서명된 동의서 원본은 경북대학교병원에 적절히 보관되었음.
- 총 15명의 지원자가 스크리닝 검사를 시행하였고 최종 스크리닝을 전체 통과함.
- 중도탈락 없이 15명의 모든 대상자가 임상시험 과정을 완료함.

Table 1. Subject disposition

	Total (N)
Screened	15
Enrolled	15
Completed	15

Table 2. Summary of demographic characteristics

	N	Mean	SD	Median	Min	Max
Age (years)	15	24.9	1.8	25.0	22.0	28.0
Weight (kg)	15	68.8	6.3	68.2	57.1	80.8
Height (cm)	15	173.6	5.0	174.4	159.9	182.3

(5) 임상시험 진행 및 임상시료(혈장과 뇨) 확보

Table 3. Summary of study dates

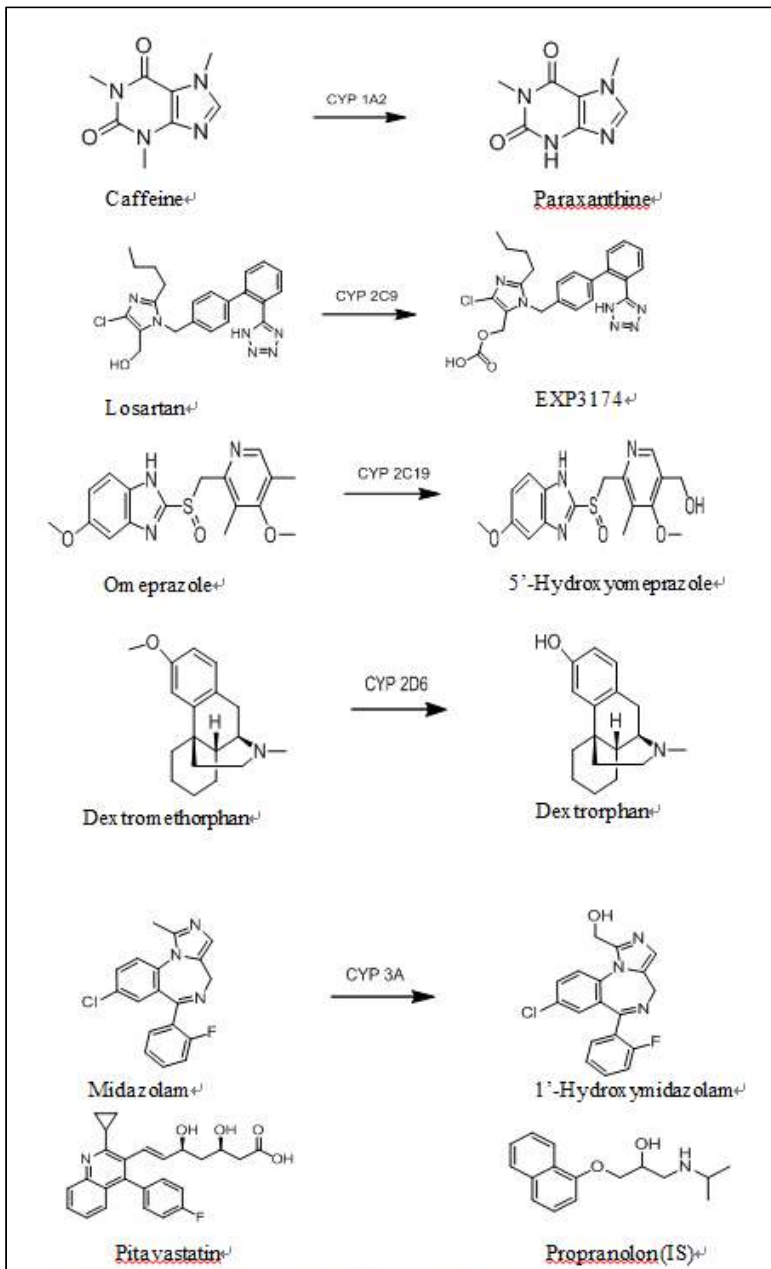
Treatment period	Date
1	2017.06.09 ~ 2017.06.12
2	2017.06.16 ~ 2017.06.19
3	2017.06.30 ~ 2017.07.03

- 첫 투여 전 혈장 및 뇨 시료 확보 후 홍삼 반복투여 시작
- 1,2기 마지막 투여일 전날 저녁 8시경에 경북대병원 임상시험센터에 입원하여 퇴원할때까지 식이 및 활동 등을 조절하도록 함.
- 입원 다음 날 오전 투여 전에 대상자 전원에게 팔 또는 손등의 정맥부위에 iv catheter 거치
- 오전 8시경 대상자 모두에게 홍삼 또는 홍삼+in vivo cocktail 약물을 투여하고 계획된 시점에 혈장 및 뇨 시료 채취
- 혈액은 혈구분리용 원심분리관에 넣고 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 즉시 혈장 분리관을 사용하여 혈장을 취함
- 혈액시료는 분석 시까지 -70℃에서 보관함

(6) 임상시험 후 혈장시료에서 투여 약물 분석

○ 11종 약물 동시 분석법 개발

- 분석대상 약물 및 대사체: caffeine, paraxanthine, losartan, EXP-3174, omeprazole, 5-hydroxyomeprazole, dextromethorphan, dextrophan, midazolam, 1'-hydroxymidazolam, pitavastatin
- 내부표준물질: propranolol



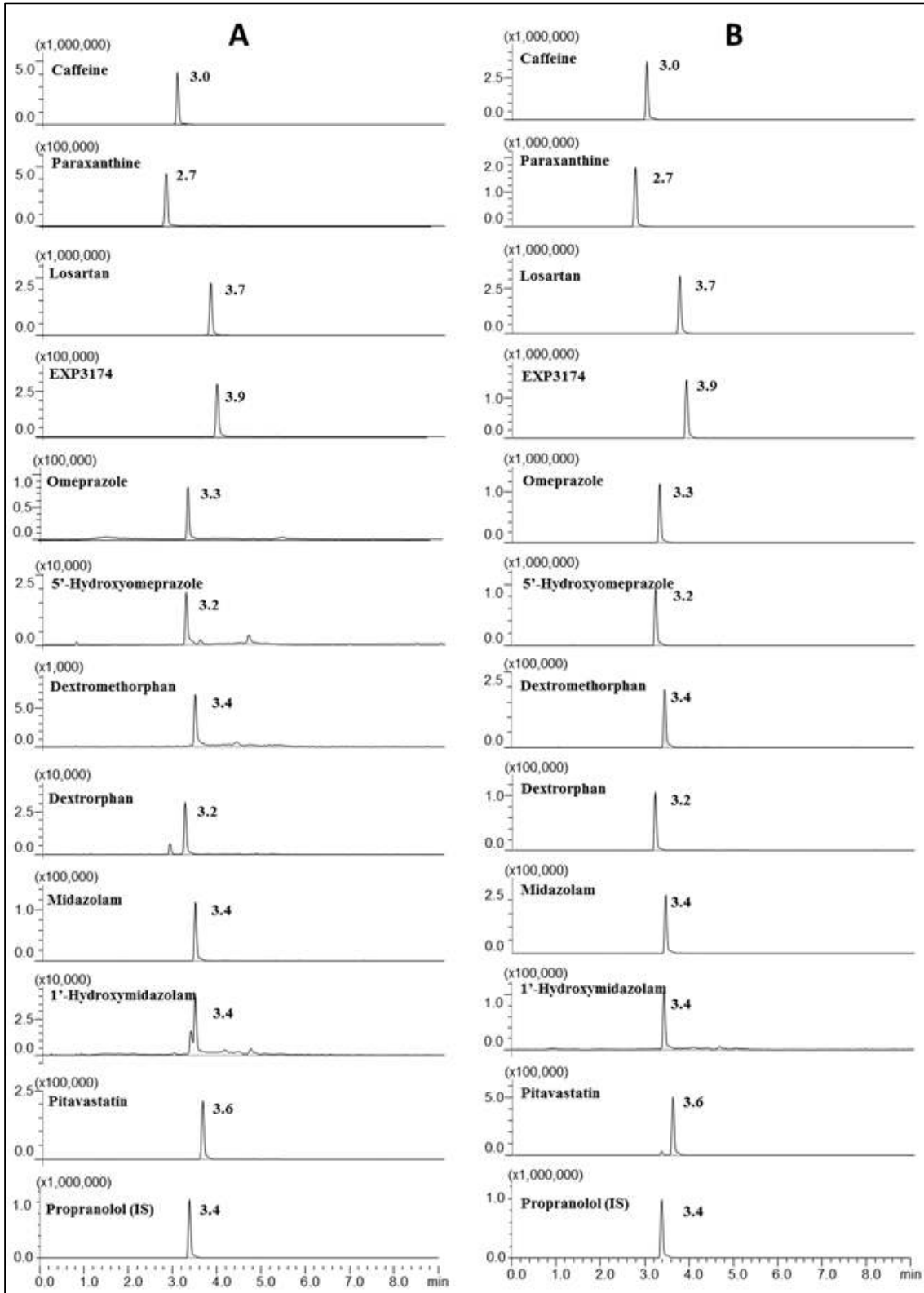
- LC-MS/MS 분석조건

HPLC Operating condition						
Model	Shimadzu® UPLC					
Column	① DDI assay : X bridge C18, 100 × 2.1 mm i.d., 3.5 μm, 100 Å (Waters Corporation, Milford, MA, USA) , #20 Column					
Run time	① 9 min	Flow rate	300 μL/min	Inj. volume	5 μL	
Solvent	A. Water (containing 0.1% Formic acid) B. Acetonitrile (containing 0.1% Formic acid)					
Gradient	B: 5 % (0-1 min) → 5-80 % (1-3 min) → 80% (3-4 min) → 5% (4.1-9min)					
MS Operating condition						
Model	LC-MS/MS 8040 (Shimadzu®)					
Spray Vol.	Vaporizer Temp.	Capillary Temp.	Sheath (Neb) Gas	Ion Sweep Gas	Aux Gas	Drying Gas
(+) 4000 V (-) 3500 V	300°C	250°C	3 L/min	2.0 Arb	10 Arb	8 L/min
Gas	Neb/Dry/Aux gas		Nitrogen	Collision gas	Argon	
MS/MS	Collision energy		15-40 eV	CID gas pressure	230 KPa	
SRM (ESI ⁺)	Caffeine (195 > 138, CE : 20), Paraxanthine (181 > 124, CE : 20), Losartan (423 > 207, CE : 23), EXP3174 (437 > 235, CE : 20), Omeprazole (346 > 198, CE : 15), 5-Hydroxy omeprazole (362 > 214, CE : 15), Dextromethorphan (272 > 171, CE : 37), Dextrophan (258 > 157, CE : 40), Midazolam (326 > 291, CE : 27), 1'-Hydroxy midazolam (342 > 324, CE : 23), Propranolol(IS) : 261 > 184, CE :20, Pitavastatin (422 > 290, CE : 33)					

- LC-MS/MS 분석조건

Analyte	Polarity	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	CE (eV)
Caffeine	+	195.0	138.0	20
Paraxanthine	+	181.0	124.0	20
Losartan	+	423.0	207.0	23
EXP3174	+	437.0	235.0	20
Omeprazole	+	346.0	198.0	15
5'-Hydroxyomeprazole	+	362.0	214.0	15
Dextromethorphan	+	272.0	171.0	37
Dextrophan	+	258.0	157.0	40
Midazolam	+	326.0	291.0	27
1'-Hydroxymidazolam	+	342.0	324.0	23
Pitavastatin	+	422.0	290.0	33
Propranolol(IS)	+	261.0	184.0	20

- 표준품 (B) 및 피험자 혈장 시료 (A) 중 약물농도 분석 크로마토그램



- 분석법 검증: 정밀성 및 정확성

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Intraday (n=5)			Inter-day (n=6)		
		Measured (ng/mL)	RSD (%)	Accuracy (%)	Measured (ng/mL)	RSD (%)	Accuracy (%)
Caffeine	20.00	22.15 ± 0.44	1.99	110.74	21.84 ± 0.77	3.53	109.20
	100.0	110.24 ± 2.19	1.99	110.24	103.60 ± 4.02	3.88	103.60
	1000	1071.00 ± 26.50	2.47	107.10	975.76 ± 28.02	2.84	97.58
Paraxanthine	20.00	22.19 ± 0.45	2.04	110.94	21.46 ± 0.80	3.71	107.30
	100.0	113.93 ± 0.75	0.66	113.93	102.58 ± 4.24	4.13	102.58
	1000	1073.83 ± 25.82	2.40	107.38	997.08 ± 23.94	2.40	99.71
Losartan	2.00	2.10 ± 0.03	1.51	104.81	2.06 ± 0.11	5.53	103.00
	10.0	10.71 ± 0.19	1.76	107.06	10.04 ± 0.18	1.81	100.40
	100	102.23 ± 0.79	0.78	102.23	99.04 ± 1.85	1.87	99.04
EXP3174	2.00	2.12 ± 0.04	1.85	106.06	2.02 ± 0.08	3.96	101.10
	10.0	10.43 ± 0.18	1.74	104.27	10.00 ± 0.30	3.02	100.04
	100	99.13 ± 1.2	1.54	99.13	98.90 ± 4.64	4.69	98.90
Omeprazole	2.00	2.10 ± 0.07	3.26	104.84	2.04 ± 0.11	5.59	102.00
	10.0	11.18 ± 0.15	1.32	111.77	10.14 ± 0.65	6.45	101.40
	100	106.51 ± 1.00	0.93	106.51	96.66 ± 6.55	6.78	96.66
5'-Hydroxyomeprazole	2.00	2.03 ± 0.09	4.29	101.64	2.04 ± 0.05	2.68	102.00
	10.0	10.66 ± 0.19	1.77	106.59	10.06 ± 0.36	3.56	100.60
	100	101.15 ± 1.32	1.31	101.15	96.08 ± 3.06	3.18	96.08
Dextromethorphan	0.2	0.19 ± 0.01	7.28	97.10	0.20 ± 0.01	5.00	100.00
	1.0	1.17 ± 0.03	2.18	117.34	1.02 ± 0.03	3.14	101.80
	10	11.13 ± 0.11	1.00	111.31	10.17 ± 0.11	1.07	101.71
Dextrorphan	0.2	0.20 ± 0.02	11.33	100.20	0.21 ± 0.02	8.82	103.00
	1.0	1.07 ± 0.04	3.30	106.54	1.03 ± 0.03	2.61	103.40
	10	10.65 ± 0.26	2.47	106.47	10.16 ± 0.13	1.29	101.62
Midazolam	0.2	0.21 ± 0.01	6.25	103.10	0.20 ± 0.01	2.68	102.00
	1.0	1.11 ± 0.04	3.50	111.08	1.01 ± 0.02	1.63	100.80
	10	10.99 ± 0.07	0.62	109.88	10.07 ± 0.07	0.73	100.68
1'-Hydroxymidazolam	0.2	0.18 ± 0.01	6.25	88.50	0.10 ± 0.01	4.14	101.00
	1.0	0.95 ± 0.04	3.84	95.34	0.99 ± 0.06	6.27	99.00
	10	10.69 ± 0.13	1.20	106.87	10.03 ± 0.35	3.54	100.30
Pitavastatin	2.00	2.11 ± 0.06	2.75	105.30	2.10 ± 0.09	4.40	104.90
	10.0	11.45 ± 0.33	2.88	114.46	10.53 ± 0.54	5.08	105.28
	100	107.53 ± 1.64	1.53	107.53	99.18 ± 6.16	6.21	99.18

- 분석법 검증: 안정성

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	4-h short-term stability	Freeze-thaw stability (-80°C/room temperature)
Caffeine	100	101.7	111.2
	1000	95.4	97.2
Paraxanthine	100	93.1	103.8
	1000	94.7	100.9
Losartan	10	95.9	103.1
	100	96.2	97.2
EXP3174	10	73.6	75.6
	100	84.8	84.1
Omeprazole	10	95.9	103.1
	100	96.2	97.2
5'-Hydroxyomeprazole	10	73.6	71.8
	100	75.2	64.1
Dextromethorphan	1	105.0	107.6
	10	103.3	97.1
Dextrorphan	1	92.8	98.0
	10	92.3	88.2
Midazolam	1	87.0	90.4
	10	98.5	97.9
1'-Hydroxymidazolam	1	93.3	84.3
	10	89.9	87.3
Pitavastatin	10	93.8	100.5
	100	97.2	94.7

- 분석법 검증: 검량곡선

Analyte	Retention (min)	time	Calibration (ng/mL)	range	LLOQ (ng/mL)
Caffeine	2.9		5-4000		5
Paraxanthine	2.7		5-4000		5
Losartan	3.7		0.5-400		0.5
EXP3174	3.8		0.5-400		0.5
Omeprazole	3.2		0.5-400		0.5
5'-Hydroxyomeprazole	3.2		0.5-400		0.5
Dextromethorphan	3.4		0.05-40		0.05
Dextrorphan	3.1		0.05-40		0.05
Midazolam	3.4		0.05-40		0.05
1'-Hydroxymidazolam	3.4		0.05-100		0.05
Pitavastatin	3.5		0.5-400		0.5

(7) 약동학 분석 및 약물상호작용 평가

- 홍삼 및 약물농도 측정을 위한 혈장 및 뇨 시료를 주관연구기관에 제공
- 시험에 참여한 15명의 시험대상자 모두 계획서에 따라 연구에 끝까지 참여하였으며, 시험을 모두 완료한 15명을 대상으로 약동학 분석을 실시함.
- 측정된 약물농도를 이용하여 Phoenix WinNonlin®(Certara,NJ,USA) version 7.0 소프트웨어를 사용하여 noncompartment method에 따라 AUC_{last} , C_{max} 등의 주요 약동학 파라미터를 산출하였음
- Metabolic ratio 및 urinary metabolic ratio를 산출하여 투여 전과 홍삼 단회 투여(2기), 투여 전과 홍삼 반복 투여(3기) 간에 유의한 차이가 있는지 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 통계적으로 분석함.
- in vivo cocktail 약물을 구성하는 개별 약물의 약동학 분석결과는 아래 제시함

① Midazolam(CYP3A)

- Midazolam과 대사체 1' hydroxymidazolam의 약동학적 특성을 분석한 결과는 Table 4와 5에 제시하였으며, metabolic ratio는 Table 6에 요약하였음.
- 홍삼 투여 전후 midazolam의 AUC_{last} 값을 통계적으로 분석한 결과, 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.532, 반복투여 전후 p value=0.078)
- Midazolam C_{max} 또한 홍삼 섭취 전후에서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.750, 반복투여 전후 p value=0.719)
- Midazolam과 1' hydroxymidazolam 간의 metabolic ratio의 기하평균비는 홍삼 투여 전과 단회 투여 후 1.095, 투여 전과 반복 투여 후 1.159 로 나타났으며 통계적으로 분석한 결과 유의한 차이는 나타나지 않았음(단회투여 전후 p value=0.431, 반복투여 전후 p value=0.095)
- 약동학 분석 결과, 홍삼 섭취는 CYP3A 효소 활성화에 임상적으로 의미있는 정도의 영향을 미치지 않을 것으로 나타남

Table 4. Pharmacokinetic parameters of midazolam (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC_{last} (h*ng/mL)	17.61 ± 9.26 (52.58)	17.52 ± 8.80 (50.26)	16.68 ± 8.55 (51.24)	0.532**	0.078**
C_{max} (ng/mL)	7.50 ± 3.36 (44.78)	7.71 ± 3.05 (39.48)	7.29 ± 2.69 (36.85)	0.750*	0.719*
AUC_{inf} (h*ng/mL)	18.16 ± 9.47	18.26 ± 9.15	17.52 ± 9.11	0.532**	0.173**

	(52.16)	(50.08)	(52.01)		
T _{max} (h)	0.65 ± 0.25 (37.91)	0.65 ± 0.18 (28.34)	1.03 ± 1.40 (135.59)	1.000**	0.202**
t _{1/2} (h)	2.65 ± 1.05 (39.66)	2.90 ± 1.07 (37.06)	3.27 ± 1.89 (57.80)	0.334**	0.394**
CL/F (L/h)	139.77 ± 71.09 (50.86)	127.26 ± 44.89 (35.27)	139.16 ± 55.83 (40.12)	0.337*	0.965*

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

Table 5. Pharmacokinetic parameters of 1' hydroxymidazolam (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	15.96 ± 7.19 (45.07)	18.19 ± 10.46 (57.52)	19.13 ± 13.18 (68.93)	0.088**	0.334**
C _{max} (ng/mL)	7.72 ± 2.39 (30.93)	9.37 ± 3.84 (41.01)	8.65 ± 3.15 (36.40)	0.058*	0.131*
AUC _{inf} (h*ng/mL)	17.31 ± 7.47 (43.15)	19.69 ± 10.52 (53.40)	20.83 ± 14.40 (69.17)	0.173**	0.394**
T _{max} (h)	0.80 ± 0.29 (35.83)	0.77 ± 0.27 (35.86)	0.78 ± 0.44 (56.41)	0.566**	0.595**
t _{1/2} (h)	2.67 ± 2.54 (95.11)	2.44 ± 2.42 (99.03)	3.13 ± 3.94 (126.13)	0.307**	1.000**
CL/F (L/h)	141.87 ± 81.51 (57.45)	122.63 ± 58.15 (47.42)	132.15 ± 67.00 (50.70)	0.125**	0.394**

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

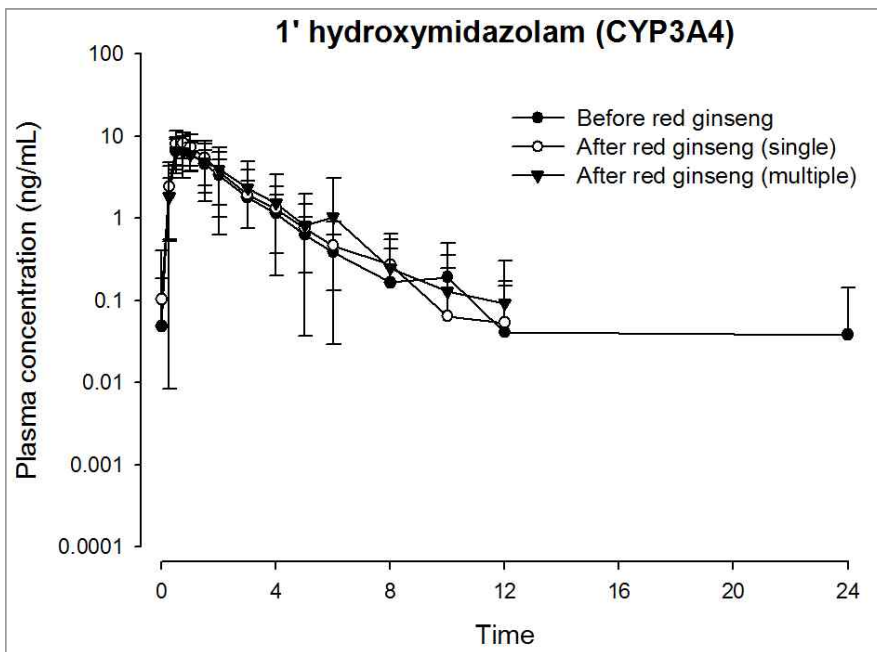
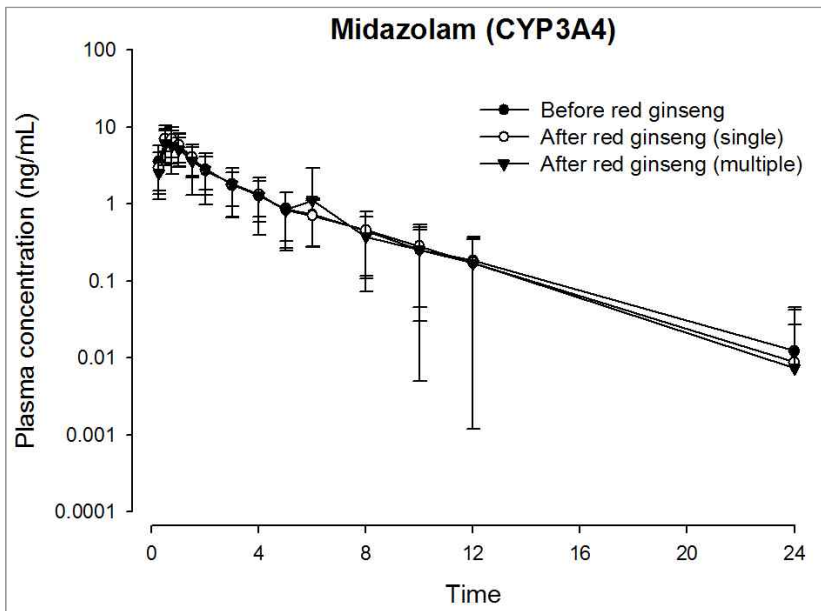
Table 6. Effect of red ginseng on metabolic ratio of midazolam (n=15)

Enzyme	Analyte ratio	Metabolic ratio			P value	
		홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	(1)-(2)	(1)-(3)
		(1)	(2)	(3)		
CYP3A4	1'hydroxymidazolam : Midazolam	0.925	1.013	1.072	0.431*	0.095*

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

- Midazolam과 대사체 1' hydroxymidazolam의 평균 혈장 농도-시간 양상을 아래 그림에 나타내었음



② Dextromethorphan(CYP2D6)

- Dextromethorphan과 대사체 dextorphan의 약동학적 특성을 분석한 결과는 Table 7과 8에 제시하였으며, metabolic ratio와 urinary metabolic ratio는 각각 Table 9과 Table 10에 요약하여 나타냄
- 홍삼 투여 전후 dextorphan의 AUC_{last} 값을 통계적으로 분석한 결과, 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.394, 반복투여 전후 p value=0.173)

- Dextromethorphan C_{max} 또한 홍삼 섭취 전후에서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.256, 반복투여 전후 p value=0.256)
- Dextromethorphan과 dextorphan 간의 metabolic ratio의 기하평균비는 홍삼 투여 전과 단회 투여 후 1.072, 투여 전과 반복 투여 후 1.001 이었고, 통계적으로 분석한 결과 유의한 차이는 나타나지 않았음(단회투여 전후 p value=0.419, 반복투여 전후 p value=0.992)
- Dextromethorphan과 dextorphan 간의 urinary metabolic ratio의 기하평균비는 홍삼 투여 전과 단회 투여 후 0.989, 투여 전과 반복 투여 후 0.921 로 나타났으며, 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(단회투여 전후 p value=0.957, 반복투여 전후 p value=0.608)
- 약동학 분석 결과, 홍삼 섭취는 CYP2D6 효소 활성화에 임상적으로 의미 있는 정도의 영향을 미치지 않는 것으로 나타남

Table 7. Pharmacokinetic parameters of dextromethorphan (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	23.37 ± 30.74 (131.53)	24.69 ± 31.14 (126.08)	25.57 ± 32.57 (127.41)	0.394**	0.173**
C _{max} (ng/mL)	2.38 ± 2.45 (102.98)	2.70 ± 2.64 (98.00)	2.60 ± 2.59 (99.62)	0.256**	0.256**
AUC _{inf} (h*ng/mL)	24.62 ± 31.72 (128.82)	25.76 ± 31.77 (123.33)	26.80 ± 33.41 (124.69)	0.460**	0.191**
T _{max} (h)	2.20 ± 0.75 (34.14)	2.03 ± 1.03 (50.45)	2.28 ± 1.53 (66.84)	0.445**	1.000**
t _{1/2} (h)	6.74 ± 2.78 (41.20)	6.29 ± 3.68 (58.61)	6.27 ± 3.03 (48.27)	0.552*	0.597*
CL/F (L/h)	9320.53 ± 13611.00 (146.03)	9547.73 ± 13124.58 (137.46)	10284.48 ± 15410.75 (149.84)	0.363**	0.865**

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

Table 8. Pharmacokinetic parameters of dextorphan (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	58.33 ± 31.14 (53.38)	66.65 ± 30.62 (45.94)	63.18 ± 35.42 (56.06)	0.056*	0.156**
C _{max} (ng/mL)	11.15 ± 4.77 (42.78)	13.15 ± 5.14 (39.07)	11.36 ± 4.48 (39.45)	0.081*	0.809*
AUC _{inf} (h*ng/mL)	59.34 ± 31.33 (52.80)	68.05 ± 31.34 (46.05)	64.54 ± 35.03 (54.28)	0.050*	0.140**

T _{max} (h)	1.77 ± 0.59 (33.60)	1.63 ± 0.67 (40.85)	1.98 ± 0.83 (41.66)	0.351**	0.135**
t _{1/2} (h)	5.02 ± 2.13 (42.47)	4.54 ± 1.88 (41.44)	4.82 ± 2.15 (44.61)	0.100**	0.460**
CL/F (L/h)	716.45 ± 543.84 (75.91)	532.04 ± 246.37 (46.31)	592.95 ± 329.36 (55.55)	0.012**	0.088**

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

Table 9. Effect of red ginseng on metabolic ratio of dextromethorphan (n=15)

Enzyme	Analyte ratio	Metabolic ratio			P value	
		홍삼 투여 전 (1)	홍삼 단회 투여 (2)	홍삼 반복 투여 (3)	(1)-(2)	(1)-(3)
CYP2D6	Dextorphan : Dextromethorphan	6.924	7.420	6.930	0.419*	0.992*

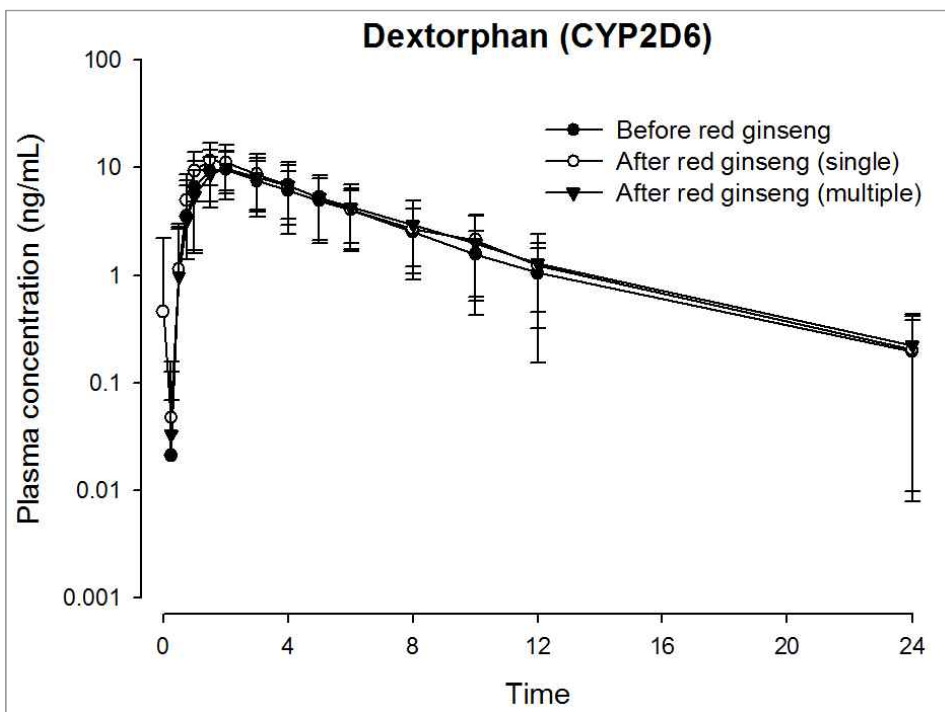
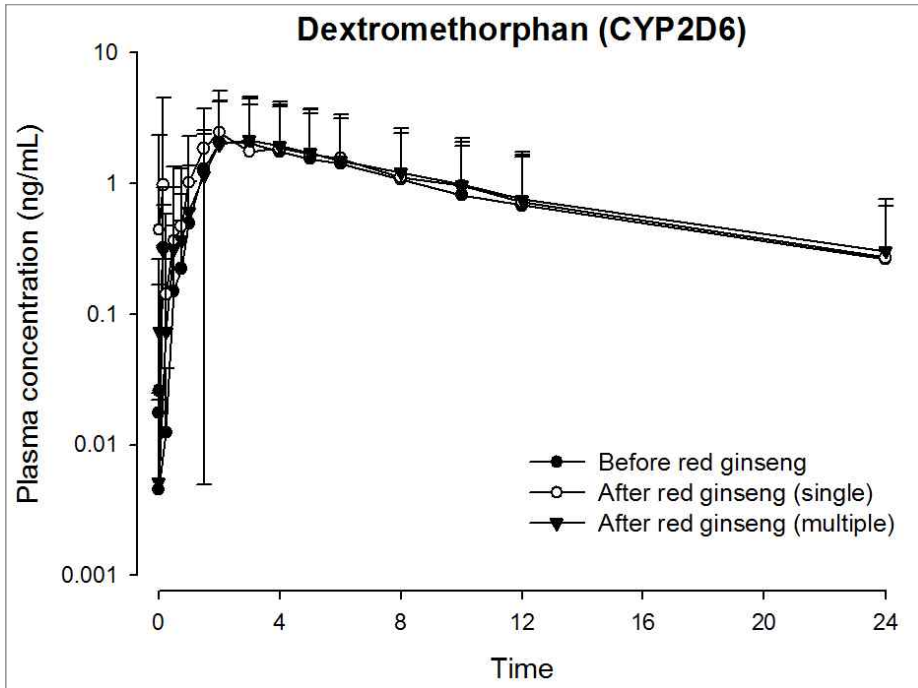
* Paired t-test

Table 10. Effect of red ginseng on urinary metabolic ratio of dextromethorphan (n=15)

Enzyme	Analyte ratio	Metabolic ratio			P value	
		홍삼 투여 전 (1)	홍삼 단회 투여 (2)	홍삼 반복 투여 (3)	(1)-(2)	(1)-(3)
CYP2D6	Dextorphan : Dextromethorphan	0.00178	0.00176	0.00164	0.957*	0.608*

* Paired t-test

- Dextromethorphan과 dextorphan의 평균 혈장 농도-시간 양상을 아래 그림에 나타내었음



③ Caffeine(CYP1A2)

- Caffeine과 대사체 paraxanthine의 약동학적 특성을 분석한 결과는 Table 11과 12에 제시하였으며, metabolic ratio는 Table 13에 요약하였음.
- 홍삼 투여 전후 caffeine의 AUC_{last} 값을 통계적으로 분석한 결과, 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.166, 반복투여 전후 p value=0.173)
- Caffeine C_{max} 또한 홍삼 섭취 전후에서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.224, 반복투여 전후 p value=0.047)
- Caffeine과 paraxanthine 간의 metabolic ratio의 기하평균비는 홍삼 투여 전과 단회 투여 후 1.016, 투여 전과 반복 투여 후 1.003 이었고, 통계적으로 분석한 결과 유의한 차이는 나타나지 않았음(단회투여 전후 p value=0.757, 반복투여 전후 p value=0.959)
- 약동학 분석 결과, 홍삼 섭취는 CYP1A2 효소 활성화에 임상적으로 영향을 주지 않는 것으로 나타남

Table 11. Pharmacokinetic parameters of caffeine (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	26768.24 ± 14728.63 (55.02)	31244.76 ± 14173.50 (45.36)	30893.16 ± 18355.14 (59.41)	0.166*	0.173**
C _{max} (ng/mL)	2265.44 ± 755.24 (33.34)	2567.09 ± 747.94 (29.14)	2582.13 ± 788.99 (30.56)	0.224*	0.047*
AUC _{inf} (h*ng/mL)	31511.59 ± 18228.58 (57.85)	36937.71 ± 21092.37 (57.10)	40153.16 ± 30704.71 (76.47)	0.211**	0.191**
T _{max} (h)	0.77 ± 0.45 (58.42)	0.75 ± 0.39 (51.95)	0.98 ± 0.75 (75.95)	0.798**	0.227**
t _{1/2} (h)	8.55 ± 4.67 (54.61)	8.65 ± 1.73 (20.00)	10.17 ± 8.75 (86.02)	0.363**	0.363**
CL/F (L/h)	4.54 ± 2.94 (64.72)	3.52 ± 1.78 (50.55)	3.92 ± 2.57 (65.67)	0.100**	0.363**

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

Table 12. Pharmacokinetic parameters of paraxanthine (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	27807.78 ±12514.61 (45.00)	34365.31 ± 14969.29 (43.56)	32879.22 ± 19762.29 (60.11)	0.063**	0.125**
C _{max} (ng/mL)	1036.02 ± 344.63 (33.27)	1248.10 ± 531.67 (42.60)	1198.80 ± 527.89 (44.03)	0.078*	0.125**
AUC _{inf} (h*ng/mL)	38814.56 ± 24340.67 (62.71)	53960.79 ± 40444.41 (74.95)	49829.41 ± 42595.43 (85.48)	0.036**	0.156**
T _{max} (h)	13.87 ± 14.64 (105.60)	18.53 ± 18.54 (100.05)	16.18 ± 18.74 (115.79)	0.387**	0.780**
t _{1/2} (h)	12.12 ± 4.64 (38.24)	16.95 ± 8.22 (48.52)	15.87 ± 6.69 (42.14)	0.011**	0.076*
CL/F (L/h)	3.65 ± 2.22 (60.88)	2.71 ± 1.63 (59.87)	2.93 ± 1.36 (46.42)	0.038**	0.183**

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

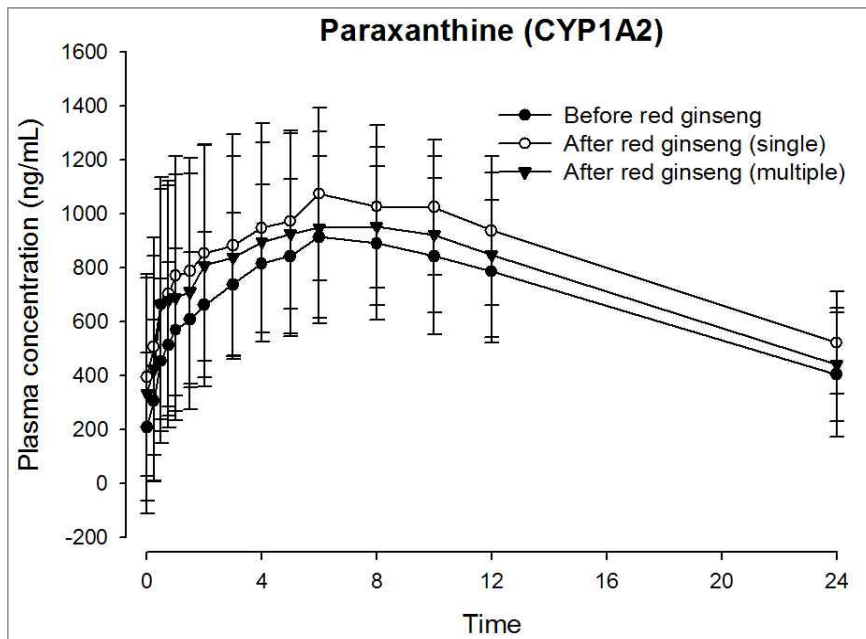
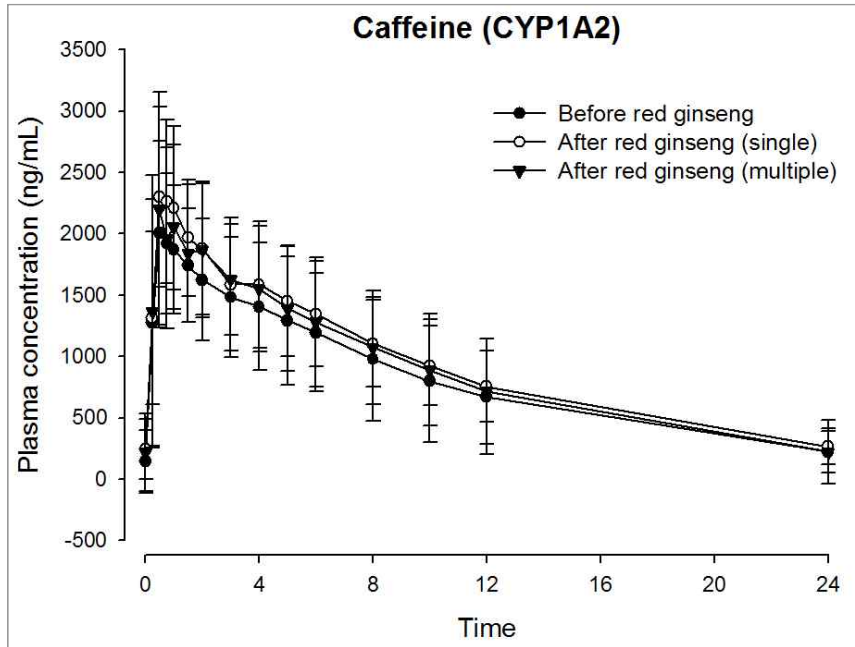
** Wilcoxon signed rank test

Table 13. Effect of red ginseng on metabolic ratio of caffeine (n=15)

Enzyme	Analyte ratio	Metabolic ratio			P value	
		홍삼 투여 전 (1)	홍삼 단회 투여 (2)	홍삼 반복 투여 (3)	(1)-(2)	(1)-(3)
CYP1A2	Paraxanthine : Caffeine	1.094	1.112	1.097	0.757*	0.959*

* Paired t-test

- Caffeine과 paraxanthine 의 평균 혈장 농도-시간 양상을 아래 그림에 나타내었음



④ Losartan(CYP2C9)

- Losartan과 대사체 EXP3174의 약동학적 특성을 분석한 결과는 Table 14와 15에 제시하였으며, metabolic ratio와 urinary metabolic ratio는 Table 16과 Table 17에 요약하였음.
- 홍삼 투여 전후 losartan의 AUC_{last} 값을 통계적으로 분석한 결과, 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.083, 반복투여 전후 p value=0.625)
- Losartan C_{max} 또한 홍삼 섭취 전후에서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.021, 반복투여 전후 p value=0.840)
- Losartan과 EXP3174 간의 metabolic ratio의 기하평균비는 홍삼 투여 전과 단회 투여 후 0.965, 투여 전과 반복 투여 후 1.006 이었고, 통계적으로 분석한 결과 유의한 차이는 나타나지 않았음(단회투여 전후 p value=0.475, 반복투여 전후 p value=0.892)
- Losartan과 EXP3174 간의 urinary metabolic ratio의 기하평균비는 홍삼 투여 전과 단회 투여 후 0.940, 투여 전과 반복 투여 후 0.859로 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.516, 반복투여 전후 p value=0.283)
- 약동학 분석 결과, 홍삼 섭취는 CYP2C9 효소 활성화에 임상적으로 의미 있는 정도의 영향을 주지 않을 것으로 나타남

Table 14. Pharmacokinetic parameters of losartan (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	394.64 ± 109.02 (27.63)	432.74 ± 125.07 (28.90)	405.58 ± 131.44 (32.41)	0.083*	0.625*
C _{max} (ng/mL)	171.93 ± 68.77 (40.00)	220.45 ± 77.30 (35.07)	175.61 ± 63.68 (36.26)	0.021*	0.840*
AUC _{inf} (h*ng/mL)	399.94 ± 110.02 (27.51)	438.51 ± 126.76 (28.91)	411.18 ± 134.82 (32.79)	0.081*	0.621*
T _{max} (h)	1.42 ± 0.69 (48.41)	1.52 ± 0.60 (39.63)	2.05 ± 0.87 (42.30)	0.718**	0.031*
t _{1/2} (h)	1.92 ± 0.40 (20.80)	1.97 ± 0.35 (17.68)	1.81 ± 0.32 (17.62)	0.910**	0.307**
CL/F (L/h)	139.90 ± 61.44 (43.92)	126.98 ± 50.76 (39.98)	136.57 ± 52.47 (38.42)	0.041**	0.532**

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

Table 15. Pharmacokinetic parameters of EXP3174 (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	2900.51 ± 1007.95 (34.75)	3117.20 ± 1236.64 (39.67)	3125.00 ± 1556.13 (49.80)	0.173*	0.310*
C _{max} (ng/mL)	403.79 ± 171.88 (42.57)	461.14 ± 227.41 (49.31)	422.30 ± 95.94 (46.40)	0.049*	0.588*
AUC _{inf} (h*ng/mL)	2928.85 ± 1032.30 (35.25)	3136.07 ± 1242.00 (39.60)	3151.80 ± 1559.10 (49.47)	0.203*	0.304*
T _{max} (h)	3.73 ± 0.70 (18.85)	3.67 ± 0.72 (19.74)	4.20 ± 0.77 (18.44)	0.803*	0.107*
t _{1/2} (h)	6.62 ± 0.62 (9.41)	6.53 ± 0.85 (13.01)	6.34 ± 1.24 (19.54)	0.649*	0.334**
CL/F (L/h)	19.44 ± 7.58 (38.98)	18.69 ± 8.03 (42.97)	19.56 ± 8.88 (45.38)	0.296*	0.893*

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

Table 16. Effect of red ginseng on metabolic ratio of losartan (n=15)

Enzyme	Analyte ratio	Metabolic ratio			P value	
		홍삼 투여 전 (1)	홍삼 단회 투여 (2)	홍삼 반복 투여 (3)	(1)-(2)	(1)-(3)
CYP2C9	EXP3174 : Losartan	7.249	6.996	7.295	0.475*	0.892*

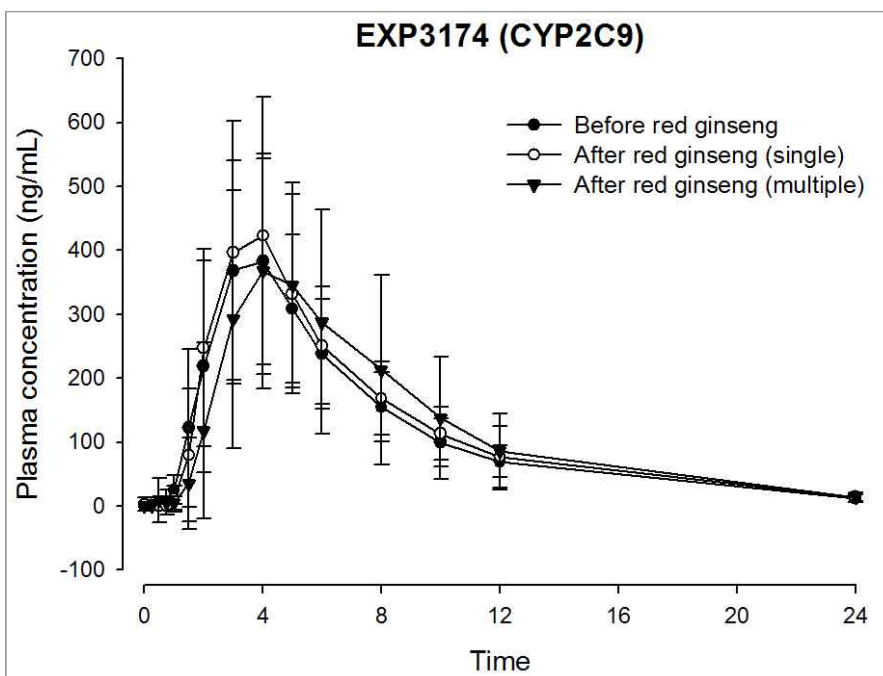
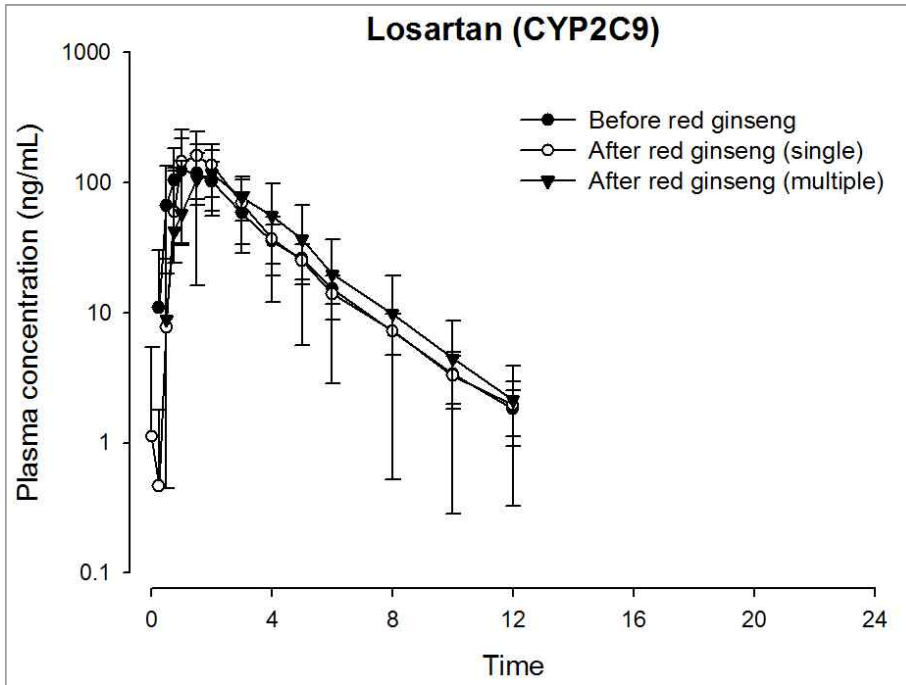
* Paired t-test

Table 17. Effect of red ginseng on urinary metabolic ratio of EXP3174 (n=15)

Enzyme	Analyte ratio	Metabolic ratio			P value	
		홍삼 투여 전 (1)	홍삼 단회 투여 (2)	홍삼 반복 투여 (3)	(1)-(2)	(1)-(3)
CYP2C9	Losartan : EXP3174	0.764	0.718	0.656	0.516*	0.283*

* Paired t-test

- Losartan과 EXP3174의 평균 혈장 농도-시간 양상을 아래 그림에 나타내었음



⑤ Omeprazole(CYP2C19)

- Omeprazole과 대사체 5' hydroxyomeprazole의 약동학적 특성을 분석한 결과는 Table 18과 19에 제시하였으며, metabolic ratio는 Table 20에 요약하였음.
- 홍삼 투여 전후 omeprazole의 AUC_{last} 값을 통계적으로 분석한 결과, 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.112, 반복투여 전후 p value=0.211)
- Omeprazole C_{max} 또한 홍삼 섭취 전후에서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.156, 반복투여 전후 p value=0.532)
- Omeprazole과 5' hydroxyomeprazole 간의 metabolic ratio의 기하평균비는 홍삼 투여 전과 단회 투여 후 0.959, 투여 전과 반복 투여 후 1.008 로 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(단회투여 전후 p value=0.405, 반복투여 전후 p value=0.776)
- 약동학 분석 결과, 홍삼 섭취는 CYP2C19 효소 활성화에 임상적으로 의미 있는 정도의 영향을 미치지 않는 것으로 나타남

Table 18. Pharmacokinetic parameters of omeprazole (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	2471.42 ± 2867.37 (116.02)	2781.51 ± 3335.39 (119.91)	2703.10 ± 3308.88 (122.41)	0.112**	0.211**
C _{max} (ng/mL)	706.00 ± 541.29 (76.67)	798.99 ± 555.60 (69.54)	822.24 ± 716.25 (87.11)	0.156**	0.532**
AUC _{inf} (h*ng/mL)	2497.78 ± 2905.50 (116.32)	2797.51 ± 3356.39 (119.98)	2721.15 ± 3336.03 (122.60)	0.125**	0.233**
T _{max} (h)	2.20 ± 0.75 (34.14)	2.05 ± 0.72 (34.94)	2.47 ± 1.06 (42.98)	0.777**	0.277**
t _{1/2} (h)	2.02 ± 2.54 (125.79)	1.67 ± 1.26 (75.32)	1.53 ± 1.16 (76.14)	0.427**	0.211**
CL/F (L/h)	31.26 ± 33.17 (106.10)	22.95 ± 19.27 (83.95)	26.22 ± 22.19 (84.64)	0.017**	0.211**

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

Table 19. Pharmacokinetic parameters of 5' hydroxyomeprazole (n=15)

Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	320.28 ± 134.93 (42.13)	347.06 ± 86.80 (25.01)	344.86 ± 129.03 (37.42)	0.053**	0.140**
C _{max} (ng/mL)	104.80 ± 61.95 (59.11)	127.62 ± 57.31 (44.91)	116.76 ± 50.35 (43.12)	0.125**	0.427**
AUC _{inf} (h*ng/mL)	328.25 ± 134.85 (41.08)	351.58 ± 88.08 (25.05)	349.66 ± 130.10 (37.21)	0.191*	0.156**
T _{max} (h)	2.47 ± 0.90 (36.31)	2.01 ± 0.75 (37.40)	2.73 ± 1.03 (37.79)	0.106**	0.291**
t _{1/2} (h)	1.79 ± 1.15 (64.00)	1.80 ± 1.10 (61.16)	1.74 ± 0.97 (55.74)	0.609**	0.776**
CL/F (L/h)	70.22 ± 26.49 (37.73)	60.52 ± 15.96 (26.37)	64.98 ± 23.09 (35.53)	0.022*	0.258*

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

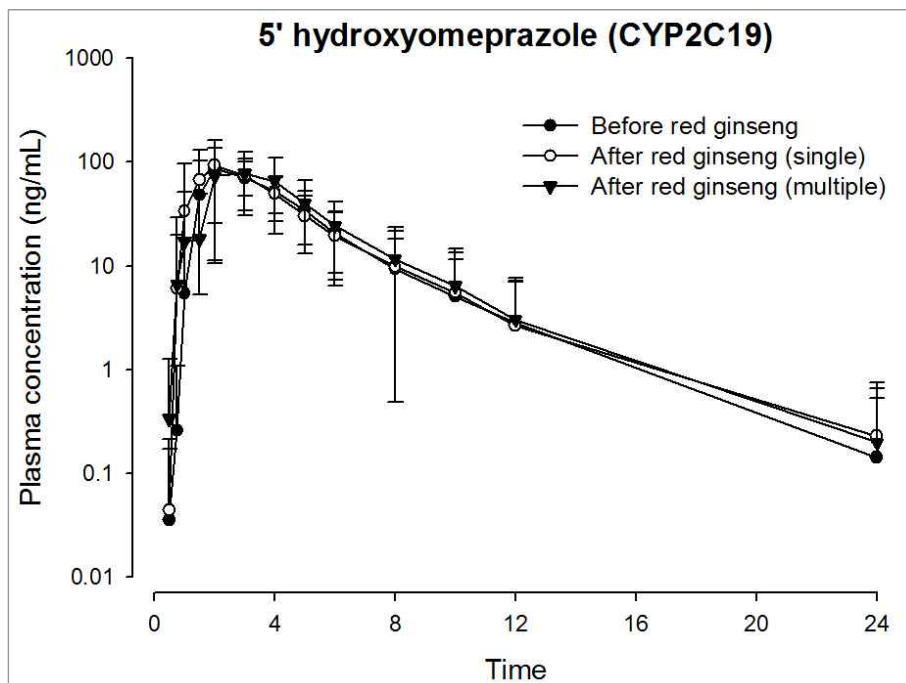
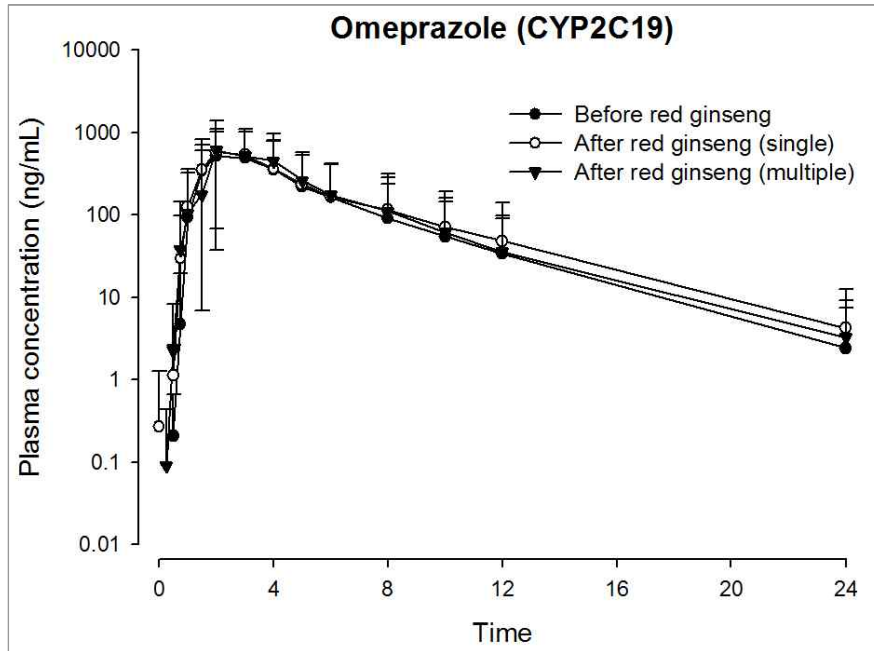
** Wilcoxon signed rank test

Table 20. Effect of red ginseng on metabolic ratio of omeprazole (n=15)

Enzyme	Analyte ratio	Metabolic ratio			P value	
		홍삼 투여 전 (1)	홍삼 단회 투여 (2)	홍삼 반복 투여 (3)	(1)-(2)	(1)-(3)
CYP2C19	5'hydroxyomeprazole : Omeprazole	0.245	0.235	0.247	0.405*	0.776**

* Paired t-test

- Omeprazole과 5' hydroxyomeprazole의 평균 혈장 농도-시간 양상을 아래 그림에 나타내었음



⑥ Pitavastatin(OATP1B1)

- Pitavastatin의 약동학적 특성을 분석한 결과는 Table 14에 제시하였음.
- 홍삼 투여 전후 pitavastatin의 AUC_{last} 값을 통계적으로 분석한 결과, 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.769, 반복투여 전후 p value=0.834)
- Pitavastatin C_{max} 또한 홍삼 섭취 전후에서 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았음(단회투여 전후 p value=0.753, 반복투여 전후 p value=0.405)
- 약동학 분석 결과, 홍삼 섭취는 OATP1B1 수송체 활성화에 임상적으로 의미 있는 정도의 영향을 주지 않을 것으로 나타남

Table 14. Pharmacokinetic parameters of pitavastatin (n=15)

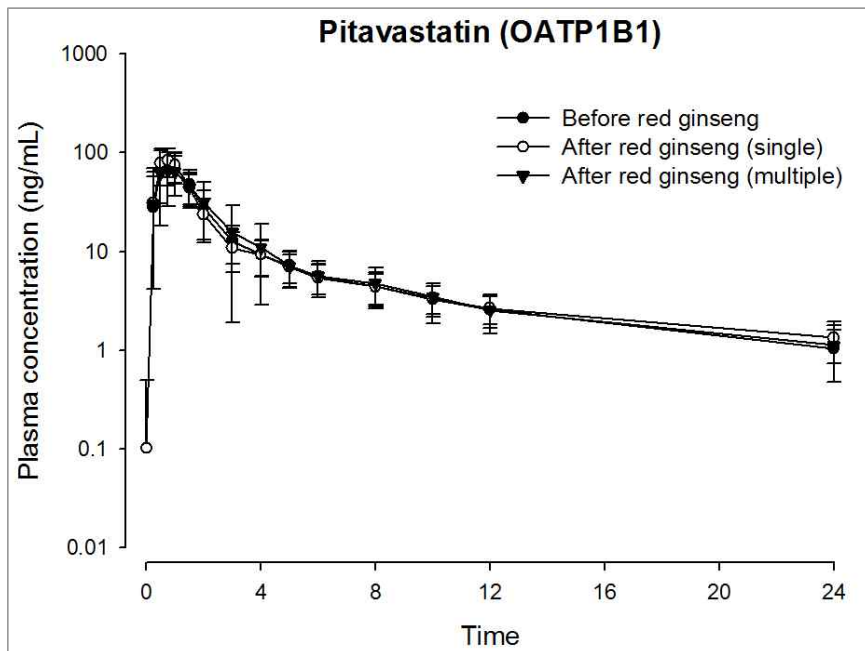
Pharmacokinetic parameters (unit)	홍삼 투여 전	홍삼 단회 투여	홍삼 반복 투여	P value	
	(1)	(2)	(3)	(1)-(2)	(1)-(3)
AUC _{last} (h*ng/mL)	200.39 ± 68.48 (34.18)	197.81 ± 56.38 (28.50)	197.98 ± 76.87 (38.83)	0.769*	0.834*
C _{max} (ng/mL)	90.24 ± 32.89 (36.45)	92.46 ± 29.03 (31.40)	84.14 ± 29.57 (35.15)	0.753*	0.405*
AUC _{inf} (h*ng/mL)	230.39 ± 105.96 (45.99)	237.59 ± 125.58 (52.86)	213.87 ± 75.14 (35.13)	0.427**	1.000**
T _{max} (h)	0.80 ± 0.29 (35.83)	0.80 ± 0.29 (35.83)	0.88 ± 0.46 (52.26)	0.943**	0.550**
t _{1/2} (h)	14.88 ± 17.00 (114.23)	15.50 ± 22.06 (142.34)	10.56 ± 6.46 (61.18)	0.910**	0.140**
CL/F (L/h)	10.98 ± 6.99 (63.73)	10.02 ± 4.26 (42.50)	10.90 ± 5.18 (47.52)	0.427**	0.865**

mean ± SD (CV %)

* Paired t-test

** Wilcoxon signed rank test

- Pitavastatin의 평균 혈장 농도-시간 양상을 아래 그림에 나타내었음



○ 보고된 이상반응 등을 통한 안전성 평가

- 임상시험용 제제인 홍삼 및 in vivo cocktail 약물을 최소 1회 이상 투여 받은 15 명의 대상자들의 안전성을 평가함

- 안전성 평가변수

· 활력징후, 신체검진, 임상실험실검사*, 심전도, 이상반응문진, 병용약물확인 등을 종합적으로 고려하여 비교 평가함(투약이 이루어진 시점 이후에 발생한 이상반응 건에 대해서만 treatment emergent AE로 안전성 평가에 적용함).

· 기존에 알려진 약물이상반응의 발생 여부, 정도 및 빈도를 임상시험용 제제 투여 전후에 비교 평가함.

· 대상자의 상태는 임상시험용 제제 투여 이후부터 모니터 및 평가하였고, 매 시 투약 전, 추적 방문에 증상 및 증후를 관찰하였으며, 문진은 대상자가 상태를 설명할 수 있는 방법으로 함.

· 임상실험실 검사는 다음과 같음

* 임상실험실 검사(스크리닝, post study visit 에 시행)

· 혈액학 검사

WBC with differential count (seg. neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils), RBC, hemoglobin, hematocrit, platelet

- 혈액화학 검사
BUN, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, total bilirubin, albumin, total protein, glucose(fasting), CPK, sodium, potassium, chloride
- 요검사
Specific gravity, pH, protein, glucose, bilirubin, occult blood, urobilinogen, microscopy(RBC, WBC)
- 안전성 평가 결과
 - 임상연구용 제제를 1회 이상 투여 받은 15명의 대상자 중 1명(6.7%, 1/15명)의 대상자에서 1건(blood urine present)의 이상반응(AE)이 발생함.
 - 이는 임상연구용 제제와의 인과관계를 배제할 수 없는 약물이상반응(ADR)으로 임상연구용 제제와의 인과관계는 '관련성이 의심됨(possible)'으로 평가됨.
 - 발생한 이상반응 1건의 중증도(severity)는 경증(mild)이었으며 보고된 이상반응은 특별한 조치 없이 완전히 회복됨.

Table 17. Individual adverse events (AEs)

Enrollment No	Preferred Term	Start date	End date	AE category	Causal Relationship	Severity
E09	Blood urine present	2017-07-06	2017-07-18	ADR	possible	mild

- 안전성 평가 항목에서 임상적으로 의미 있는 중대한 변화는 발견되지 않았고, 전 임상시험 기간을 걸쳐 중대한 이상반응/약물이상반응(serious AE/ADR)은 발생하지 않았으며, 예상하지 못한 약물이상반응(unexpected ADR) 역시 발생하지 않았음.
 - 홍삼과 in vivo cocktail 적용 약물의 안전성은 양호한 것으로 판단됨.
 - 안전성 평가변수 중 심전도 검사 결과를 요약하여 Table 18에 제시함
 - 임상시험 기간 동안 임상적으로 유의한 심전도 소견은 관찰되지 않음
- Table 18. Electrocardiography (n=15)

	Screening	PSV
Normal or NCS	15 (100%)	15 (100%)
CS	0 (0%)	0 (0%)

n (%)

NCS (Not Clinically Significant), CS (Clinically Significant)

- 안전성 평가변수 중 AST 및 ALT 검사 결과를 요약하여 Table 19에 제시함
- 임상적으로 유의한 소견은 관찰되지 않음

Table 19. AST, ALT (n=15)

	Screening			PSV		
	Mean	SD	intersubject CV(%)	Mean	SD	intersubject CV
AST	20	9	44	22	9	42
ALT	22	10	45	17	9	52

- 안전성 평가변수 중 혈압 결과를 요약하여 Table 20에 나타냄
- 임상적으로 유의한 소견은 관찰되지 않음

Table 20. Blood pressure (n=15)

		SBP			DBP		
		Mean	SD	intersubject CV(%)	Mean	SD	intersubject CV(%)
홍삼 투여 전	0h	122	10	8	79	7	9
	2h	122	8	7	79	6	8
	4h	121	10	8	74	7	9
	8h	123	9	8	71	7	10
	12h	122	9	8	75	10	14
	24h	124	9	7	77	7	10
홍삼 단회 투여 후	0h	122	9	7	79	8	10
	2h	125	7	6	81	6	7
	4h	127	9	7	76	9	11
	8h	122	11	9	71	9	12
	12h	125	8	6	73	9	12
	24h	122	7	6	77	8	11
홍삼 반복 투여 후	0h	120	9	8	78	9	11
	2h	124	7	6	76	5	7
	4h	12	9	7	77	8	11
	8h	128	9	7	72	7	10
	12h	127	9	7	72	7	10
	24h	120	11	9	75	6	8

- 안전성 평가변수 중 체온 결과를 요약하여 Table 20에 나타냄
- 임상적으로 유의한 소견은 관찰되지 않음

Table 21. Body temperature (n=15)

	Body temperature			
	Mean	SD	intersubject CV(%)	
홍삼 투여 전	0h	36.4	0.2	0.5
	2h	36.5	0.3	0.7
	4h	36.7	0.3	0.7
	6h	36.9	0.2	0.7
	8h	36.9	0.2	0.6
	12h	37.0	0.2	0.6
	24h	36.3	0.2	0.4
	홍삼 단회 투여 후	0h	36.3	0.1
2h		36.3	0.2	0.6
4h		36.5	0.3	0.7
6h		36.7	0.2	0.5
8h		36.7	0.2	0.6
12h		36.9	0.2	0.6
24h		36.2	0.2	0.6
홍삼 반복 투여 후		0h	36.3	0.3
	2h	36.4	0.2	0.6
	4h	36.5	0.2	0.7
	6h	36.7	0.2	0.6
	8h	36.6	0.2	0.6
	12h	36.6	0.2	0.7
	24h	36.3	0.2	0.6

○ 임상시험 종료보고 및 결과보고서 작성

2-7. 다빈도 병용투여 의약품과 고려인삼의 약동/약력학적 상호작용을 평가하기 위한 임상시험 수행

(1) 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립

□ 고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품 선정

- 일관성 있는 과제결과 도출 위해 고려인삼은 2차년도와 동일한 제품으로 선정함

- 제품명: 홍삼정올데이
- 제조회사: 풍기인삼농협
- 제형 및 성상: 갈색의 액상제품

○ 다빈도 병용투여 의약품 선정

- 당뇨병 치료제, 고혈압 치료제, 이상지질혈증 치료제 등을 우선적으로 고려하기로 함
- 연간 원외 처방액과 유병률, 건강인에서의 약력학 지표 평가 등을 고려하여 당뇨병 치료제로 선정
- 당뇨병 치료제 가운데 최근 5년간 처방액을 분석하여 1위를 점유하고 있는 metformin을 최종 다빈도 병용투여 의약품으로 선정함
 - 제품명: 다이아백스정 1000mg
 - 제조회사: 대웅제약
 - 주성분: metformin hydrochloride 1000 mg
 - 제형 및 성상: 백색 장방형의 필름 코팅정
 - 효능 및 효과: 식이요법 및 운동요법을 통해 혈당조절이 충분치 않은 제 2형 당뇨병 환자의 치료
 - 용법 및 용량: 1일 2~3회, 1회 500mg을 식사와 함께 투약, 1일 최대 2550mg까지 투여할 수 있다.

□ 고려인삼 및 metformin 투여 용량 및 용법 확립

○ 고려인삼의 용량

- ‘건강기능식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처 고시 제2017-113호)’을 참고하여 2차년도 연구와 동일하게 설정
- 홍삼의 최대 일일섭취량은 진세노사이드(Rg1, Rb1 및 Rg3 합계) 80mg임
- 대상자의 안전성을 확보하면서 metformin과의 상호작용을 확인하기 위한 적절한 최대용량으로 1일 3포(36mg/day)를 선정하여 14일간 투여하기로 함

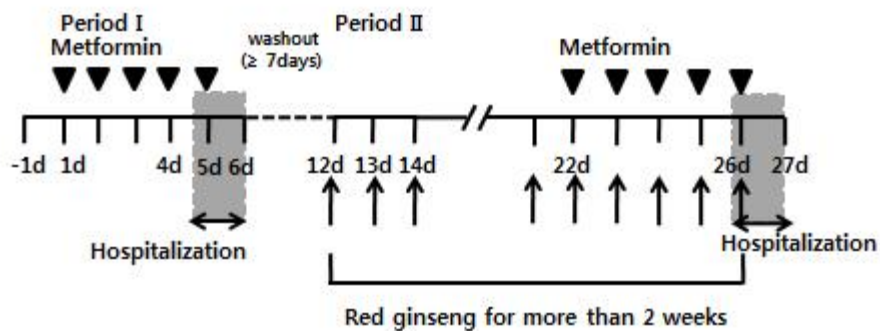
○ Metformin 투여용량과 기간 설정

- 약물상호작용연구 및 표시기재 가이드라인(식품의약품안전처)에 의해 승인된 최대 용량이 투여되도록 함
- 건강인을 대상으로 수행된 metformin 상호작용 연구 문헌(Rhee et al, Drug Design, Development and Therapy 2016, Chung et al, PLoS One 2018)을 참고하여 설정
- 임상연구용 의약품 주성분에 대하여 단독 또는 병용투여 시 약물을 최대한 노출시켰을때의 약동학·약력학 파라미터를 비교분석하여 성분 간 약동·약력학적 상호작용을 평가하기 위하여 최대용량인 metformin 1000 mg으로 연구를 진행하기로 함
- 약물의 반복투여 기간은 기 수행된 연구에서 보고된 metformin의 반감기와 투여기간을 참고하여 5일간 반복투여하기로 함

□ 시험디자인 확립

○ 고려인삼과 metformin 병용 투여 시와 metformin 단독투여 시 약동·약력학적 파라미터를 비교·분석하기 위한 디자인 확립

- open-label, randomized, two-period, single-sequence design



- 건강한 대상자에게 공복 상태에서 metformin을 매 시기 5일간 반복 투여하고, 제 2기에는 고려인삼(홍삼) 농축액을 9일간 반복투여한 후 마지막 5일 동안 홍삼과 metformin을 병용투여하였음
- 홍삼과 metformin 간 상호작용 평가를 위하여 매 시기 마지막 반복투여일에 계획된 시점에 채혈과 안전성 검사를 시행하였음

(2) 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 작성

□ 대상자 수 산출 및 선정·제외 기준 확립

○ 대상자 수 산출

- 홍삼과 metformin 병용투여 시 약물상호작용을 확인하기 위한 시험으로, 연구의 성격이 통계적 가설을 검증하는 것이 아니므로 연구목적에 충족시키는 한도 내에서 최소한의 대상자 수로 진행하는 것이 바람직함
- 제 1상 임상시험에서 단일 용량에 배정되는 대상자 수가 통상 6~10명 정도임을 감안하고 중도탈락율을 고려하여 총 15명을 대상으로 임상시험을 수행하였음.

○ 선정·제외기준

- 선정기준

- 스크리닝 검사 당시 연령이 만 19세 이상 건강한 한국인 성인 남성
- 스크리닝 시 체질량지수(BMI)가 18.5kg/m² 이상 27.0kg/m² 이하인 자
- 선천성 또는 만성질환이 없고 내과적인 진찰결과 병적 증상 또는 소견이 없는 자
- 임상연구용 제제 투여 전 4주 이내에 담당의사가 제제의 특성에 따라 설정·실시한 혈청검사, 혈액화학검사, 혈액화학검사, 요검사 등 임상실험실검사와 심전도검사 결과 대상자로 적합하다고 판정된 자
- 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

- 제외기준

- 임상연구용 제제의 주성분 또는 다른 구성성분에 과민증 환자나 기타 다른 약물(아스피린, 항생제 등) 혹은 첨가제 등에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
- 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설에 영향을 미칠 수 있는 병력 (간/담도계, 신장, 심혈관계, 내분비계, 호흡기계, 소화기계, 혈액종양, 중추신경계, 정신질환, 근골격계 등)을 가진 자
- 당뇨병 환자(케톤혈증의 병력을 가진 당뇨병 환자), 당뇨병성 케톤혈증, 당뇨병성 혼수 환자 또는 과거력이 있는 자
- 임상연구 개시 1주일 이내에 방사선 요오드 조영물질을 정맥 내 투여하는 검사(정맥요오드조영술, 정맥담관조영술, 혈관조영술, 조영제를 사용한 컴퓨터 단층 촬영술 등)를 받은 자
- 임상연구용 제제의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(염증성장질환, 활동성 소화성 궤양 등)이 있거나 위장관계 수술(단, 단순 충수돌기염 수술이

나 탈장 수술은 제외)을 받은 자

- 첫 투약일 전 4주 이내에 중대 상해를 입었거나, 외과적 시술을 받은 자 및 급성 질환(중증 감염증, 중증의 외상환자, 심각한 설사, 구토환자 등)이 의심되는 증상을 보인 자
- 약물남용의 과거력이 있는 자
- 약물의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 영향을 줄 수 있는 비정상적인 식사를 해온 자(예: 자몽주스(하루 1L이상)를 임상연구용 제제 투여 이전 7일 이내에 섭취)
- 혈청검사(HBsAg, HCV Ab, HIV Ag/Ab, VDRL)결과 양성인 자
- 연구기간 중 임신을 계획하고 있거나 계획 중이 아니어도 인정받는 피임법(예: 본인 및 파트너의 불임수술, 파트너의 자궁 내 피임기구, 간격 피임법, 격막 또는 콘돔의 병용)을 사용할 수 없는 자
- 연구책임자 및 연구담당자(담당의사)의 판단에 따라 임상연구 참여가 부적합하다고 판단된 자

□ 채혈방법에 관한 문헌고찰 및 확립

○ 채혈시점, 횟수, 채혈량

- 약물 투여 전 시험대상자의 팔 또는 손등의 정맥부위에 saline-locked angiocatheter를 삽입하여, 기저치 혈액(0h)을 채취하고 saline 1.5 mL를 주입하여 혈액응고를 방지하였음.
- 약동학적 평가를 위해 매 시기 마지막 반복 투약 전(5d, 26d) 0h 및 투약 후 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24h(총 12회)에 걸쳐 채혈하였음.
- 채혈된 혈액은 헤파린이 포함된 tube에 취해 30분 이내에 3000rpm으로 10분 동안 원심 분리하고 상층액의 혈장만을 취하여 분석 시까지 -70°C에 냉동 보관하였음.
- 약력학 평가를 위한 경구당부하 검사를 투약 전(-1d)와 마지막 반복 투약일(5d, 26d) 오전 10시경 진행하며, 0, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4h에 채혈하였음.
- 채혈 시 감염을 방지하기 위하여 대상자들의 혈액채취는 일반인들의 출입이 통제된 격리된 방에서 실시하였으며, 사용하는 기구는 완전 멸균된 1회용으로 하였음.

(3) 경북대병원 임상시험심사위원회(IRB) 심의

□ IRB 심의 및 승인

- 연구계획서 및 CRF 등 IRB 제출서류 filing
- IRB 심의 및 승인 득함
- 승인일: 2018년 7월 12일

(4) 식품의약품안전처 임상시험계획승인 신청(IND) 및 승인

□ 식품의약품안전처 IND 신청 및 승인

- 식약처 공문에 따라 허가된 의약품을 사용하는 연구자주도임상시험이라도 식약처 IND 승인을 득하도록 함
- IND 제출서류 확인 및 filing 후 신청
- 식약처 담당자와 임상시험계획서 관련 질의 응대 및 프로토콜 수정(version 2.0)
- IND 승인(2018년 8월 7일)

KNUH201804028002-HE005		2018.12.23 개정본	
통지서			
* 본 공제의 문서보존기간은 10년입니다.			
수신	의뢰(지정)기관	농림수산식품부	
연구책임자	임상시험센터 윤영란		
IRB File No.	KNUH 2018-04-028-002	신청내용	시정계획서
통지일자	2018.07.12		
연구과제명	국문: 건강관 성인에서 홍삼과 의약품(metformin / probiotics)의 상호작용을 확인하기 위한 연구 영문: A study to investigate the interaction between red ginseng and metformin / probiotics in healthy adults		
연구시험코드	Study Nick Name		
연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 의료사수 <input type="checkbox"/> 의료기기 (<input type="checkbox"/> 1등급 <input type="checkbox"/> 2등급 <input type="checkbox"/> 3등급 <input type="checkbox"/> 4등급) <input type="checkbox"/> 해당사항 없음		
연구분류2	<input type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물(조직)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록연구 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구 <input type="checkbox"/> 기타 ()		
연구분류3	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구 <input type="checkbox"/> 후향적 연구 <input type="checkbox"/> 관행적 & 후향적 병행연구 <input checked="" type="checkbox"/> 중개연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구		
연구분류4	<input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 원지대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구) <input type="checkbox"/> 기타 ()		
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)		
일반명	metformin 1000mg, 락토비실루스증 노수스R0011군, 락토비실루스셀테루스R0052군 존명해당발, 홍삼농축액 10ml	상용명	다이아백스 정 1000mg, 라시도발캡슐, 홍삼경종데이
전체시험자총래수	전체 21명	국내 21명	본원 21명
연구승인기간	2018.07.12 ~ 2019.06.01		
지원의뢰기관	기관명: 농림수산식품부	대표(직위)	성명
제출서류목록	(원부) 연구계획서 [1.2] [] (원부) 변경대리표 [1.2] [] (원부) 대상자동의서 [] []		

[그림] 경북대학교병원 IRB 승인 통지서

식·의약품종합정보서비스 식품의약품안전처 식품안전관리원	
수신자: 경북대학교병원, 연구자: 윤영란 귀하(우41944 대구광역시 중구 동덕로 130 경북대학교병원 임상시험센터 약리학과)	
(경유) 제목: 의약품 임상시험계획서(연구자) 승인[경북대학교병원 윤영란 - 다이아백스정1000mg, 라시도발캡슐]	
1. 귀하께서 2018.07.02. [접수번호:20180150500] 우리 처에 제출하신 "다이아백스정 1000mg, 라시도발캡슐"의 연구자 임상시험계획서 승인신청에 대해 검토한 바, 「약사법」 제34조 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조에 적합하므로 통 규칙 제24조제7항에 따라 불필요 같이 승인합니다.	
2. 「약사법」 제34조, 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제30조, 제38조의2, [별표4] 의약품 임상시험 관리기준 및 [별표4의2] 임상시험용의약품 제조 및 품질관리기준 등 관련 법령을 준수하여 임상시험을 실시하시기 바라며, 아울러 해당 임상시험의 의약품 등 타 법령 규함 여부 등을 확인하시고 임상시험을 실시하시기 바랍니다.	
3. 우리 처에서는 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조제1항제6호에 따른 임상시험 피험자 보상에 대한 규약 및 통 규칙 [별표4]의 의약품 임상시험 관리기준 제8호차목1)에 따른 보상 절차 마련 시 고려사항 등을 제공하고자 2013년 11월 "임상시험 피험자 보상에 대한 규약 및 절차 마련을 위한 가이드라인"을 마련한 바 있으나, 임상시험 피험자 보상과 관련하여 필요한 기준이나 절차 마련 시 "우리 처 홈페이지(www.mfds.go.kr) > 정보자료 > 법령자료 > 지침, 가이드라인, 해설서"에 게시된 통 가이드라인을 꼭 참고하시기 바라며, 시험대상자의 권리안전준비가 적절히 이루어질 수 있도록 노력하여 주시기 바랍니다.	
4. 관련 승인된 임상시험계획서[Version 2.0]에 따른 임상시험 실시와 관련하여 최초 시험대상자 등록 및 임상시험 진행현황에 대해 의약품 전자민원창구(http://ezdrug.mfds.go.kr) > 보고마당 > 임상보고 > 최초 시험대상자 보고 및 임상시험 진행현황 보고에 그 사실을 보고하시기 바랍니다.	
5. 또한, 본 승인에 이의가 있을 경우에는 "민원 처리에 관한 법률" 제35조제1항에 따라 승인일로부터 60일 이내에 이의신청서를 우리 처(임상제도과)에 제출하여 주시기 바랍니다.	

[그림] 식품의약품안전처 IND 승인 공문

(5) 대상자 모집 및 스크리닝 검사 시행

- 지원자는 건강한 한국인 성인 남성으로 본 시험 참여에 서면 동의한 자 가운데 선정기준을 만족하고, 제외기준에 해당하지 않으며 시험자가 본 시험에 적합하다고 확인한 자를 최종 대상자로 선정하였음.
- 대상자는 시험에 참여하기 전에 해당 임상시험과 관련된 충분한 정보를 대상자 설명서를 통해 제공받았고, 대상자의 자유의사에 따라 서면 동의서를 받았음.
- 대상자의 동의서에는 대상자의 서명과 동의일을 기록하였고 서명된 동의서와 동의 설명문의 사본 1부는 시험대상자 본인에게 배부되었으며, 서명된 동의서 원본은 경북대학교병원에 적절히 보관되었음.
- 총 38명의 지원자가 스크리닝 검사를 시행하였고 16명이 최종 스크리닝을 통과하였으며, 신청순서에 따라 15명이 대상자로 선정됨.
- 임상시험 시작 전 개인사정으로 5명이 동의철회 하였고, 대기자 가운데 1명 (A16) 대체하여 총 11명의 대상자가 임상시험을 진행하고 2기까지 완료함.

Table 1. Subject disposition

	Total (N)
Screened	38
Enrolled	16
Completed	11

Table 2. Summary of demographic characteristics(all subjects who completed the study)

	N	Mean	SD	Median	Min	Max
Age (years)	11	24.6	4.0	24.0	19.0	31.0
Weight (kg)	11	67.7	8.4	65.3	56.8	82.0
Height (cm)	11	172.9	4.8	172.3	165.3	181.1

(6) 임상시험 진행 및 임상시료(혈장) 확보

- 임상시험 진행
 - 임상시험 일정을 table 3에 정리함

Table 3. Summary of study dates

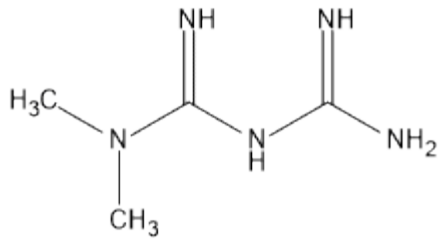
Treatment period	Date
1	2018.08.21 ~ 2018.08.26
2	2018.09.01 ~ 2018.09.16

- 선정된 대상자는 첫 투약 하루 전날(-1d) 오전 9시 30분 경 내원하여 오전 10시 경부터 경구당부하 후 약력학 채혈을 진행하고 귀가하였음
- 다음 날 오전 7시 30분 경 내원하여 건강상태를 확인하고 오전 8~9시경 연구 담당자의 감독 하에 모든 대상자에게 metformin 1000 mg을 150 mL의 물과 함께 경구로 투여하였음
- 남은 반복투여 일정 및 주의사항을 주지시킨 후 귀가하였다가 당일 오후 7시 30분경까지 다시 임상시험센터에 내원하도록 하여 metformin 1000 mg을 투여하였음
- 이후 3일간(2d~4d) 정해진 시간에 임상시험센터에 공복상태로 내원하여 metformin 1000 mg을 복용하고 귀가하였음
- 1기 마지막 투여일 전날 저녁 7시경에 경북대병원 임상시험센터에 입원하여 8시경 metformin 1000 mg을 복용하도록 하고, 오후 10시 이후 식수를 제외하고 금식하도록 하였음. 입원 이후 퇴원까지 식이 및 활동 등을 조절하도록 함.
- 입원 다음 날 오전 투여 전에 대상자 전원에게 팔 또는 손등의 정맥부위에 iv catheter 거치
- 오전 8시경 대상자 모두에게 metformin 1000 mg을 투여하고 계획된 시점에 혈장 시료 채취하였음
- 오전 10시경부터 경구당부하 후 약력학 채혈을 진행함
- 제 1기 연구 종료 후, 7일 간의 휴약기를 거친 후 제2기 첫날(12d) 오전 7시 30분경 임상시험센터에 방문하여 대상자의 건강상태를 확인하고 홍삼농축액 3포를 투여하였음
- 다음 날부터 9일간(13d~21d) 복용할 홍삼농축액을 제공하여 매일 오전 8시경 정해진 시간에 3포를 섭취하도록 교육하였음
- 제2기 11일 째(22d)에 임상시험센터에 내원하여 오전 8~9시경 공복상태에서 metformin과 홍삼농축액 3포를 병용투여하였음
- 이후 일정은 metformin 1000 mg과 홍삼농축액 병용투여를 제외하고, 제 1기 연구와 동일하게 진행하였음

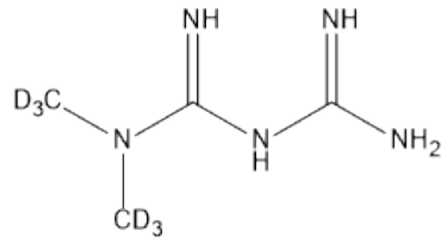
(7) 임상시험 후 혈장시료에서 투여 약물 분석

○ 메포민 분석법 개발

- 분석대상 약물: metformin
- 내부표준물질: Metformin-(dimethyl-d₆)



Metformin



Metformin-D6

- LC-MS/MS 분석조건

HPLC Operating condition						
Model	Shimadzu HPLC system					
Column	Kinetex C18 100A New Column #7 (100 × 2.1 mm, 2.6 μm, Phenomenex)					
Run time	5 min	Flow rate	200 μL/min	Inj. volume	1 μL	
Ret. time	Metformin hydrochloride (1.01 min) Metformin-(dimethyl-d ₆) hydrochloride(IS) (1.01 min)					
Solvent	A : Water (0.1% formic acid) B : Acetonitrile (0.1% formic acid)					
Gradient	none					
MS Operating condition						
Model	Shimadzu 8040 MS (triple quadrupole)					
Spray Vol.	Vaporizer Temp.	Capillary Temp.	Sheath (Neb) Gas	Ion Sweep Gas	Aux Gas	Drying Gas
(+) 4000 V (-) 3000 V	300°C	350°C	35 Arb	2.0 Arb	10 Arb	10 L/min
Gas	Neb/Dry/Aux gas		Nitrogen		Collision gas	Argon
MS/MS	Dwell time		200 msec		Pressure	212 bar
SRM	Metformin hydrochloride : 130.2>60.1 (+) Metformin-(dimethyl-d ₆) hydrochloride (IS) : 136.1>60.1 (+)					

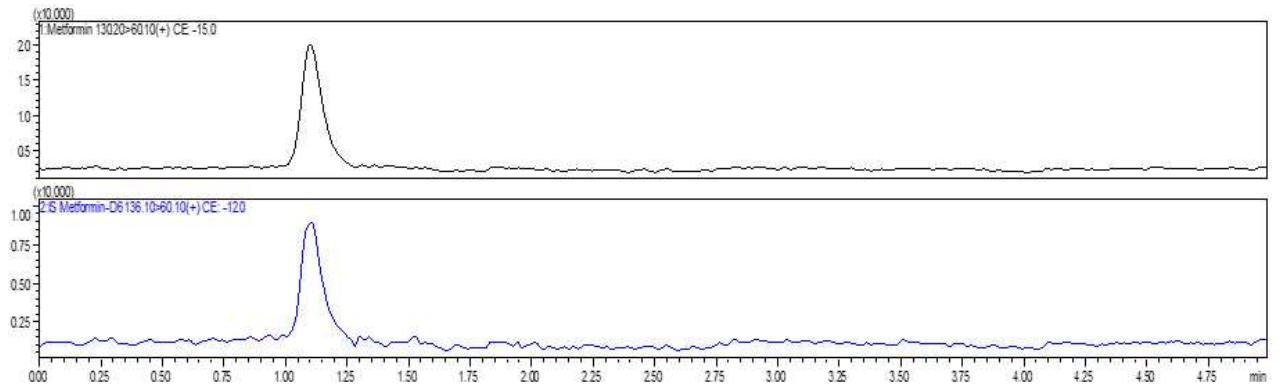
- LC-MS/MS 분석조건(SRM parameter)

Analyte	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (eV)
Metformin	+	130.2	60.1	15
Metformin-(dimethyl-d ₆) hydrochloride (IS)	+	136.1	60.1	12

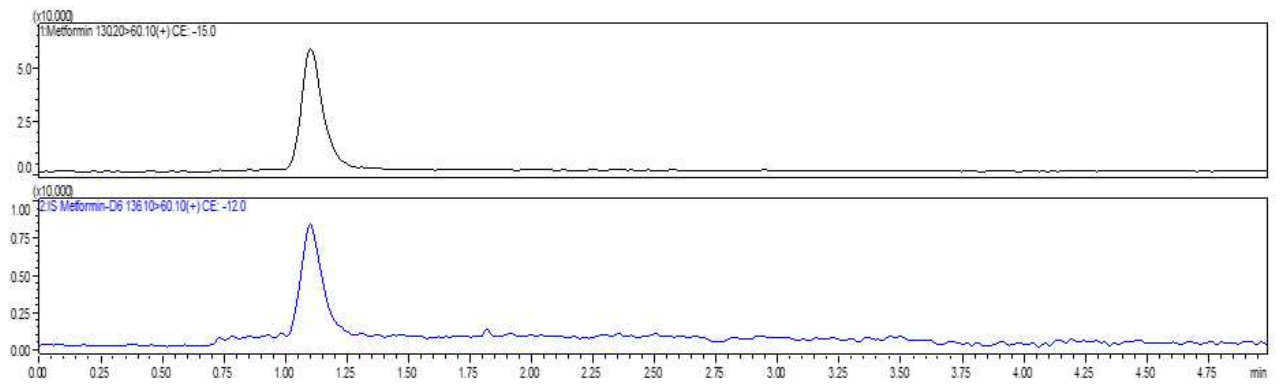
- 표준품 (B) 및 피험자 혈장 시료 (A) 중 약물농도 분석 크로마토그램

피험자 혈장 시료 (A)

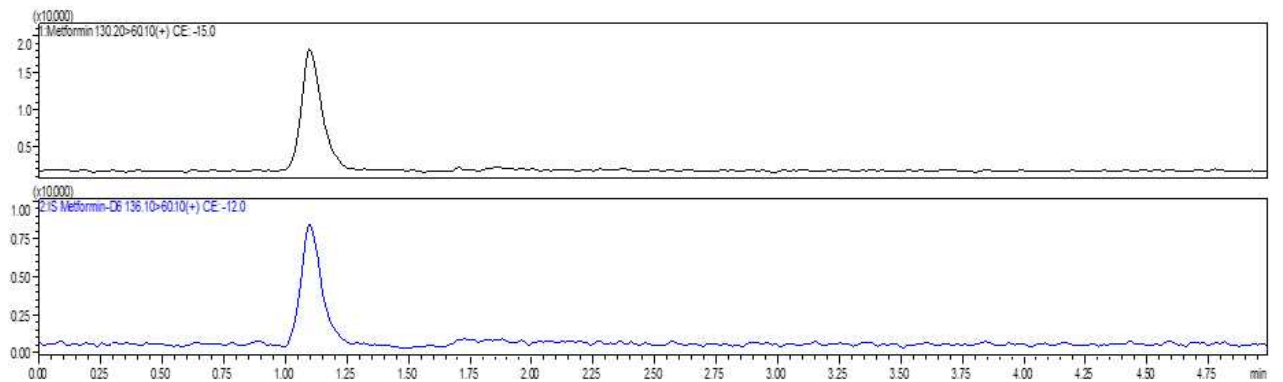
1) 피험자 A01 Time point 0 hr



2) 피험자 A01 Time point 2 hr

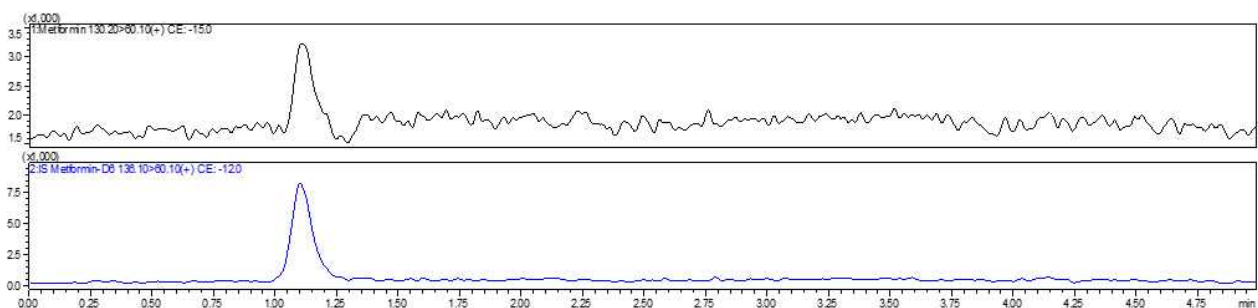


3) 피험자 A01 Time point 8 hr

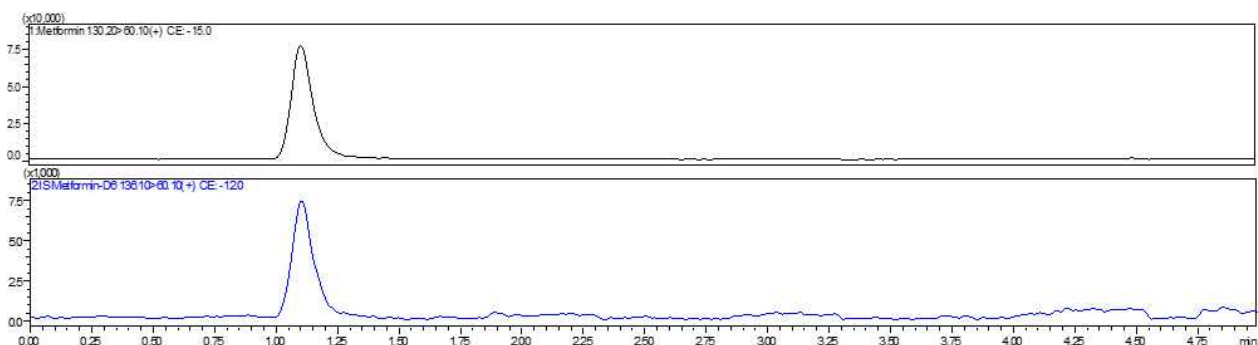


표준품(B)

1) 표준품 150 ng/ml



2) 표준품 6000 ng/ml



- 분석법 검증: 정밀성 및 정확성

Intra-day and Inter-day Precision and Accuracy in human plasma ($n = 6$)

Analyte	Added (ng/ml)	Intra-day			Inter-day		
		Precision		Accuracy (%)	Precision		Accuracy (%)
		Measured(ng/ml)	RSD (%)		Measured(ng/ml)	RSD (%)	
Metformin	200	206.5 ± 35.1	17.0	103.3	188.8 ± 17.0	9.0	94.4
	750	714.5 ± 25.1	3.5	95.3	715.1 ± 22.7	3.2	95.4
	2000	1942.4 ± 50.5	2.6	97.1	1904.5 ± 98.4	5.2	95.2

*Values are mean ± SD

- 분석법 검증: 안정성

Stability of Metformin after storage under indicate conditions

Compound	Concentration (ng/ml)	Control	12h, ambient in extracts	12h ambient	4 week -20 °C	Three freeze-thaw cycles
Metformin	200	0.34 ± 0.014	0.31 ± 0.033	0.34 ± 0.021		0.33 ± 0.011
	2000	3.59 ± 0.031	3.30 ± 0.094	3.60 ± 0.094		3.44 ± 0.105
	200	0.37 ± 0.028			0.33 ± 0.004	
	2000	3.90 ± 0.168			3.50 ± 0.189	

*Mean ± SD (n = 3)

- 분석법 검증: 검량곡선

Analyte	Retention time (min)	Calibration range (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)
Metformin	1.01	150 - 6000	150

(8) 약동학 분석 및 약물상호작용 평가

□ 약동학 분석

- 모든 계획된 채혈 일정을 완료하고 정량 가능한 metformin 혈중 농도가 있는 11명을 대상으로 약동학 분석을 실시함.
- 측정된 약물농도를 이용하여 Phoenix™ WinNonlin®(Certara, St Louis, MO, USA) version 8.1 소프트웨어를 사용하여 noncompartment method에 따라 $AUC_{tau,ss}$, $C_{max,ss}$ 등의 주요 약동학 파라미터를 산출하였음.
- 약동학 파라미터는 기술통계학적으로 분석하여, 각 치료군별로 비교 검토함. Metformin 단독투여 시와 metformin과 홍삼 병용투여 시, metformin의 $AUC_{tau,ss}$ 와 $C_{max,ss}$ 에 대하여 치료군간 유의한 차이가 있는지 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 통계적으로 비교 분석함.
- Metformin의 주요 약동학적 파라미터 분석 결과는 아래에 제시함.
 - Metformin 단독투여 시와 metformin과 홍삼 병용투여 시 metformin의 주요 약동학적 파라미터는 각각 Table 4와 5에 기술통계학적으로 분석하여 제시함.
 - Metformin의 $AUC_{tau,ss}$ 와 $C_{max,ss}$ 에 대하여 metformin 단독투여 시와 metformin

과 홍삼 병용투여 시를 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 비교한 결과, 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았음(p-value: $AUC_{\tau,ss} = 0.0619$, $C_{\max,ss} = 0.5337$).

- 홍삼과 metformin을 병용투여 하였을 때, metformin을 단독투여한 경우와 비교하여 1차 평가변수인 약동학 파라미터 $AUC_{\tau,ss}$ 와 $C_{\max,ss}$ 에서 임상적으로 의미 있는 차이가 없는 것으로 확인됨.

Table 4. Summary pharmacokinetic parameters of metformin [단독투여] (n=11)

Enrollment No	$AUC_{\tau,ss}$ (h*ng/mL)	$C_{\max,ss}$ (ng/mL)	$C_{\min,ss}$ (ng/mL)	CL_{ss}/F (L/h)	$T_{\max,ss}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)
A01	25991.49	4320.13	595.06	38.47	2.00	7.18
A02	9990.57	1683.48	202.29	100.09	1.00	3.39
A03	14050.68	2171.96	422.29	71.17	3.00	5.09
A04	13607.88	1994.43	306.13	73.49	1.00	3.67
A06	10177.04	1799.05	192.49	98.26	3.00	3.37
A08	13528.72	2119.91	318.48	73.92	1.00	3.20
A09	17283.54	2998.67	307.13	57.86	1.00	2.67
A10	9313.88	1480.22	247.11	107.37	2.00	4.51
A11	16668.47	2752.93	248.60	59.99	2.00	2.65
A12	16732.03	2173.68	326.15	59.77	4.00	2.43
A16	14097.57	2379.38	342.18	70.93	1.50	3.73
N	11	11	11	11	11	11
Median	14050.68	2171.96	307.13	71.17	2.00	3.39
Min	9313.88	1480.22	192.49	38.47	1.00	2.43
Max	25991.49	4320.13	595.06	107.37	4.00	7.18
Mean	14676.53	2352.17	318.90	73.76	1.95	3.81
SD	4660.11	788.15	112.93	20.79	1.01	1.37
CV(%)	31.75	33.51	35.41	28.18	51.74	36.05

† CV(%): Inter-individual coefficient of variation

Table 5. Summary pharmacokinetic parameters of metformin [병용투여] (n=11)

Enrollment No	$AUC_{\tau,ss}$ (h*ng/mL)	$C_{\max,ss}$ (ng/mL)	$C_{\min,ss}$ (ng/mL)	CL_{ss}/F (L/h)	$T_{\max,ss}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)
A01	15465.92	3017.79	322.83	64.66	1.50	4.74
A02	7636.32	1457.33	183.70	130.95	2.00	4.32
A03	9317.26	1501.38	192.30	107.33	2.00	3.13
A04	10838.12	1750.81	183.17	92.27	3.00	2.61
A06	9561.16	1927.30	0.00	104.59	1.00	2.36
A08	19687.75	3877.23	371.06	50.79	1.00	3.98
A09	9782.61	1576.57	199.04	102.22	2.00	3.16

A10	12184.55	3229.80	262.21	82.07	3.00	3.50
A11	10127.95	1963.64	163.14	98.74	1.50	2.75
A12	12736.22	2634.68	195.95	78.52	2.00	2.64
A16	10377.49	1889.28	308.89	96.36	1.00	5.69
N	11	11	11	11	11	11
Median	10377.49	1927.30	195.95	96.36	2.00	3.16
Min	7636.32	1457.33	0.00	50.79	1.00	2.36
Max	19687.75	3877.23	371.06	130.95	3.00	5.69
Mean	11610.49	2256.89	216.57	91.68	1.82	3.53
SD	3385.44	809.48	99.52	21.92	0.72	1.04
CV(%)	29.16	35.87	45.95	23.91	39.42	29.52

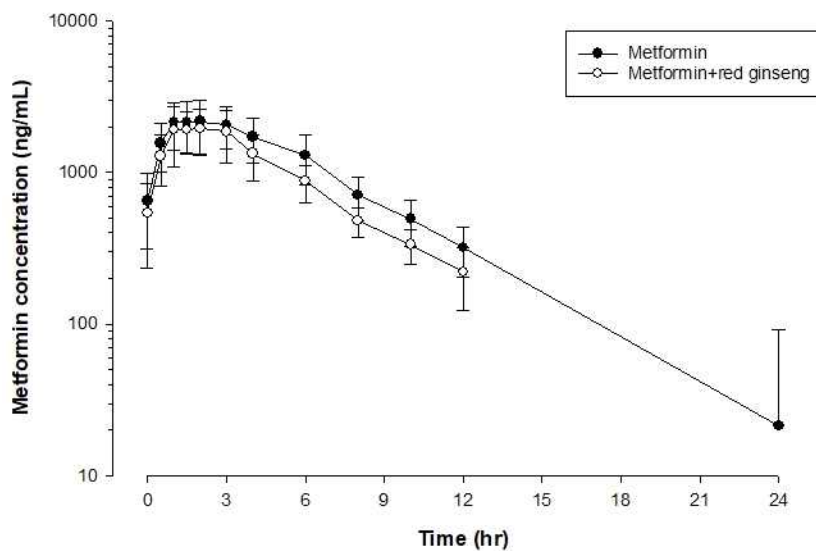
†CV(%): Inter-individual coefficient of variation

Table 6. Statistical analysis of pharmacokinetics for metformin (n=11)

Pharmacokinetic parameter	Geometric mean		p-value*
	병용투여	단독투여	
AUC _{tau,ss}	11229.88	14084.45	0.0619
C _{max,ss}	2139.49	2253.03	0.5337

* Wilcoxon signed rank test

- Metformin의 평균 혈장 농도-시간 양상을 아래 그림에 나타내었음.



(9) 약력학 분석 및 약물상호작용 평가

□ 약력학 분석

- 모든 계획된 채혈 일정을 완료하고 정량 가능한 glucose 혈중 농도가 있는 11명을 대상으로 약력학 분석을 실시함.
- 측정된 glucose 혈중 농도를 이용하여 Phoenix™ WinNonlin®(Certara, St Louis, MO, USA) version 8.1 소프트웨어를 사용하여 noncompartment method에 따라 glucose에 대한 주요 약력학 파라미터(AUC, G_{max})를 산출하였음.
- 약력학 파라미터는 기술통계학적으로 분석하여, 각 치료군별로 비교 검토함. Metformin 단독투여 시와 metformin과 홍삼 병용투여 시, glucose의 AUC, G_{max} 에 대하여 change from baseline(%)이 치료군간 유의한 차이가 있는지 paired t-test를 이용하여 통계적으로 비교 분석함.
- Glucose에 대한 주요 약력학적 파라미터 분석 결과는 아래에 제시함.
 - Baseline, 단독투여 시, 병용투여 시 경구당부하검사(OGTT)를 시행하여 측정된 glucose에 대한 주요 약력학적 파라미터는 각각 Table 7~9에 기술통계학적으로 분석하여 제시함.
 - Baseline과 단독투여 시 그리고, baseline과 병용투여 시 경구당부하검사를 시행하여 측정된 glucose의 AUC, G_{max} 에 대하여 각각 유의한 차이가 있는지 paired t-test를 이용하여 통계적으로 비교 분석함.
 - Baseline과 단독 및 병용투여 시 경구당부하검사를 시행하여 측정된 glucose의 AUC, G_{max} 에 대하여 유의한 차이가 있는지 ANOVA를 이용하여 통계적으로 비교 분석함.
 - Glucose의 AUC, G_{max} 에 대하여 metformin 단독투여 시와 metformin과 홍삼 병용투여 시 change from baseline(%)을 paired t-test를 이용하여 비교한 결과, 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았음(AUC, G_{max} p-value 각각 0.0840, 0.0986).
 - 홍삼과 metformin을 병용투여 하였을 때, metformin을 단독투여한 경우와 비교하여 1차 평가변수인 약동학 파라미터 AUC와 G_{max} 에서 임상적으로 의미 있는 차이가 없는 것으로 확인됨.

Table 7. Summary pharmacodynamic parameters of glucose [baseline](n=11)

Enrollment No	AUC	G _{max}
A01	391.13	174.00
A02	464.88	159.00
A03	543.88	174.00
A04	342.13	126.00
A06	366.00	149.00
A08	406.75	170.00
A09	413.88	161.00
A10	432.00	163.00
A11	430.25	177.00
A12	359.88	141.00
A16	420.00	150.00
N	11	11
Median	413.88	161.00
Min	342.13	126.00
Max	543.88	177.00
Mean	415.53	158.55
SD	55.70	15.83
CV(%)	13.41	9.99

†CV(%): Inter-individual coefficient of variation

Table 8. Summary pharmacodynamic parameters of glucose [단독투여] (n=11)

Enrollment No	AUC	G _{max}
A01	333.25	116.00
A02	476.00	139.00
A03	471.25	147.00
A04	422.75	144.00
A06	380.75	134.00
A08	476.63	157.00
A09	395.13	110.00
A10	496.38	166.00
A11	382.13	127.00
A12	432.75	130.00
A16	473.13	157.00
N	11	11
Median	432.75	139.00
Min	333.25	110.00
Max	496.38	166.00
Mean	430.92	138.82
SD	52.54	17.57
CV(%)	12.19	12.65

†CV(%): Inter-individual coefficient of variation

Table 9. Summary pharmacodynamic parameters of glucose [병용투여] (n=11)

Enrollment No	AUC	G _{max}
A01	435.00	147.00
A02	577.88	176.00
A03	507.25	163.00
A04	387.25	126.00
A06	403.38	136.00
A08	479.75	172.00
A09	406.00	127.00
A10	475.75	162.00
A11	415.25	135.00
A12	434.63	129.00
A16	516.88	162.00
N	11	11
Median	435.00	147.00
Min	387.25	126.00
Max	577.88	176.00
Mean	458.09	148.64
SD	58.86	18.90
CV(%)	12.85	12.72

†CV(%): Inter-individual coefficient of variation

Table 10. Comparisons of pharmacodynamic parameters (Baseline, 단독투여) (n=11)

Pharmacodynamic parameter	baseline	단독투여	Baseline - 단독투여	Baseline - 단독투여 /baseline(%)	p-value*
AUC	415.53±55.70	430.92±52.54	-15.40±57.17	-4.65±14.04	0.3927
G _{max}	158.55±15.83	138.82±17.57	19.73±24.92	11.46±15.22	0.0254

* Paired t-test

Table 11. Comparisons of pharmacodynamic parameters (Baseline, 병용투여) (n=11)

Pharmacodynamic parameter	baseline	병용투여	Baseline - 병용투여	Baseline - 병용투여 /baseline(%)	p-value*
AUC	415.53±55.70	458.09±58.86	-42.57±46.95	-10.79±10.78	0.0132
G _{max}	158.55±15.83	148.64±18.90	9.91±18.55	5.88±11.13	0.1069

* Paired t-test

Table 12. Comparisons of pharmacodynamic parameters (Baseline, 단독투여, 병용투여) (n=11)

Pharmacodynamic parameter	baseline	단독투여	병용투여	p-value*
AUC	415.53±55.70	430.92±52.54	458.09±58.86	0.2102
G _{max}	158.55±15.83	138.82±17.57	148.64±18.90	0.0429

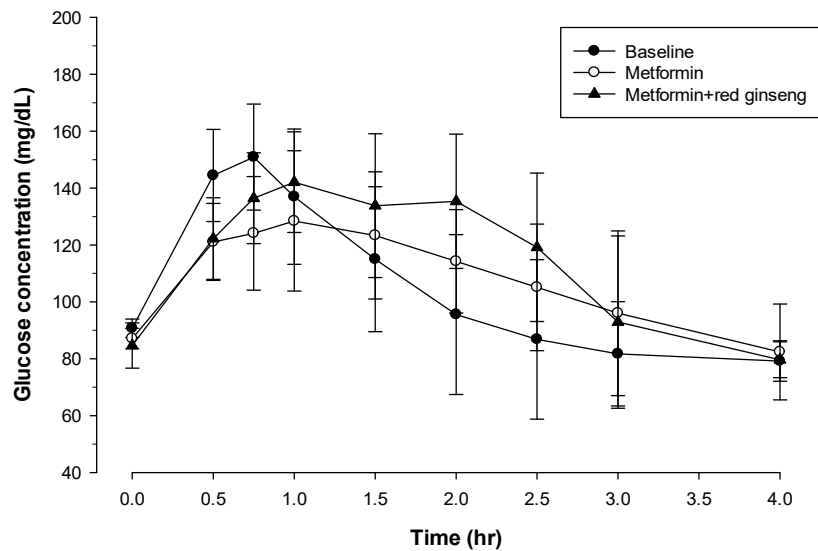
* ANOVA

Table 13. Statistical analysis of pharmacodynamics for glucose (Baseline - 단독투여/ baseline(%), Baseline - 병용투여/baseline(%)) (n=11)

Pharmacodynamic parameter	Baseline - 병용투여/ baseline(%)	Baseline - 단독투여/ baseline(%)	p-value*
AUC	-10.79±10.78	-4.65±14.04	0.0840
G _{max}	5.88±11.13	11.46±15.22	0.0986

* Paired t-test

- Glucose의 평균 혈장 농도-시간 양상을 아래 그림에 나타내었음.



(10) 안전성 평가

안전성 평가항목

보고된 이상반응 등을 통한 안전성 평가

- 임상시험용 제제인 홍삼 및 metformin을 최소 1회 이상 투여 받은 11명의 대상자들의 안전성을 평가함
- 안전성 평가변수
 - 활력징후, 12-lead 심전도, 임상실험실검사*, 신체검진, 이상반응 모니터링, 병용약물
 - 복용 여부 확인 등을 종합적으로 고려하여 비교 평가함(투약이 이루어진 시점 이후에 발생한 이상반응 건에 대해서만 treatment emergent AE로 안전성 평가에 적용함).
 - 기존에 알려진 약물이상반응의 발생 여부, 정도 및 빈도를 임상시험용 제제 투여 전후에 비교 평가함.
 - 연구 전 기간에 걸쳐 대상자의 상태(증상 및 징후)를 수시로 관찰하였으며, 문진은 대상자가 상태를 설명할 수 있는 방법으로 함.
 - 임상실험실 검사 항목은 다음과 같음

* 임상실험실 검사

- 혈액학 검사
 - WBC with differential count (seg. neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils), RBC, hemoglobin, hematocrit, platelet
- 혈액화학 검사
 - Glucose (fasting), BUN, creatinine, AST, ALT, total bilirubin, albumin
- 요 검사
 - Specific gravity, pH, protein, glucose, bilirubin, occult blood, urobilinogen, microscopy(RBC, WBC)
- 혈액응고검사: PT, aPTT

□ 안전성 평가결과

○ 요약

- 임상연구용 제제를 1회 이상 투여 받은 11명의 대상자 중 3명(27.27%, 3/11명)의 대상자에서 3건의 이상반응이 발생함.
- 발생한 3건 이상반응은 모두 임상시험용 의약품과의 인과관계를 배제할 수 없는 약물이상반응(ADR) 이었으며, metformin 단독투여에서 3건(diarrhoea 2건, nausea 1건) 보고되었음.
- 임상연구용 제제와의 인과관계는 보고된 이상반응 3건 모두 '관련성이 많음'

(probable)'으로 평가됨.

- 발생한 이상반응 3건의 중증도(severity)는 경증(mild) 1건(nausea), 중등증(moderate) 2건(diarrhoea 2건)이었으며 보고된 이상반응은 모두 완전히 회복되었음을 확인함.

Table 14. Individual adverse events (AEs)

Enrollment No	Preferred Term	Start date	End date	AE category	Causal Relationship	Severity
A04	nausea	2018-08-26	2018-09-14	ADR	probable	mild
A06	diarrhoea	2018-08-26	2018-09-19	ADR	probable	moderate
A11	diarrhoea	2018-08-22	2018-09-17	ADR	probable	moderate

- 안전성 평가 항목에서 임상적으로 의미 있는 중대한 변화는 발견되지 않았고, 전 임상시험 기간을 걸쳐 중대한 이상반응/약물이상반응(serious AE/ADR)은 발생하지 않았으며, 예상하지 못한 약물이상반응(unexpected ADR) 역시 발생하지 않았음.
- 홍삼과 metformin 병용투여와 metformin 단독투여를 비교하였을 때, 안전성은 양호한 것으로 판단됨.
- 안전성 평가변수 중 심전도 검사 결과를 요약하여 Table 15에 제시함
 - 임상시험 기간 동안 임상적으로 유의한 심전도 소견은 관찰되지 않음

Table 15. Electrocardiography (n=11)

	Screening	Period 2
Normal or NCS	11 (100%)	11 (100%)
CS	0 (0%)	0 (0%)

n (%), NCS (Not Clinically Significant), CS (Clinically Significant)

- 안전성 평가변수 중 혈액화학 검사 결과를 요약하여 Table 16에 제시함
 - 임상적으로 유의한 소견은 관찰되지 않음

Table 16. Chemistry (n=11)

Chemistry	Screening			Period 1			Period 2		
	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)
AST	16.27	4.50	27.63	12.82	1.54	11.99	17.64	8.95	50.73
ALT	13.00	5.78	44.46	9.73	2.65	27.23	12.27	2.76	22.49
Albumin	5.03	0.19	3.78	-	-	-	-	-	-
Total bilirubin	0.78	0.31	39.97	-	-	-	-	-	-
BUN	12.45	2.54	20.40	10.14	2.22	21.88	10.25	1.69	16.50
Creatinine	1.01	0.15	15.05	0.91	0.10	11.18	0.93	0.12	13.21
Glucose	97.45	3.17	3.26	-	-	-	-	-	-

†CV(%): Inter-individual coefficient of variation

- 안전성 평가변수 중 혈액응고 검사 결과를 요약하여 Table 17에 제시함
- 임상적으로 유의한 소견은 관찰되지 않음

Table 17. Blood coagulation test (n=11)

		Screening			Period 1			Period 2		
		Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)
PT	sec	11.34	0.43	3.81	11.61	0.45	3.88	11.48	0.62	5.44
	%	100.47	7.03	7.00	96.16	6.42	6.68	98.49	9.83	9.98
	INR	1.00	0.04	3.86	1.03	0.04	4.01	1.02	0.06	5.47
aPTT	sec	26.29	1.48	5.62	27.86	1.09	3.92	27.49	2.35	8.53

†CV(%): Inter-individual coefficient of variation

- 안전성 평가변수 중 혈압 결과를 요약하여 Table 18에 나타냄
- 임상적으로 유의한 소견은 관찰되지 않음

Table 18. Blood pressure (n=11)

		SBP			DBP			
		Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)	
Screening		125.45	9.71	7.74	75.09	6.58	8.76	
Period 1	Day 1	121.18	8.26	6.81	70.64	7.03	9.96	
	Day 5	0h	121.09	9.58	7.91	75.00	6.94	9.26
		4h	121.73	9.34	7.67	69.82	7.31	10.46
	Day 6	24h	123.09	8.62	7.00	76.27	5.98	7.85
Period 2	Day 12	128.18	9.47	7.39	74.09	10.24	13.82	
	Day 22	125.73	6.74	5.36	74.18	8.78	11.84	
	Day 26	0h	118.00	9.10	7.71	70.82	7.00	9.88
		4h	125.36	7.86	6.27	74.09	8.36	11.28
	Day 27	24h	117.18	7.97	6.80	74.36	5.55	7.47

†CV(%): Inter-individual coefficient of variation

- 안전성 평가변수 중 체온 결과를 요약하여 Table 19에 나타냄
- 임상적으로 유의한 소견은 관찰되지 않음

Table 19. Body temperature (n=11)

		Body temperature			
		Mean	SD	CV(%)	
Screening		36.48	0.27	0.73	
Period 1	Day 1	36.30	0.31	0.85	
	Day 12	36.16	0.29	0.81	
	Day 22	36.37	0.29	0.80	
Period 2	Day 26	0h	36.17	0.10	0.28
		2h	36.45	0.23	0.64
		4h	36.59	0.19	0.51
	Day 26	6h	36.60	0.31	0.84
		8h	36.75	0.21	0.58
		12h	36.84	0.25	0.67
	Day 27	24h	36.26	0.25	0.68

†CV(%): Inter-individual coefficient of variation

2-8. 홍삼-당뇨치료제 상호작용

(1) 메포민 선정

메트포르민(metformin)은 바이구아니드계(biguanides) 경구용 당뇨병치료제이다. 이 약물은 2형 당뇨병 치료에 1차 약물로 사용되며, 특히 정상 신기능을 가지는 과체중 혹은 비만 환자에게 사용된다. 메트포르민의 작용기전은 정확하게 밝혀지지 않았으나, 1) 미토콘드리아에서 일어나는 세포호흡을 억제하고 2) AMPK를 활성화시키며, 3) 글루카곤에 의해 유도되는 cAMP(Cyclic adenosine monophosphate)의 농도 상승을 막아 결과적으로 PKA(Protein kinase A)의 활성을 억제한다고 알려져 있다. 특히, AMPK는 인슐린이 작용하는데 중요한 역할을 하는 효소이다. AMPK가 활성화되면 포도당을 세포내로 흡수하는 GLUT4 (glucose transporter 4)의 수가 증가하여 포도당을 세포내로 흡수하므로 혈중에 있는 포도당의 농도가 감소한다.

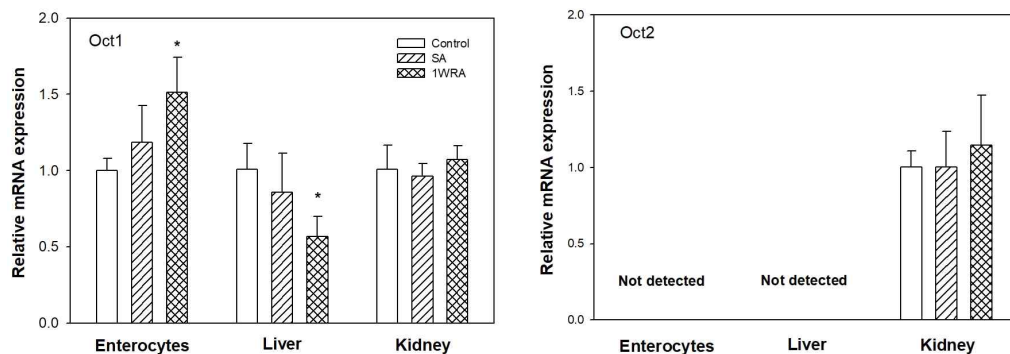
(2) 정상군에서의 홍삼-메포민 상호작용

(가) 메포민의 주요 수송체인 OCT1과 OCT2의 발현 변화

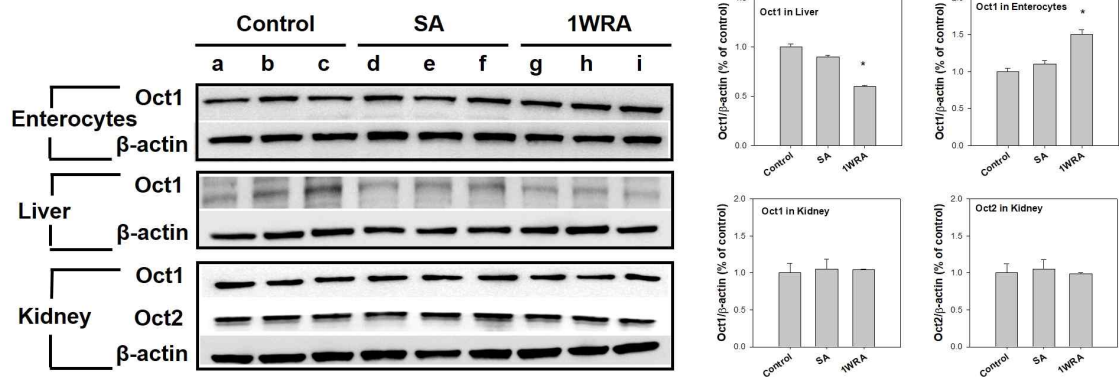
- metformin의 간으로의 이동과 신장으로의 배설에 중요한 역할을 수행하는 Oct1과 Oct2의 발현은 조직에 따라 다른 영향을 나타내었다. Oct1은 반복투여시 위장관에서 발현은 증가하고, 간에서의 발현은 감소하였으며, 신장에서의 발현은 변화가 없었다.

- Oct2의 발현은 소장과 간에서는 측정되지 않았고, 신장에서는 유의적인 변화가 없었다.

- 이 변화가 단백질의 변화에도 동일하게 나타나는지 확인하기 위하여 western blot을 수행하였고, mRNA 발현과 유사한 경향을 나타내었다.



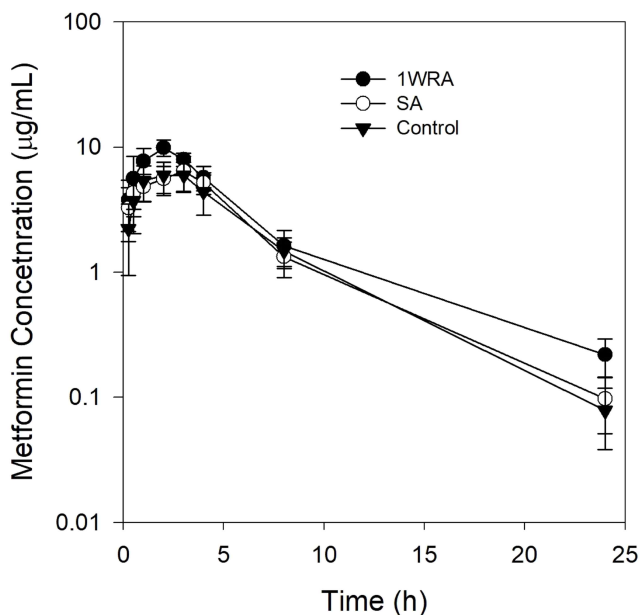
mRNA expression of organic cation transporter 1 (Oct1) in the liver, enterocytes, and the kidney and Oct2 in the kidney of rats in control, single RGE treatment (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA) groups.



Protein expression of organic cation transporter 1 (Oct1) in the liver, enterocytes, and the kidney and Oct2 in the kidney of rats in control (lanes a, b, and c), single RGE treatment (SA, lanes d, e, and f), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, lanes g, h, and i) groups and β -actin was used as a loading control. Quantitative analysis of western blot results is shown in the lower panel. Bar are mean \pm SD of three independent densitometric analyses.

(나) 메포민의 약동학적 특성 변화

- 메포민의 혈중 농도는 대조군과 단회투여군에서는 유의적인 변화가 없었으나, 반복투여시 반감기가 감소하고 혈중 농도가 증가하였다. 또한 24시간까지의 총 배설량도 증가하였다.



Plasma concentration-time profile of metformin in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group following oral administration of metformin at a dose of 50 mg/kg.

Pharmacokinetic parameters of metformin in control and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group following oral administration of metformin at a dose of 50 mg/kg.

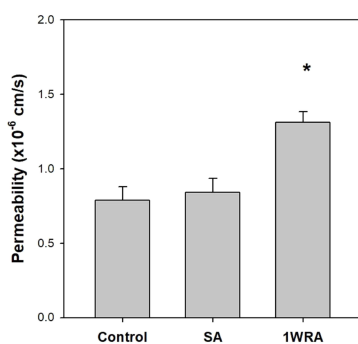
PK Parameters	Control	SA	1WRA
Half-life ($T_{1/2}$)	3.53 ± 0.74	3.56±0.47	4.43 ± 0.74 *
C_{max} (µg/mL)	6.31 ± 1.68	6.47±2.00	9.90 ± 1.49 *
T_{max} (ng/mL)	2.40 ± 0.89	2.50±1.12	2.00 ± 0.01
AUC_{24h} (µg·h/mL)	44.31 ± 8.31	45.20±11.12	57.62± 4.99 *
AUC_{∞} (µg·h/mL)	44.75 ± 8.09	45.72±11.18	59.04 ±5.17 *
MRT (h)	4.85 ± 0.58	4.69±0.33	4.64 ± 0.68
Ae_{24h} (%)	54.56 ± 3.26	53.04±3.69	66.29 ± 10.57 *

Data represent mean ± SD of five rats per group

* $p < 0.05$ compared with control group (by student t -test).

(다) 위장관 투과도 평가

- 대조군과 단회투여군에 비하여 1주 반복투여한 군에서는 위장관 투과도가 증가하였다.
- 약동학 특성의 변화를 고려하면 위장관에 존재하는 Oct1 수송체의 발현증가기 위장관에서의 메포민 흡수를 증가시키고, 간에서의 Oct1 발현감소가 약물의 소실을 감소시켜 혈중 농도를 증가시켰다. 위장관 투과도가 증가하여 메포민의 흡수가 증가하였으므로 신장을 통한 배설도 증가한 것으로 판단되었다.
- 그러나 이러한 변화는 유의적이기는 하지만 변화의 비율은 20% 내외로 임상적으로 유의미한 변화로 사료되지는 않는다.



Intestinal absorptive permeability (P_{app}) of metformin from rats of control, single RGE treatment (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA) groups was measured.

(3) 당뇨병 질환군에서의 홍삼-메포민 상호작용

(가) 당뇨 동물모델

- Streptozotocin을 랫드에 30 mg/kg로 1주 간격으로 2회 복강주사함
- 당뇨유도는 혈당과 요량, water intake로 확인하였다.
- 당뇨모델에서 항당뇨약으로 가장 빈용처방되는 metformin 50 mg/kg과 홍삼추출액 2 g/kg 용량으로 단회 경구투여하여 홍삼과 metformin의 약동학적 상호작용이 있는 지를 평가하였다.
- 당뇨모델에서 metformin 50 mg/kg과 홍삼추출액 2 g/kg 용량으로 5주간 경구투여하여 홍삼과 metformin의 약동학적 상호작용이 있는 지를 평가하였다.

(나) 혈장 및 뇨 시료 중 메포민 분석

- LC-MS/MS 분석조건

• LC Conditions

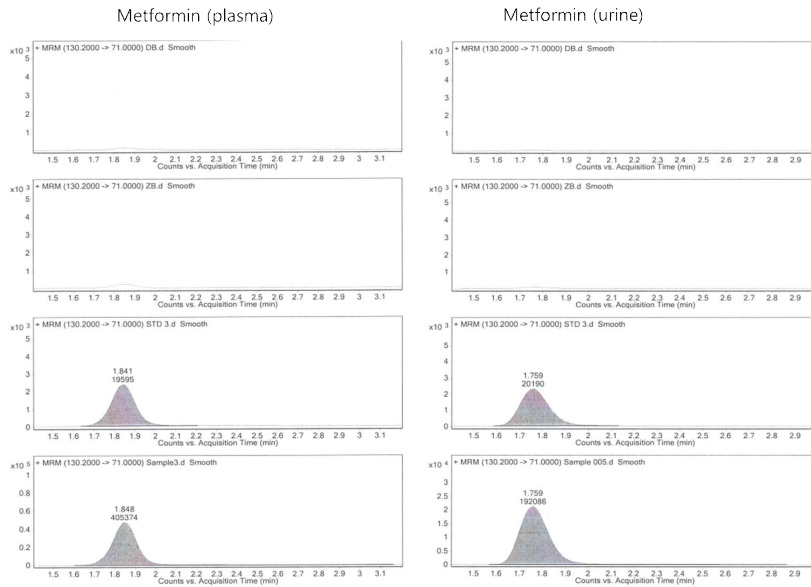
Instrument	Agilent Infinity 1260
Analytical column	Synergi Polar RP (4 mm, 2.0 mm i.d. x 150 mm, Phenomenex)
Mobile phase	isocratic elution of (A) 0.1% formic acid in DW and (B) 0.1% formic acid in methanol A : B = 30 : 70
Flow rate	0.2 mL/min
Column oven temperature	30 °C
Auto sampler temperature	10 °C
Injection volume	0.3 µL
Run time	3.2 min

• MS/MS Conditions

Instrument	Agilent 6430 Triple Quadrupole MS
Ionization	Electrospray ionization with positive ion mode
Gas temperature	300°C
Gas flow	10 L/min
Nebulizer	35 psi
Capillary	4000 V
Quantification	Multiple reaction monitoring (MRM) mode

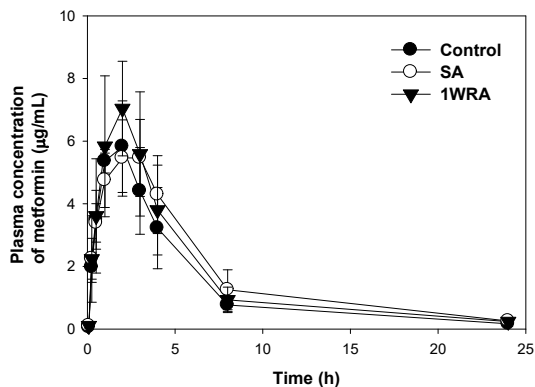
Compound	Mass transition (<i>m/z</i>)	Retention time (min)	Collision energy (V)
Metformin	130.2→71.0	1.8	20
Propranolol (IS)	260.0→116.0	2.5	10

- 분석 크로마토그램 (혈장/urine)



(다) 홍삼-메포민의 약동학적 상호작용

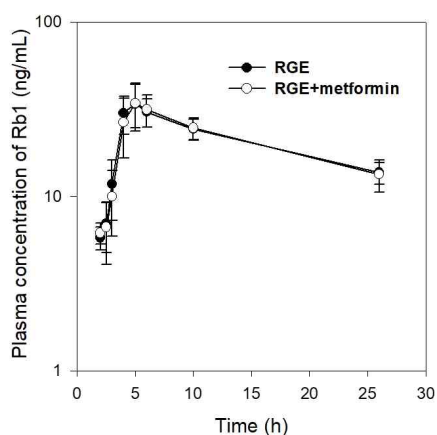
- 당뇨병 질환군에서 메포민의 혈중 농도 및 홍삼의 유효성분인 ginsenoside의 혈중 농도는 상호 영향을 받지 않음



Plasma concentration-time profile of metformin after single oral administration (50 mg/kg) alone (control) and following single (SA) or multiple administration (1WRA) of red ginseng extract (RGE, 2 g/kg/day) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

Pharmacokinetic parameters of metformin after single oral administration (50 mg/kg) alone and following single (SA) or multiple administration (1WRA) of red ginseng extract (RGE, 2 g/kg/day) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

Parameters	Control	SA	1WRA	P value
C_{max} $\mu\text{g/mL}$	6.29±1.04	5.54±1.20	7.58±1.39	0.06
T_{max} h	1.80±0.45	2.40±0.55	1.80±0.84	0.26
AUC_{24h} $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	33.07±6.82	41.59±11.93	39.58±9.50	0.37
AUC_{∞} $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	34.27±6.63	43.49±11.72	41.18±10.30	0.33
$t_{1/2}$ h	4.59±1.14	5.05±0.64	4.53±0.40	0.65
MRT h	5.68±1.28	6.63±0.77	5.77±0.91	0.29
Ae_{24h} % of dose	45.14±3.26	48.37±5.87	41.89±9.19	0.33



Plasma concentration-time profile of ginsenoside Rb1 following a single oral dose of RGE (2 g/kg) in the absence or presence of metformin (50 mg/kg) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Data points are means \pm SD of five rats

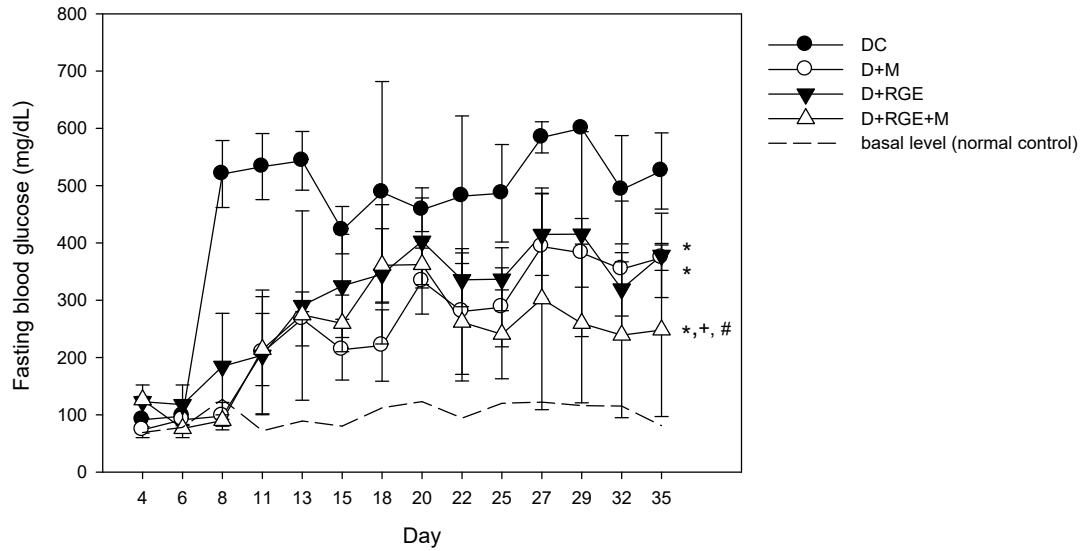
Pharmacokinetic parameters of ginsenoside Rb1 following a single oral dose (2 g/kg) of RGE in the absence or presence of metformin (50 mg/kg) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

Parameters	RGE	RGE + metformin	P value
C_{max} ng/mL	36.59±7.94	35.03±8.82	0.31
AUC_{24h} ng · h/mL	512.25±30.06	511.45±75.26	0.98
$t_{1/2}$ h	11.88±0.75	11.86±0.79	0.93

(다) 홍삼-메포민의 약효 상호작용

- Fasting glucose level :

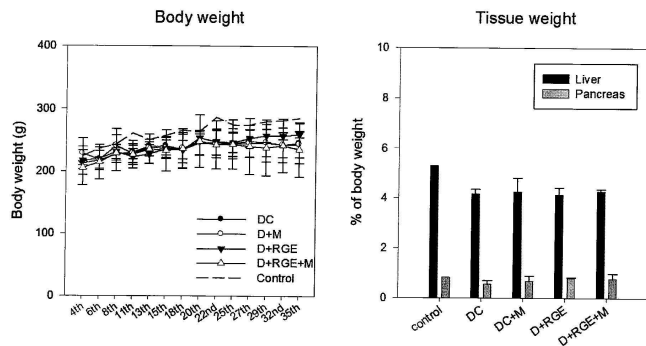
공복후 혈당농도는 메포민 단독투여군 또는 홍삼 단독투여군에 비하여 메포민과 홍삼을 동시 투여한 군에서 유의적으로 낮은 값을 보임



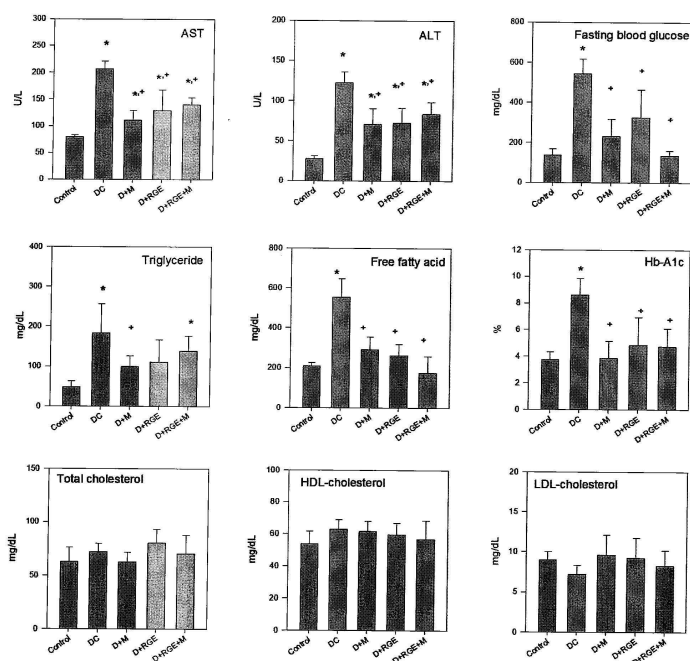
Effects of oral administration of metformin (M) and red ginseng extract (RGE) alone or combined on fasting blood glucose concentration of normal control (---), streptozotocin (STZ)-induced diabetic group (●, DC), diabetic rats treated with metformin (○, D + M, 50 mg/kg/day), diabetic rats supplemented with RGE (▼, D + RGE, 2 g/kg/day), and diabetic rats treated with metformin and RGE (△, D + RGE + M). Data points are means ± SD of four different rats per group.

*p < 0.05 compared with DC group; + p < 0.05 compared with D+M group; # p < 0.05 compared with D+RGE group using two-way ANOVA test.

- 몸무게, 간무게, 췌장무게는 메포민 단독투여군과 메포민과 홍삼투여군에서 유의적인 차이가 없음

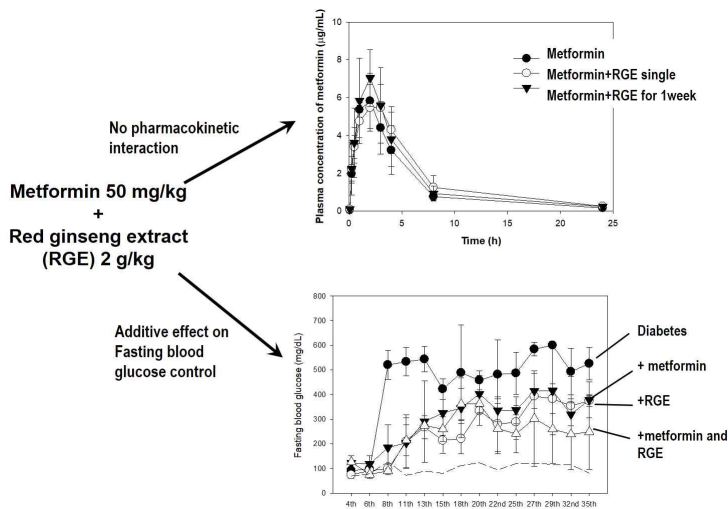


- alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)는 당뇨병 모델에서 증가하였고 메포민 또는 홍삼단독투여에 의하여 유의적으로 감소하였으나 정산균 수준으로 감소하지는 않았다. 홍삼과 메포민을 병용투여한 군에서도 유사한 결과를 나타내었다.
- Fasting blood glucose 수준은 메포민 단독투여군 또는 홍삼 단독투여군에 비하여 메포민과 홍삼을 동시 투여한 군에서 유의적으로 낮은 값을 보임
- triglyceride, free fatty acid, hemoglobin-A1c (Hb-A1c) 수준은 당뇨병환군에 비하여 메포민 또는 홍삼 단독투여군에서 감소하였으나 메포민과 홍삼 병용투여군과 비교하여 유의적인 차이가 없음
- total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol 수준은 당뇨병환군, 메포민 또는 홍삼 단독투여군과 메포민과 홍삼 동시투여군에서 유의적인 차이가 없음



Biochemical parameters, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), fasting blood glucose, triglyceride, free fatty acid, hemoglobin-A1c (Hb-A1c), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels in normal control, streptozotocin (STZ)-induced diabetic group (DC), diabetic rats treated with metformin (D + M), diabetic rats supplemented with RGE (D + RGE), and diabetic rats treated with metformin and RGE (D + RGE + M). Bars represent means \pm SD of four rats per group; * $p < 0.05$ compared with control group using Student's t-test; + $p < 0.05$ compared with DC group using Student's t-test

(라) 요약



이상의 결과를 요약하면 streptozotocin으로 유도한 당뇨모델에서 메포민과 홍삼을 병용투여하면 약동학적 상호작용은 나타나지 않았지만, 홍삼 2g/kg와 메포민 50 mg/kg 용량으로 병용투여하면 상가작용에 의하여 공복혈당이 감소하였다. 그러나 hemoglobin-A1c (Hb-A1c)은 상가작용이 나타나지 않았다.

2-9. 홍삼-warfarin 상호작용

(1) Warfarin

와파린은 혈전과 색전 형성을 방지하는데 사용된다. 뇌졸중, 심근경색, 심정맥혈전증, 폐색전의 큰 위험이 있는 환자 또는 둔부나 무릎 수술을 받은 환자, 장기간의 중심정맥삽관이나 인공심장판막을 시술 받은 환자, 그리고 최근에 심근경색증을 경험한 환자에게 투여된다.

와파린의 혈중 농도 증가는 출혈부작용과 상관관계에 있으므로 인삼의 복용에 따른 혈중 농도의 변화와 항응고작용의 변화를 함께 관찰하는 것이 중요하다.

(2) 혈장 및 뇨 시료 중 와파린 및 대사체 분석

- LC-MS/MS 분석조건

- LC Conditions

Instrument	Agilent Infinity 1260
Analytical column	Synergi 2.5u Hydro-RP (2.5 μm, 2.0 mm x 100 mm, Phenomenex)
Mobile phase	isocratic elution of (A) 0.1% formic acid in DW and (B) 0.1% formic acid in methanol A : B = 20 : 80
Flow rate	0.15 mL/min
Column oven temperature	30 °C
Auto sampler temperature	10 °C
Injection volume	10 μL
Run time	5.0 min

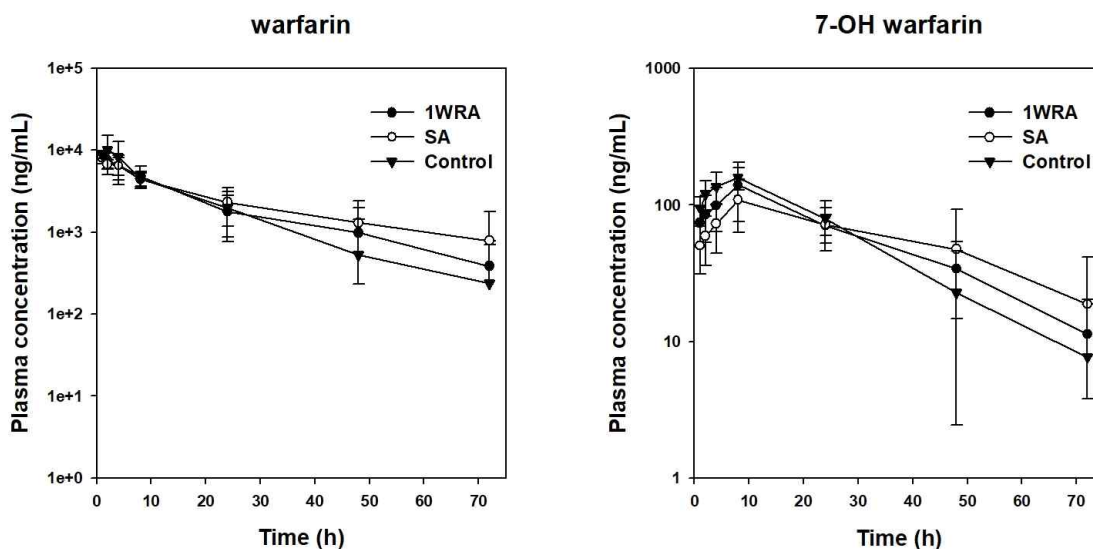
• MS/MS Conditions

Instrument	Agilent 6430 Triple Quadrupole MS		
Ionization	Electrospray ionization with positive ion mode		
Gas temperature	300°C		
Gas flow	10 L/min		
Nebulizer	35 psi		
Capillary	4000 V		
Quantification	Multiple reaction monitoring (MRM) mode		
	Compound	Mass transition (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)
	Warfarin	307.1→161.2	15
	7-OH warfarin	323.1→177.2	15
	Naringenin (IS)	271.1→151.3	15

(3) 홍삼-와파린의 약동학적 상호작용

홍삼과 와파린을 병용투여했을 경우 와파린의 혈중농도에는 유의적인 변화가 없음.

또한 대사체의 혈중 농도에도 유의적인 변화가 없음



Plasma concentration-time profile of warfarin and 7-OH warfarin in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group following oral administration of warfarin at a dose of 1 mg/kg.

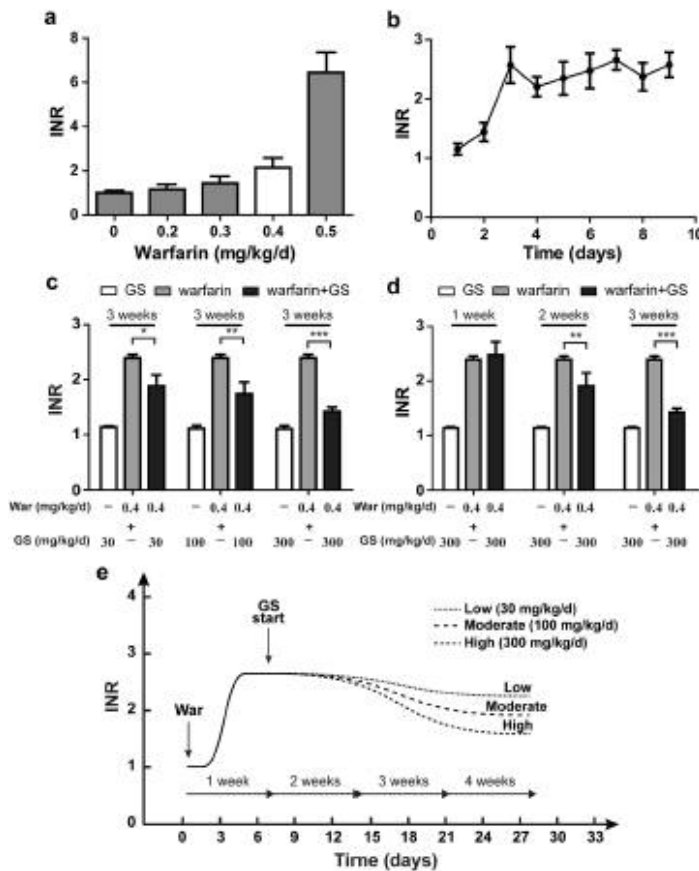
Pharmacokinetic parameters of warfarin and 7-OH warfarin in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group following oral administration of warfarin at a dose of 1 mg/kg.

Parameters		warfarin		
		control	SA	1WRA
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	10.54±4.82	8.19±1.49	8.64±1.00
T_{max}	h	1.30±0.48	1.00±0.00	1.33±0.52
AUC_{72h}	$\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	148.43±62.41	161.55±64.67	151.77±61.33
AUC_{∞}	$\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	157.19±83.07	178.91±105.21	164.48±76.86
$t_{1/2}$	h	19.57±10.92	20.79±12.12	17.14±6.76
$X_{e,72h}$	% of dose	14.98±4.90	14.47±5.99	14.32±3.56

Parameters		7OH-warfarin		
		control	SA	1WRA
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	0.17±0.03	0.12±0.03	0.14±0.06
T_{max}	h	7.50±1.41	8.00±0.00	8.00±0.00
AUC_{72h}	$\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	4.50±1.08	3.91±0.23	4.26±1.43
AUC_{∞}	$\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	4.74±1.57	4.01±0.45	4.61±1.58
$t_{1/2}$	h	19.42±8.93	14.94±4.98	18.13±7.06
Metabolic ratio		0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
$X_{e,72h}$	% of dose	16.16±3.68	12.91±3.50	11.24±4.31

(3) 홍삼-와파린의 약력학적 상호작용

- 고용량의 ginsenoside 추출물과 warfarin을 반복투여하면 warfarin의 항응고작용이 유의적으로 감소하고, INR이 증가함 (Global deregulation of ginseng products may be a safety hazard to warfarin takers: solid evidence of ginseng-warfarin interaction, H. Dong et al., Scientific report, 2017에서 발췌)
- 홍삼추출물 반복투여시 INR의 변화가 있는지 확인할 필요성 있음



Dose-dependent and time-dependent anti-coagulation of warfarin administered alone or with ginsenoside extract (GS) to rats. (a) Dose-dependent anti-coagulation of warfarin on rat INR that was measured following 7 consecutive administration of oral warfarin, and the dose 0.4 mg/kg/day was determined as the optimal dose, and used to monitor the dynamic change in INR in rats (b). (c) Changes in INR by three weeks of warfarin (0.4 mg/kg/day), or GS (30, 100 and 300 mg/kg/day), or warfarin combined with GS. Note, GS antagonized the effect of warfarin dose-dependently. (d) Time-dependent antagonism by GS against warfarin anti-coagulation was more significant by 3-weeks GS than by 1-week GS. (e) Dynamic change in rat INR by warfarin followed by three doses of GS.

2-10. 홍삼-고혈압치료제 상호작용

(1) 3제 복합제 상호작용 평가

(가) 3제 복합제

- Amlodipine (angioselective calcium channel blocker), Fimasartan (non-peptide angiotensin II receptor antagonist (ARB)), Hydrochlorothiazide (diuretics)의 3제 복합제 고혈압치료제와 홍삼과의 약동학적 약물상호작용을 평가함.
- Amlodipine은 고혈압, 만성 불안정 협심증 등에 사용되는 칼슘 채널 길항제 활성을 가진 dihydropyridine 유도체이다.
- Hydrochlorothiazide는 thiazide계 이뇨제로 신장에 작용하여 말단 세뇨관에서 Na⁺ 재흡수를 줄임으로써 혈액량을 줄이며 고혈압, 울혈성 심부전, 부종, 요붕증 등의 치료에 자주 사용된다. 또한 소변에 칼슘 농도가 높은 사람들의 신장 결석 예방에 사용된다.
- Fimasartan은 세계 8 번째 ARB 신약으로 단점으로 지적되었던 이전의 ARBs의 느린 작용 효과와는 달리 빠른 효과를 나타낸다. 또한, fimasartan은 24 시간 동안의 혈압을 낮추는데 장기간 유익한 효과가 있다.
- 최근 빈용처방되는 고혈압 3제 복합제 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 상기 3제 복합제는 국내 개발신약인 fimasartan과 빈용처방되는 이뇨제와 칼슘길항제의 3제 복합제로 개발되고 있다.

(나) 혈장 시료 중 amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 분석

- LC-MS/MS 분석조건

• LC Conditions

Instrument	Agilent Infinity 1260
Analytical column	Synergi Ploar-RP (4 μm, 2.0 mm x 150 mm, Phenomenex)
Mobile phase	isocratic elution of (A) 0.1% formic acid in DW and (B) 0.1% formic acid in methanol A : B = 30 : 70
Flow rate	0.15 mL/min
Column oven temperature	30 °C
Auto sampler temperature	10 °C
Injection volume	15 μL
Run time	5.0 min

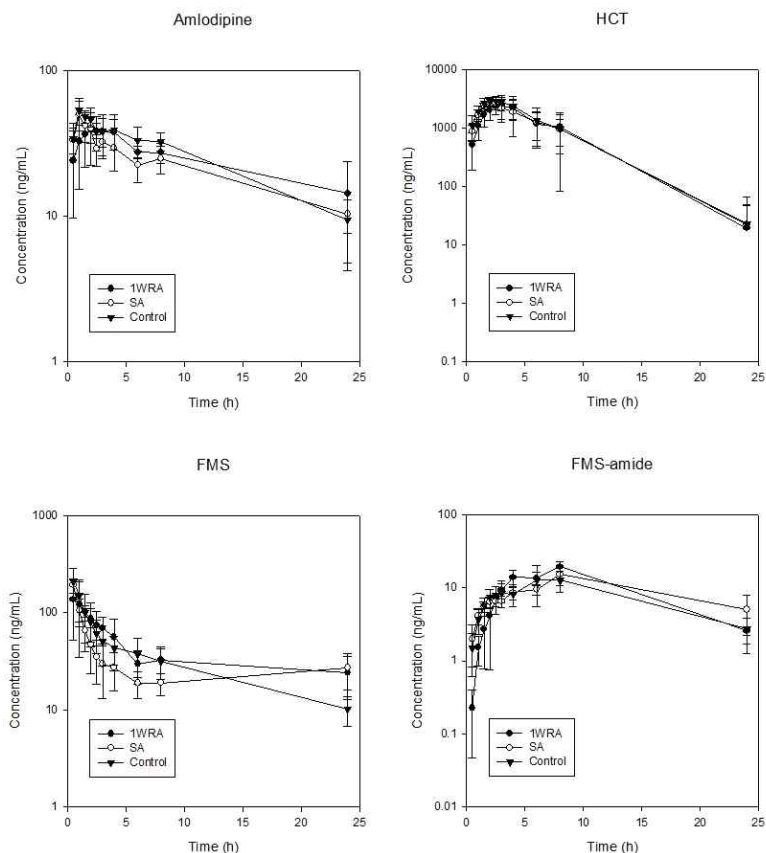
• MS/MS Conditions

Instrument	Agilent 6430 Triple Quadrupole MS			
Ionization	Electrospray ionization with positive ion mode			
Gas temperature	300°C			
Gas flow	10 L/min			
Nebulizer	35 psi			
Capillary	4000 V			
Quantification	Multiple reaction monitoring (MRM) mode			
	Compound	Mass transition (<i>m/z</i>)	Retention time (min)	Collision energy (eV)
	Fimasartan	502.2 → 206.8	3.17	125
	Fimasartan-amide	486.3 → 441.2	2.68	135
	Amlodipine	409.2 → 238	3.27	105
	Hydrochloro-thiazide	296 → 205	2.17	125
IS	336.1 → 320	4.6	135	

(다) 홍삼-amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제의 약동학적 상호작용

- Amlodipine (angioselective calcium channel blocker), Fimasartan (non-peptide angiotensin II receptor antagonist (ARB)), Hydrochlorothiazide (diuretics)를 홍삼과 병용투여하였을 세 약물 모두 유의적인 혈중 농도의 변화가 없다.
- 다만, 홍삼을 1주간 반복투여하였을 경우 Amlodipine의 Tmax가 유의적으로 증가하였다.

① 3제 고혈압 복합제의 혈중농도



Plasma concentration-time profile of amlodipine, hydrochlorothiazide (HCT), fimasartan (FMS), and its metabolite fimasartan-amide (FMS-amide) in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group following oral administration of amlodipine, hydrochlorothiazide, and fimasartan at doses of 5, 3, 5 mg/kg, respectively.

② 3제 고혈압 복합제의 약동학 파라미터

Parameters		Amlodipine			ANOVA
		control	SA	1WRA	
C_{max}	ng/mL	54.38±8.96	49.97±11.39	48.50±10.49	
T_{max}	h	1.10±0.22	1.00±0.00	2.67±1.21	<0.05
AUC_{24h}	ng·h/mL	630.55±108.20	515.41±95.77	557.31±74.55	
AUC_{∞}	ng·h/mL	795.60±218.36	788.48±247.19	774.81±82.12	
$t_{1/2}$	h	10.22±5.09	12.44±1.96	13.46±2.91	

Parameters		Hydrochlorothiazide		
		control	SA	1WRA
C _{max}	ng/mL	3309.81±433.44	3071.58±583.13	2668.91±861.19
T _{max}	h	2.60±0.96	2.30±0.97	3.42±0.66
AUC _{24h}	ng·h/mL	22899.80±11408.51	20902.80±7964.30	20909.14±9921.61
AUC _∞	ng·h/mL	23052.12±11425.94	21007.68±8060.86	21005.63±10016.71
t _{1/2}	h	2.65±1.29	2.77±0.64	2.71±0.65

Parameters		Fimasartan		
		control	SA	1WRA
C _{max}	ng/mL	210.13±75.57	190.08±32.42	147.18±72.30
T _{max}	h	0.50±0.00	0.50±0.00	1.25±1.41
AUC _{24h}	ng·h/mL	840.99±258.94	643.29±122.03	903.47±299.94
AUC _∞	ng·h/mL	999.92±268.98	1245.31±334.56	1284.59±314.37
t _{1/2}	h	10.68±3.33	21.63±4.77	22.06±16.68

Parameters		Fimasartan-amide		
		control	SA	1WRA
C _{max}	ng/mL	15.80±4.82	15.32±4.71	19.93±2.81
T _{max}	h	7.20±1.10	8.00±0.00	7.33±1.63
AUC _{24h}	ng·h/mL	193.35±52.76	227.25±50.88	257.85±30.25
t _{1/2}	h	8.69±0.71	9.98±1.60	8.49±0.82
Metabolic ratio		0.24±0.10	0.37±0.12	0.31±0.11

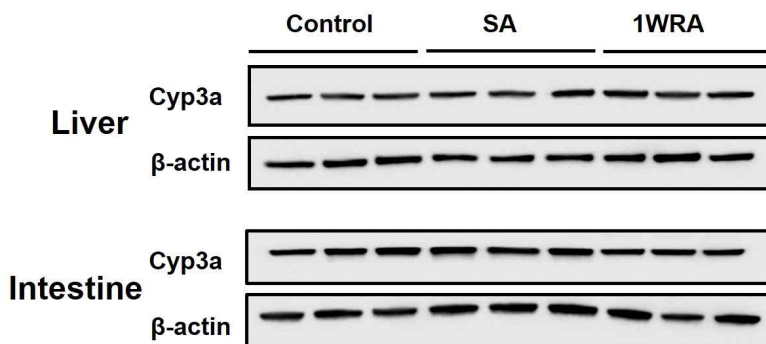
(2) 홍삼-니페디핀 상호작용

(가) 니페디핀

- 칼슘채널차단제로 고혈압치료제로 사용되며, 협심증 통증예방에도 처방하는 약물임. 칼슘이온이 나트륨채널로 유입되는 것을 저해하고 탈분극과 혈관 평활근의 선택적 전위 민감성 부위로의 유입을 저해하여 혈관 평활근 이완과 관상동맥 혈관확장을 일으킴. 말초혈관 저항의 감소로 혈압을 강하시키고 심근으로 산소운반을 증가시킴.

(나) Cyp3a의 발현 변화

- Nifedipine의 흡수 및 혈중농도에는 Cyp3a 대사효소가 중요한 역할을 하는 것으로 알려짐. Cyp3a는 위장관과 간에 다량 존재하므로 홍삼 반복투여 후 위장관과 간 조직에서 Cyp3a 발현의 변화를 측정함.
- 간에서의 Cyp3a 발현의 유의적인 변화가 없었으며, 위장관에서는 20%정도 발현이 감소하였음



(다) 혈장 시료 중 nifedipine 및 대사체 분석

- 홍삼반복투여에 의한 위장관에서의 Cyp3a의 발현저하 및 이에대한 약동학적 상호작용을 평가하고자 Cyp3a의 기질약물인 nifedipine 0.5 mg/kg를 경구투여한 후 24시간동안 nifedipine 및 대사체의 혈중 농도와 요배설과 담즙배설을 함께 평가하였다.

- LC-MS/MS 분석조건

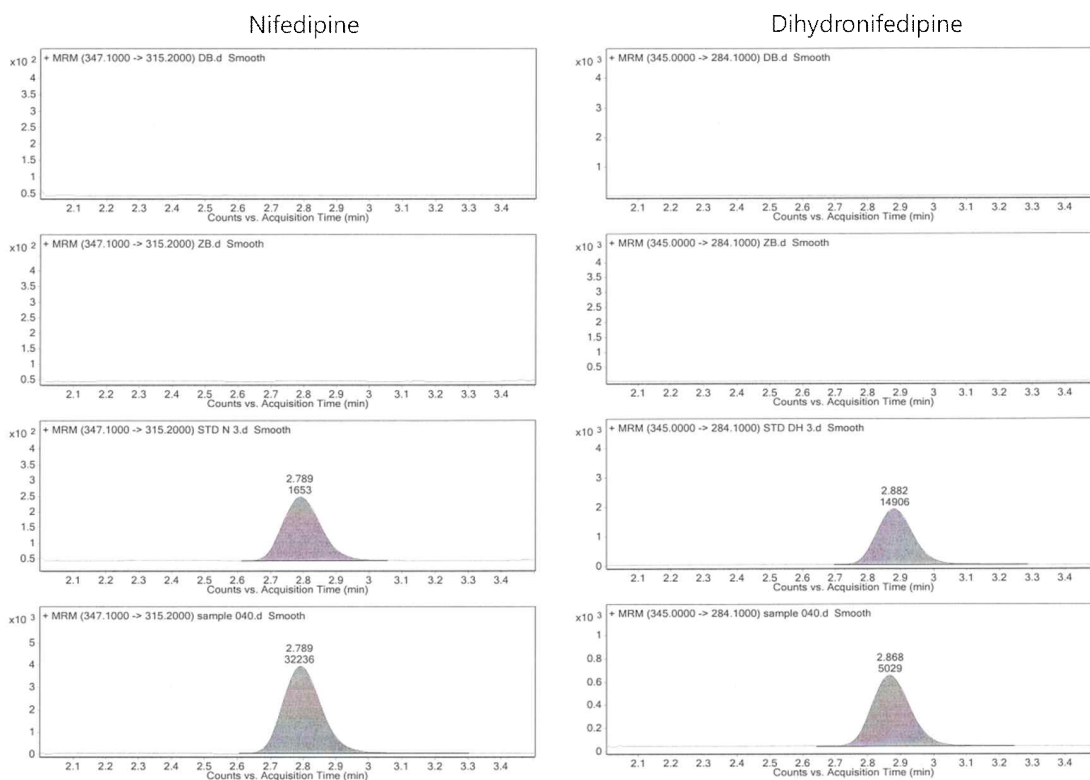
• LC Conditions

Instrument	Agilent Infinity 1290
Analytical column	Synergi Polar RP (4 mm, 2.0 mm i.d. x 150 mm, Phenomenex)
Mobile phase	Isocratic elution of (A) 0.1% formic acid in DW and (B) 0.1% formic acid in acetonitrile A : B = 23 : 77
Flow rate	0.2 mL/min
Column oven temperature	30 °C
Auto sampler temperature	10 °C
Injection volume	5 µL
Run time	3.2 min

• MS/MS Conditions

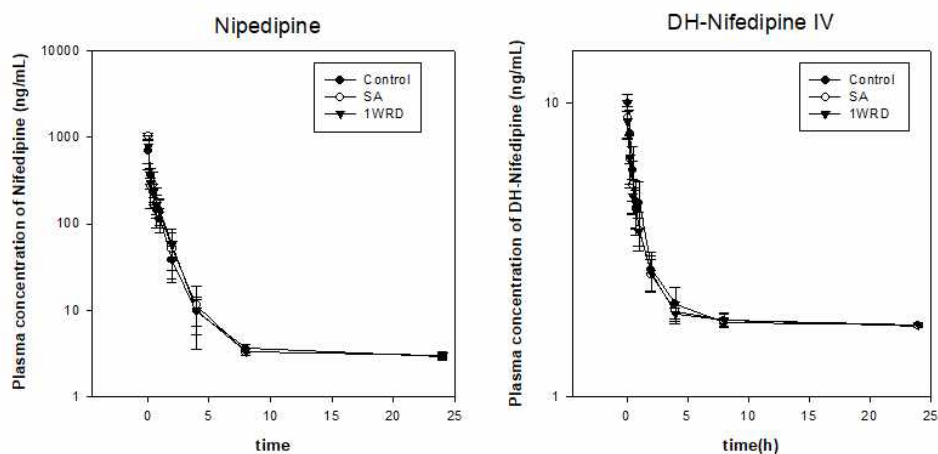
Instrument	Agilent 6430 Triple Quadrupole MS			
Ionization	Electrospray ionization with positive ion mode			
Gas temperature	300 °C			
Gas flow	10 L/min			
Nebulizer	35 psi			
Capillary	4000 V			
Quantification	Multiple reaction monitoring (MRM) mode			
	Compound	Mass transition (<i>m/z</i>)	Retention time (min)	Collision energy (V)
	Nifedipine	347.1→315.2	2.8	5
	Dihydro-nifedipine	345.0→284.1	2.9	25
	13-Caffeine (IS)	198.0→140.0	2.4	20

- 분석 크로마토그램 (혈장/urine)



(라) 정맥투여후 Nifedipine 및 대사체의 혈중 농도 변화

- Nifedipine 0.1 mg/kg용량으로 정맥주사한 뒤 혈중 Nifedipine 및 대사체 (DH-nifedipine)의 농도는 홍삼투여군과 대조군간의 유의적인 차이가 없었다. 혈중 농도로부터 산출한 약동학 파라미터도 대조군과 홍삼의 단회 및 반복투여군간의 유의적인 차이가 없었다.



Plasma concentration-time profile of nifedipine and dehydronifedipine in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

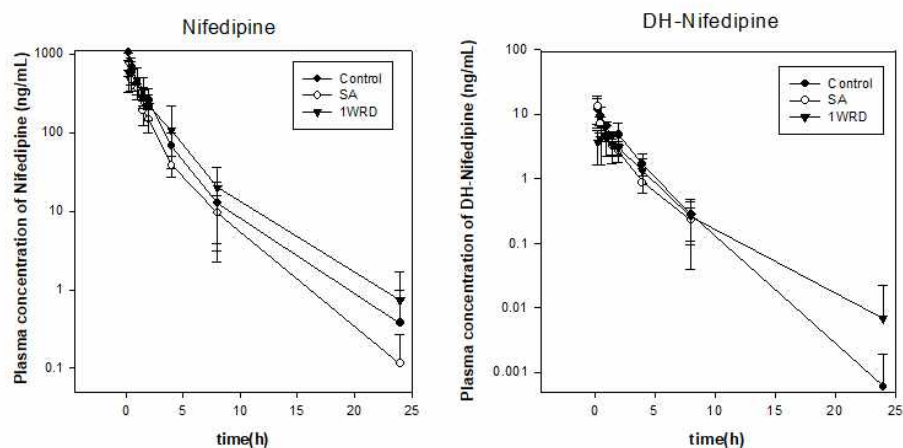
Pharmacokinetic parameters of nifedipine and dehydronifedipine in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Parameter	Nifedipine		
	Control (n=4)	SA(n=4)	1WRD(n=4)
C_0 (ng/mL)	954.79±484.19	1953.56±341.10*	1238.85±574.13
$T_{1/2}$ (h)	3.59±0.17	3.83±0.38	2.45±1.48
AUC_{0-t} (ng/mL·h)	512.18±51.73	628.60±178.16	546.61±134.22
$AUC_{0-\infty}$ (ng/mL·h)	527.60±51.07	645.27±177.89	557.65±133.26
MRT_{last} (h)	2.45±0.35	2.11±0.09	1.74±0.77
CL (mL/h/kg)	393.75±43.08	336.12±85.31	381.24±84.04
V_d (mL/kg)	972.26±236.09	714.00±205.97	678.26±368.13

Parameter	DH-Nifedipine		
	Control (n=4)	SA(n=4)	1WRD(n=4)
C_{max} (ng/mL)	11.32±0.71	10.31±2.06	9.95±1.13
$T_{1/2}$ (h)	14.88±4.53	67.46±55.73	54.37±88.70
C_{max} (ng/mL)	50.93±3.30	49.57±2.38	35.00±16.48
AUC_{0-t} (ng/mL·h)	88.47±8.78	219.75±142.54	173.44±236.88
MRT_{last} (h)	10.17±0.45	10.43±0.37	6.81±4.27
Metabolic ratio	0.10±0.01	0.08±0.02	0.07±0.04

(마) 경구투여후 Nifedipine 및 대사체의 혈중 농도 변화

- Nifedipine 0.5 mg/kg용량으로 경구투여한 뒤 혈중 Nifedipine 및 대사체 dehydronifedipine의 농도는 홍삼 반복투여군에서 대조군에 비해 Tmax가 증가하고 metabolic ratio가 감소하였다. 정맥주사군의 결과와 함께 고려하면 위장관에서의 Cyp3a의 발현이 감소하여 위장관내 대사가 감소하여 대사체의 비율이 감소한 것으로 유추할 수 있다.



Plasma concentration-time profile of nifedipine and dehydronifedipine in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Pharmacokinetic parameters of nifedipine and dehydronifedipine in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Parameter	Nifedipine		
	Control (n=5)	SA(n=5)	1WRD(n=5)
T1/2 (h)	1.87±1.03	1.99±0.87	2.09±0.87
Tmax(h)	0.25±0.00	0.25±0.00	0.80±0.74
Cmax(ng/mL)	1055.22±432.71	768.12±244.49	633.64±218.95
AUC0-t(ng/mL*h)	1499.38±443.01	1022.24±149.18	1716.25±612.10
AUC0-∞(ng/mL*h)	1507.54±443.21	1025.72±148.85	1725.23±609.62
MRTlast(h)	1.83±0.54	1.92±0.51	2.43±0.97
BA	117.1	65.0	125.6

Parameter	DH-Nifedipine		
	Control (n=5)	SA(n=5)	1WRD(n=5)
T1/2 (h)	1.48±0.37	1.66±0.42	1.84±0.94
Tmax(h)	0.60±0.78	0.25±0.00	1.00±0.61*
Cmax(ng/mL)	11.96±5.26	13.28±6.22	5.65±2.13
AUC0-t(ng/mL*h)	23.59±8.15	16.19±3.94	15.88±5.39
AUC0-∞(ng/mL*h)	24.24±8.42	16.79±3.76	16.29±5.30
MRTlast(h)	1.90±0.20	1.72±0.32	2.50±0.96
Metabolic ratio	0.02±0.004	0.02±0.004	0.01±0.002*

*p<0.05 compared with control group.

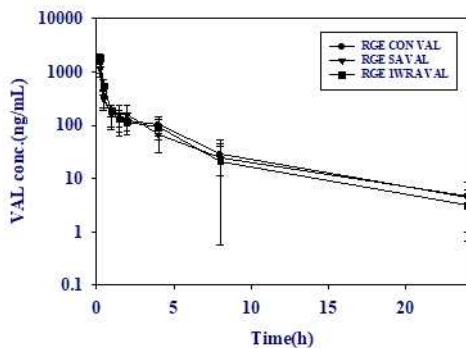
(3) 홍삼-Valsartan 상호작용 평가

(가) Valsartan

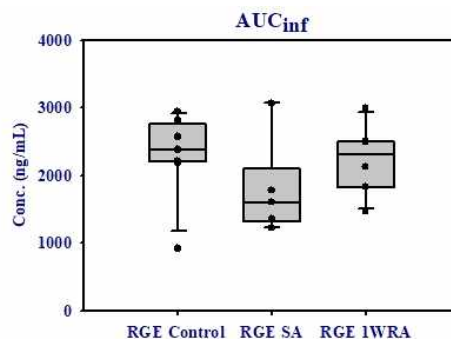
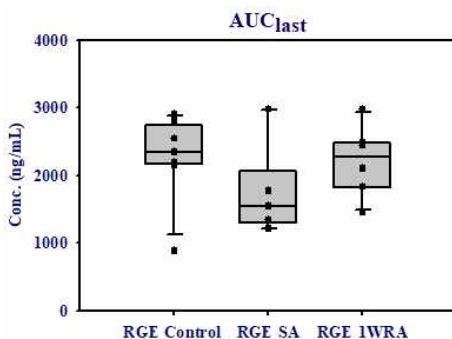
- Angiotensin II Receptor Blocker (안지오텐신 II 수용체 차단제) 로써 우리 몸에서 혈압을 올리는 기전인 RAA system(Renin-Angiotensin Aldosterone system)에서 angiotensin II라는 물질과 반응하는 receptor(수용체)를 길항하여 혈압상승을 막는 혈압강하제이다. 즉, 안지오텐신 II가 AT1 수용체에 결합하는 것을 막아서 혈압하강 효과를 얻는데 Angiotensin II Receptor 효소를 건드리지 않으므로 기침 부작용이 나타나지 않으며, 다소간의 심혈관 보호 효과를 나타내기 때문에 주로 쓰인다. 초기 고혈압 환자들의 경우에 쓰기 좋은 약이다.

(나) 홍삼에 의한 valsartan의 약동학적 상호작용

- 홍삼반복투여에 의한 valsartan의 약동학적 상호작용을 평가하고자 valsartan 0.2 mg/kg를 정맥주사한 후 24시간동안 혈중 농도를 평가하였다.
- 그림에서 보는 바와 같이 valsartan의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이가 없었다.
- 이로부터 구한 약동학 파라미터인 AUC도 세 그룹간 유의적인 차이가 없었다.



Plasma concentration vs time profile of valsartan in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group



Box plots of pharmacokinetic parameters of valsartan control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Pharmacokinetic parameters of valsartan in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Valsartan	RGE CON n=7	RGE SA n=5	RGE 1WRA n=6	K-W test
AUClast (ng/mL)*h	2258±674	1767±708	2213±538	0.355
AUCinf (ng/mL)*h	2289±667	1803±737	2232±540	0.402

(4) 홍삼-Furosemide 상호작용

(가) Furosemide

- 라식스로 널리 알려진 푸로세미드는 대표적인 루프계 이뇨제다. 루프계 이뇨제는 신장 세뇨관의 헨레 루프의 상행각에 위치한 Na-K-Cl cotransporter의 chloride 수송채널에 결합하여 cotransporter를 억제함으로써 나트륨과 염소 그리고 포타슘 등을 오줌으로 배설하며 이뇨작용을 나타낸다.[5] 푸로세미드는 이뇨제 가운데서 이뇨 작용이 가장 뛰어나 투여 시 체액 감소에 의한 일시적 체중 감소가 두드러진다. 고혈압(본태성, 신성 등), 심성부종(울혈성심부전), 신성부종, 간성부종(복수), 말초혈관성부종 등의 치료로 심혈관계 질환에서 널리 쓰인다.
- 푸로세미드는 위장관에서 47-70% 흡수되어 전신 순환혈로 이동되며, 약 10% 정도가 대사되고 대부분은 미변화체로 신배설된다. 신배설과정에서 유기음이온 수송체인 Oat1, Oat3가 관여하여 능동배설시키는 것으로 보고되었다.

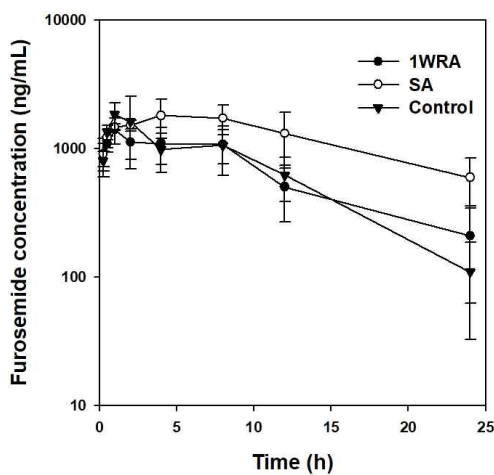
(나) 홍삼에 의한 Furosemide의 약동학적 상호작용

① Furosemide 경구 투여

- 홍삼반복투여에 의한 푸로세미드의 약동학적 상호작용을 평가하고자 푸로세미드 10 mg/kg를 경구투여한 후 24시간동안 혈중 농도를 평가하였다.
- 홍삼 단회 투여는 대조군이나 반복투여에 비해, 푸로세미드의 Cmax와 반감기, 그리고 MRT에는 통계적으로 유의한 변화를 주지 못하였다. 그러나 Tmax와 AUC를 증가시켰다.
- 통계적으로 유의한 변화가 없는 약동학적 파라미터인 Cmax와 반감기, 그리고 MRT는 약물 소실과 관련되어있다. 반면, 통계적으로 유의한 변화를 보이는 약동학적 파라미터인 Tmax와 AUC는 약물 흡수와 관련되어있다. 즉, 홍삼이

위장관에 머물러있는 동안 푸로세미드 흡수시간과 흡수율을 증가시켜 Tmax와 AUC가 증가한 것으로 해석된다.

- 반면 대조군과 홍삼 반복 투여군 사이는, 대조군과 홍삼 단회 투여군 사이에 비해, 푸로세미드의 약동학적 파라미터에 통계적으로 유의한 변화를 주지 못하였다. 이는 홍삼을 1주일동안 반복투여하고 마지막 투여 24시간 후 푸로세미드를 투약하였을 경우에는 체내에서 흡수된 홍삼은 푸로세미드 흡수에 영향을 주지 않는 것으로 보인다.



Plasma concentration vs time profile of furosemide following oral administration of furosemide 10 mg/kg in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

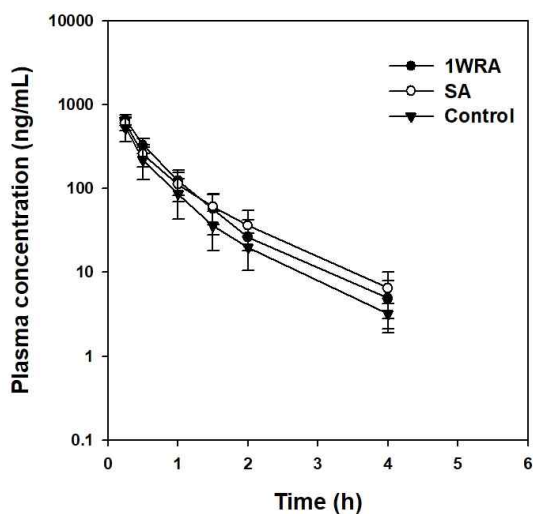
Pharmacokinetic parameters of furosemide following oral administration of furosemide 10 mg/kg in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Parameters	Control	SA	1WRA
	mean±SD	mean±SD	mean±SD
t1/2 (h)	7.89±3.69	9.58±4.17	5.01±1.67
Tmax(h)	1.05±0.62	8.80±3.35 *	1.60±0.55
MRTlast(h)	8.08±1.24	9.61±1.24	7.36±0.85
Cmax(ng/ml)	1464.29±294.60	2027.53±493.98	2032.95±597.61
AUClast (ng*h/mL)	16950.43±4091.67	30113.52±5170.74 *	17289.67±4494.88
AUCinf (ng*h/mL)	19804.04±5401.53	34155.00±1468.84 *	18207.27±4408.35

* p<0.05 compared to the control and 1WRA groups

② Furosemide 정맥주사

- 홍삼반복투여에 의한 푸로세미드의 약동학적 상호작용을 평가하고자 푸로세미드 0.2 mg/kg를 경구투여한 후 24시간동안 혈중 농도를 평가하였다.
- 그림에서 보는 바와 같이 푸로세미드의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이가 없었다.
- 이로부터 구한 약동학 파라미터인 Co, 반감기, AUC는 세 그룹간 유의적인 차이가 없었다.



Plasma concentration vs time profile of furosemide following intravenous injection of furosemide 2 mg/kg in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Pharmacokinetic parameters of furosemide following intravenous injection of furosemide 2 mg/kg in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Parameters	Control mean±SD	SA mean±SD	1WRA mean±SD
t1/2 (h)	0.73±0.23	1.30±1.02	0.72±0.07
MRTlast(h)	0.47±0.14	0.64±0.12	0.53±0.15
C0 (ng/ml)	1370.31±489.89	1420.31±228.79	1359.25±383.83
AUClast (ng*h/mL)	469.97±139.25	571.31±124.70	583.96±94.90
AUCinf (ng*h/mL)	475.44±139.85	576.26±123.36	589.17±97.37

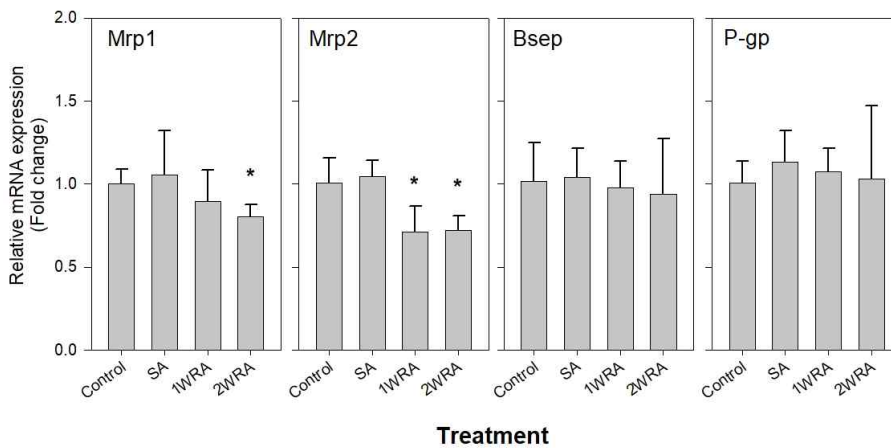
2-11. 홍삼-메토트렉세이트 상호작용

(1) 메토트렉세이트

- 메토트렉세이트는 Dihydrofolate Reductase 저해제로서 Tetrahydrofolate의 합성을 억제하여 DNA 복제를 억제하고, 세포의 증식을 저해하는 항종양제로 주로 백혈병 치료에 사용된다.
- 또한 소용량 복용시 면역억제제로써 purine 대사 효소의 억제, adenosine의 축적, 그리고 T cell의 활동을 억제하게 되어서 과잉의 자가 면역반응을 억제하게 된다. 또한 interleukin 1 이 target cell의 receptor에 접근하는것도 방해하여, 염증 반응을 억제하여 류마티스관절염 등 자가면역질환 치료제로 사용되고 있다.

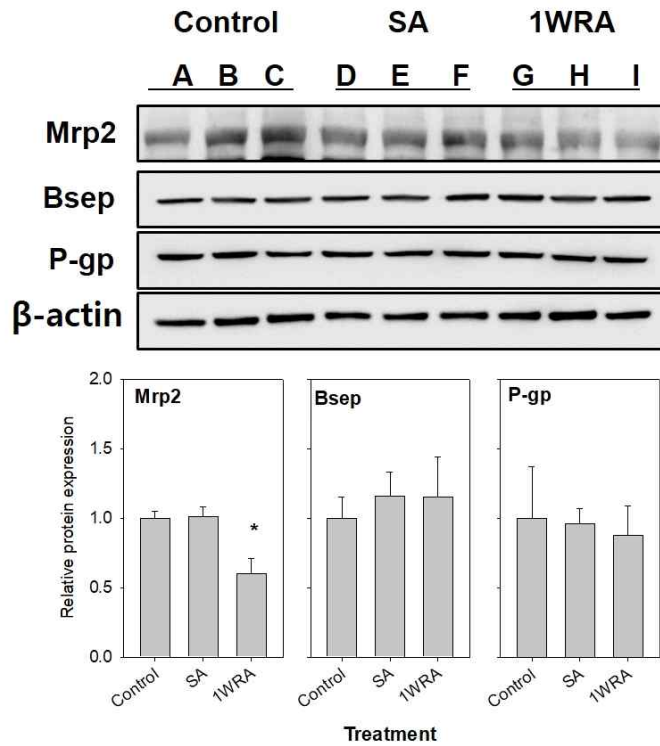
(2) 메토트렉세이트의 주요 수송체인 Mrp2의 발현 변화

- 메토트렉세이트의 혈중 및 조직내 농도를 조절하는 주요 수송체인 Mrp2의 발현이 홍삼의 반복투여시 감소하였음
- 약물의 조직 중 농도 및 혈중 농도를 감소시키는 다른 배출수송체인 Bsep과 P-gp의 발현은 변화하지 않음
- 아래 mRNA의 변화를 측정한 결과임



mRNA expression level of multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp1), Mrp2, bile salt export pump (Bsep), and P-glycoprotein (P-gp) in the liver of rats in the control, single administration (SA), and repeated administration of RGE (1.5 g/kg, PO) for 7 days (1WRA) and 14 days (2WRA) groups.

- Mrp2와 Bsep, P-gp의 단백질 발현을 측정할 경우에도 동일한 결과를 얻음



Protein expression of Mrp2 in the liver of rats in the control (lanes A, B, and C), SA (lanes D, E, and F), and 1WRA (lanes G, H, and I) groups. β -actin served as a loading control. Quantitative analysis of Western blot results is shown in the lower panel.

(3) 혈장 시료 중 methotrexate 분석

- LC-MS/MS 분석조건

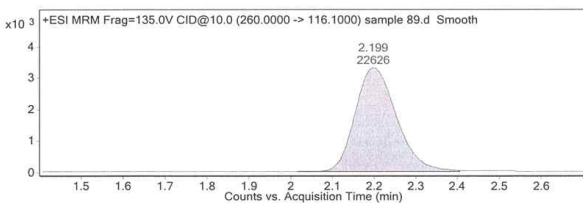
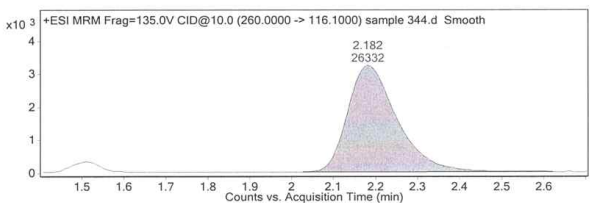
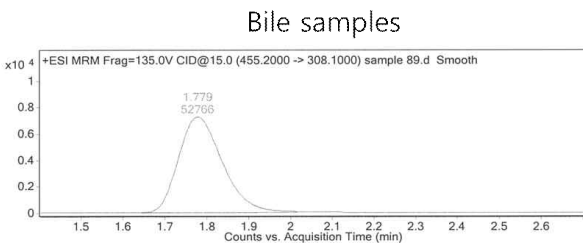
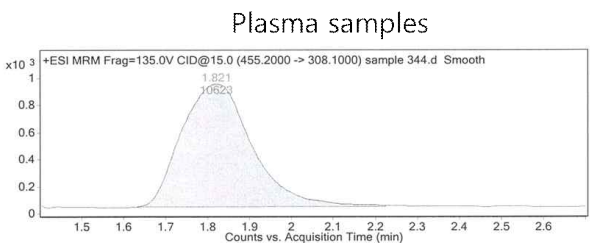
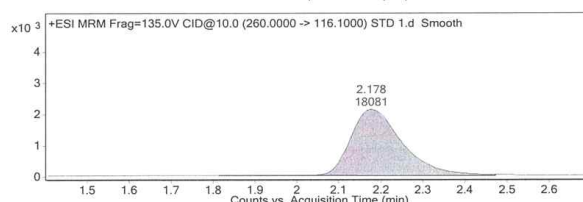
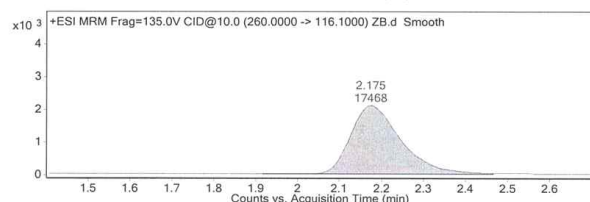
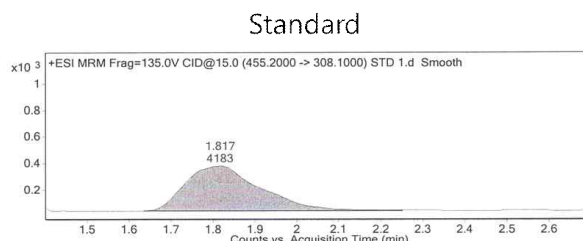
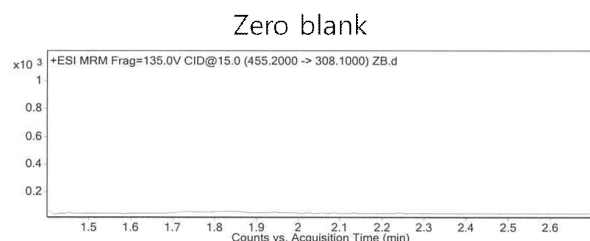
- LC Conditions

Instrument	Agilent Infinity 1290
Analytical column	Synergi Polar RP (4 mm, 2.0 mm i.d. x 150 mm, Phenomenex)
Mobile phase	Isocratic elution of (A) 0.1% formic acid in DW and (B) 0.1% formic acid in methanol A : B = 20 : 80
Flow rate	0.25 mL/min
Column oven temperature	30 °C
Auto sampler temperature	10 °C
Injection volume	1 μ L
Run time	2.7 min

- MS/MS Conditions

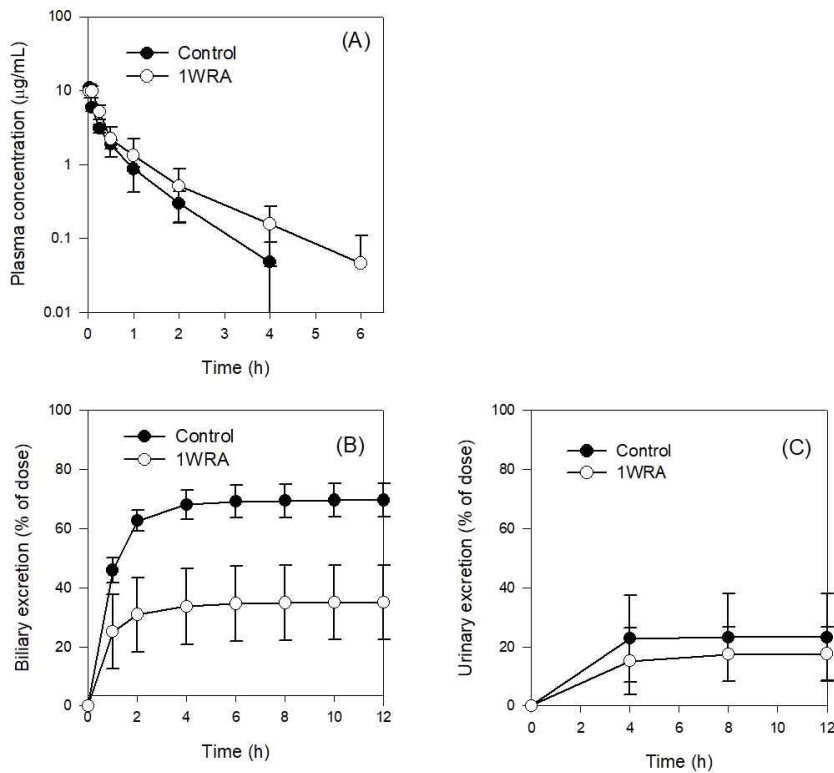
Instrument	Agilent 6430 Triple Quadrupole MS			
Ionization	Electrospray ionization with positive ion mode			
Gas temperature	300 °C			
Gas flow	10 L/min			
Nebulizer	35 psi			
Capillary	4000 V			
Quantification	Multiple reaction monitoring (MRM) mode			
	Compound	Mass transition (<i>m/z</i>)	Retention time (min)	Collision energy (V)
	methotrexate	455.2→308.1	1.8	15
	propranolol (IS)	260.0→116.1	2.2	10

- 분석 크로마토그램 (plasma/bile/urine)



(4) 홍삼과 병용투여에 의한 methotrexate의 약동학적 상호작용 평가

- 홍삼반복투여에 의한 Mrp2의 발현저하 및 이에 대한 약동학적 상호작용을 평가하고자 Mrp2의 기질약물인 methotrexate 3 mg/kg를 정맥주사한 후 12시간동안 혈중 농도와 요배설과 담즙배설을 함께 평가하였다.
- 그림에서 보는 바와 같이 methotrexate의 혈중 농도는 대조군에 비하여 1주 반복투여군에서 소실속도가 감소하여 혈중 농도가 증가하는 경향을 보였다.
- 메토틀렉세이트는 Mrp2를 통하여 담즙과 요로 배설되는 기전을 보이고 있으므로 Mrp2의 발현이 감소한 것과 동일하게 담즙으로의 배설이 유의적으로 감소하였고, 요배설도 감소하였다.
- 이상의 결과를 종합하면 단회 methotrexate를 투여할 경우에는 혈중농도의 변화가 유의적이지 않지만, 반복투여할 경우 methotrexate의 소실이 감소하여 체내에 축적되므로 혈중농도가 유의적으로 증가할 수 있고, 이에 따라 약효의 변화를 유도할 수 있으므로 주의가 필요할 것이다.



(A) Plasma concentration-time profile, (B) biliary excretion, and (C) urinary excretion of methotrexate following intravenous injection of methotrexate at a dose of 3 mg/kg in rats from the control and 1WRA groups of RGE (1.5 g/kg, PO).

Pharmacokinetic parameters of methotrexate following intravenous injection of methotrexate at a dose of 3 mg/kg

Parameters		Groups	
		Control (n=4)	1WRA (n=6)
C ₀	µg/mL	15.6±2.6	9.7±1.7 *
AUC _{6h}	µg · min/mL	3.8±0.2	5.6±2.2*
AUC _∞	µg · min/mL	3.8±0.2	5.7±2.3*
t _{1/2}	h	0.7±0.2	0.9±0.2 *
MRT	h	0.7±0.2	0.9±0.3
V _d	mL/kg	518.1±119.0	477.2±109.3
CL _{total}	mL/min/kg	13.1±0.7	9.8±3.1 *
CL _{bile}	mL/min/kg	9.2±1.0	4.3±2.4 *
CL _{urine}	mL/min/kg	2.3±1.5	1.8±1.1

2-12. 백삼-selegiline 상호작용

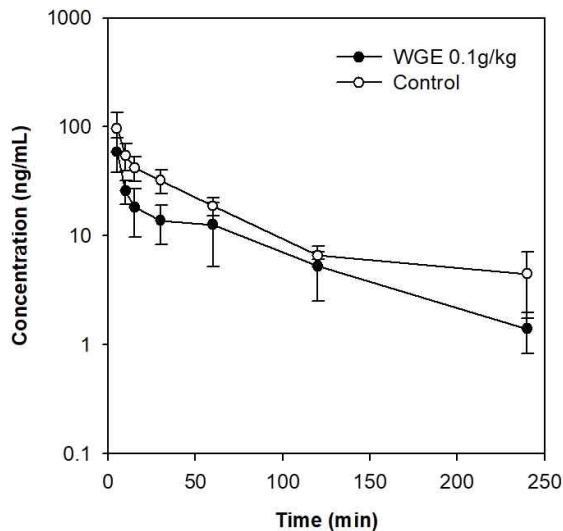
(1) Selegiline

- Selegiline은 비가역적 monoamine oxidase (MOA) B 저해제로 고용량사용시 MOA-A도 저해한다. 초기 파킨슨씨병과 우울증 치료에 사용한다.

(2) 백삼에 의한 selegiline의 약동학적 상호작용

- 백삼 0.1g/kg 용량으로 4주간 반복투여한 군에서 selegiline 20 mg/kg를 경구투여한 군에서의 혈중농도는 대조군에서의 혈중농도에 비하여 감소하였으며, 반감기와 Tmax의 변화 없이 Cmax와 AUC가 감소하였다. 이상의 변화는 백삼의 반복투여군에서 selegiline의 흡수량이 감소되었기 때문으로 사료된다.

Parameters	Selegiline	
	Control	WGE 0.1g/kg for 4 weeks
Cmax (ng/mL)	96.9 ± 21.8	58.7 ± 11.7
Tmax (min)	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
AUC (µg·min/mL)	4.07 ± 0.15	2.17 ± 0.41
Half-life (min)	63.5 ± 11.1	60.9 ± 9.9
MRT (min)	56.1 ± 13.0	56.7 ± 7.7



Data are expressed as mean ± SD from 3 rats per group

2-13. 홍삼-NSAID계 진통제 상호작용

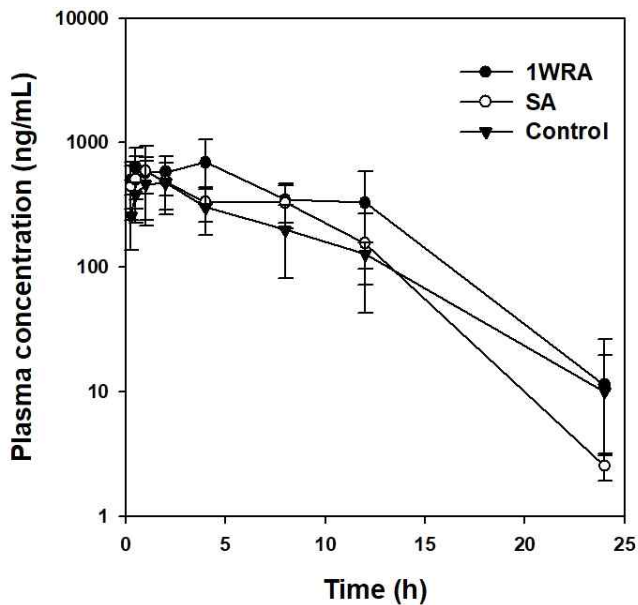
(1) 홍삼-Sulfasalazine 상호작용

(가) Sulfasalazine

- Sulfasalazine은 NSAIDs(비스테로이드성 소염진통제)에 반응이 없을 경우 사용하는 DMARDs (disease modifying anti-rheumatoid drugs) 류마티스 관절염 치료제임.
- 류마티스 외에 궤양성 대장염 등에 사용하기도 하며 약 30% 정도 위장관에서 흡수되고 남은 약물은 대장에서 장내 박테리아에 의해 sulfapyridine과 5-ASA (5-aminosalicylic acid, mesalazine)으로 분해된 뒤 sulfapyridine은 60% 정도 흡수되고 (5-ASA는 10-30%정도 흡수됨).

(나) 홍삼에 의한 sulfasalazine의 약동학적 상호작용

- 혈중 sulfasalazine 농도와 시간의 그래프에서 모든 시간에서 1주투여군이 대조군이나 단회투여군에 비해 혈중농도가 높다.
- 혈중 농도로부터 산출한 약동학 파라미터도 대조군에 비하여 반복투여군에서 유의적으로 Cmax와 AUC가 증가하였다.



Plasma concentration-time profile of sulfasalazine in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

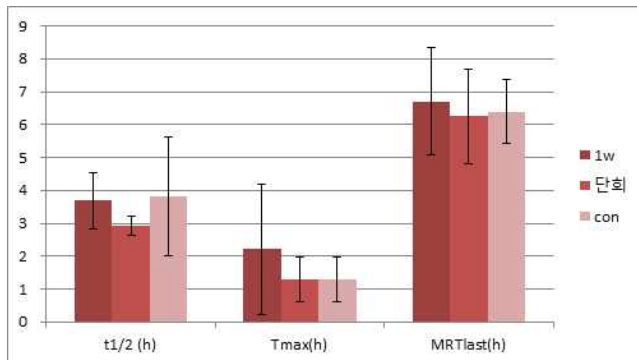
Pharmacokinetic parameters of sulfasalazine in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

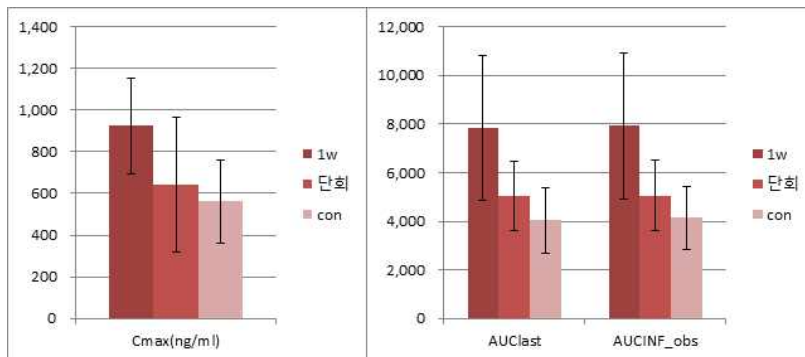
Parameters	Control	SA	1WRA
	mean±SD	mean±SD	mean±SD
t1/2 (h)	3.83±1.81	2.91±0.29	3.69±0.86
Tmax(h)	1.30±0.67	1.30±0.67	2.21±1.96
Cmax(ng/ml)	560.79±199.44	641.28±324.47	924.18±230.31
AUClast (ng*h/mL)	4046.22±1346.66	5043.37±1435.29	7846.27±2982.25*
AUCinf (ng*h/mL)	4135.33±1316.60	5054.05±1437.73	7913.85±3019.62*
MRTlast(h)	6.39±0.97	6.24±1.44	6.71±1.64

*p<0.05 compared with control group.

(다) 홍삼에 의한 sulfasalazine의 상호작용 기전

- sulfasalazine의 체내동태에 영향을 주는 Bcrp는 홍삼에 의하여 발현이 변화하지 않았으며, 반감기의 유의성이 없는 것과 일치하는 결과이다.
- Tmax와 MRT의 변화가 없이 Cmax와 AUC가 1주 반복투여군에서 유의적으로 증가하였으므로 홍삼의 반복투여군에서 흡수량이 증가하였기 때문으로 유추할 수 있다.





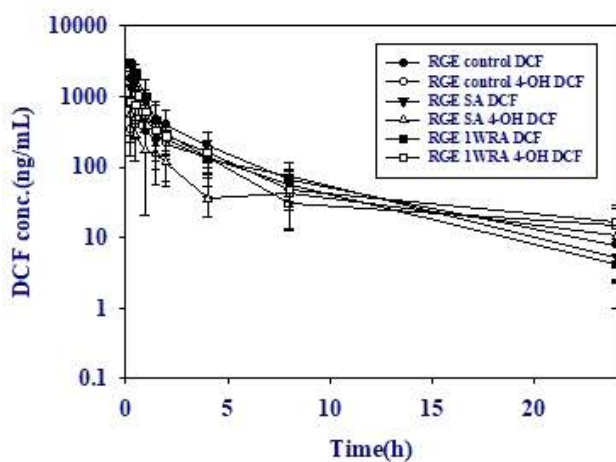
(2) 홍삼-디클로페낙 상호작용

(가) 디클로페낙

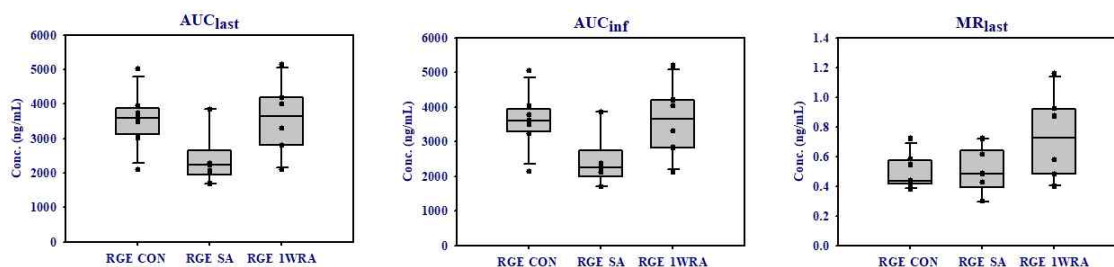
- NSAID 계열 항염증약물로 항염증, 진통, 해열 작용을 나타낸다.
- 디클로페낙은 prostaglandin 외에 고농도에서 arachidonic acid 대사체의 합성을 저해하고 leucocyte가 염증부위로 이동하는 것으로 저해하여 항염증 작용을 나타낸다. 이외에서 prostaglandin의 합성을 저해함으로써 진통, 해열 작용을 나타낸다. 이 약물은 위장관 점막에 궤양이나 출혈을 일으킬 수 있다.
- 이 약물의 위장관내 흡수는 50% 정도인데 이는 초회통과에 의해 불활성화되고 나머지 50%만 전신순환혈로 들어간다. 주로 간에서 CYP2C9에 의해 대사되고 대사체로 배설된다.

(나) 홍삼-디클로페낙의 약동학적 상호작용

- 홍삼반복투여에 의한 디클로페낙의 약동학적 상호작용을 평가하고자 디클로페낙 2 mg/kg를 경구투여한 후 24시간동안 혈중 농도를 평가하였다.
- 그림에서 보는 바와 같이 디클로페낙과 대사체인 hydroxydiclofenac의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이가 없었다.
- 이로부터 구한 약동학 파라미터인 AUC, metabolic ratio로 세 그룹간 유의적인 차이가 없었다.



Plasma concentration vs time profile of diclofenac and their metabolites 4-hydroxy diclofenac in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group



Box plots of pharmacokinetic parameters of diclofenac and their metabolites 4-hydroxy diclofenac in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Pharmacokinetic parameters of diclofenac and their metabolites 4-hydroxy diclofenac in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Diclofenac	RGE CON n=7	RGE SA n=5	RGE 1WRA n=6	K-W test
AUClast(ng/mL)*h	3552±888	2417±829	3585±1087	0.128
AUCinf(ng/mL)*h	3612±875	2453±823	3610±1088	0.128
MR	0.50±0.12	0.51±0.16	0.73±0.30	0.311

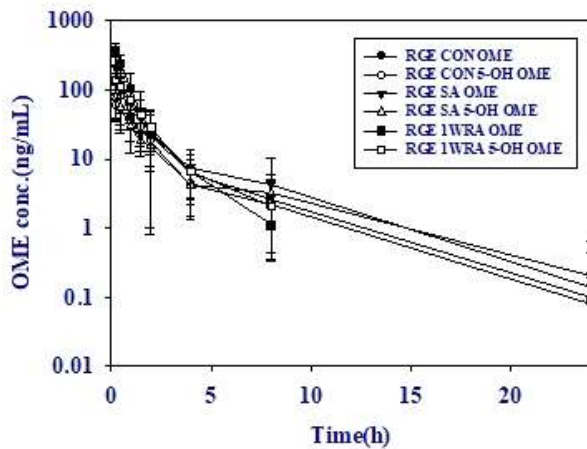
2-14. 홍삼-omeprazole 상호작용

(1) Omeprazole

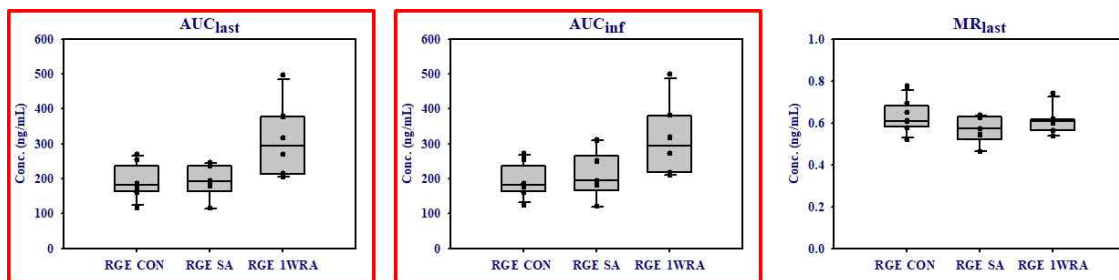
- 오메프라졸(Omeprazole)은 소화성 궤양 질환, 소화불량, 위식도 역류질환, 역류성 인후두염, Zollinger-Elison 증후군(Zollinger-Ellison syndrome)에 사용하는 약물로, 양성자 펌프 저해제(proton pump inhibitor)로 위의 벽세포에 존재하는 양성자 펌프에 비가역적으로 결합함으로써 위산이 분비되지 못하게 한다.
- 오메프라졸은 흡수가 빠르고 위장관에서의 대사에 의한 초회통과효과로 30-40% 정도가 흡수된다. 흡수된 오메프라졸은 일부 미변화체로 뇨로 배설되고 대부분은 간에서 대사되어 뇨로 배설된다. 대사에 주로 관여하는 효소는 CYP2C19이고 주요 대사체는 5-hydroxy omeprazole이다. 이외에도 hydroxy omeprazole, carboxylic acid, sulfide, sulfone 유도체로 대사되며 활성을 나타내지 않는다.

(나) 홍삼에 의한 omeprazole의 약동학적 상호작용

- 홍삼반복투여에 의한 오메프라졸의 약동학적 상호작용을 평가하고자 오메프라졸 2 mg/kg를 경구투여한 후 24시간동안 혈중 농도를 평가하였다.
- 그림에서 보는 바와 같이 오메프라졸과 대사체인 hydroxy omeprazole의 혈중 농도는 대조군 또는 단회투여군에 비하여 1주 반복투여군에서 유의적으로 증가하였으나, 증가비율은 2배 이내로 임상적으로 유의적인 차이가 없었다.
- 이로부터 구한 약동학 파라미터인 AUC는 대조군 또는 단회투여군에 비하여 1주 반복투여군에서 유의적으로 증가하였으나, 증가비율은 2배 이내로 임상적으로 유의적인 차이가 없었다. metabolic ratio는 세 그룹간 유의적인 차이가 없었다.



Plasma concentration vs time profile of omeprazole and its metabolite 5-hydroxy omeprazole in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group



Box plots of pharmacokinetic parameters of omeprazole and its metabolite 5-hydroxy omeprazole in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Pharmacokinetic parameters of omeprazole and its metabolite 5-hydroxy omeprazole in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Omeprazole	RGE CON n=7	RGE SA n=5	RGE 1WRA n=6	K-W test
AUClast(ng/mL)*h	191±53	193±52	313±111	0.036
AUCinf(ng/mL)*h	194±52	211±72	316±110	0.042
MR	0.63±0.08	0.57±0.07	0.61±0.07	0.551

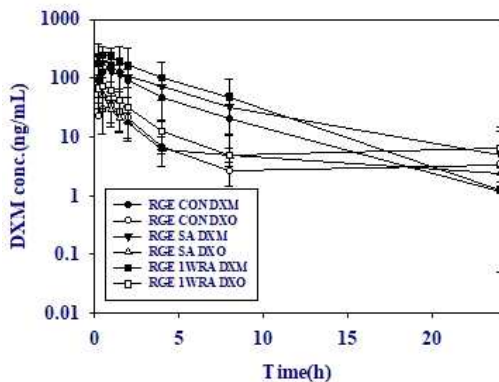
2-15. 홍삼-dextromethorphan 상호작용

(1) Dextromethorphan

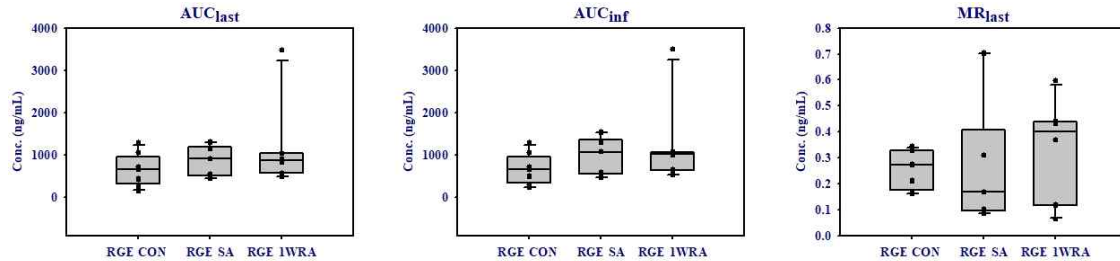
- 텍스트로메토르판은 진해거담제로 사용되며 morphine 계열 약물이다.
작용기전으로는 비선택적 세로토닌 재흡수 저해제로 작용하며 시그마 리셉터 길항제, NMDA (N-methyl-D-aspartate) 리셉터 길항제로 작용하여 연수의 기침중추를 억제한다. 한다.
- 텍스트로메토르판은 위장관에서 신속히 흡수되어 전신순환혈로 들어가고, 간의 CYP2D6에 의해 대사되어 NMDA 리셉터 길항효과가 더 높은 활성대사체인 텍스트로판으로 대사된다.

(나) 홍삼에 의한 dextromethorphan의 약동학적 상호작용

- 홍삼반복투여에 의한 텍스트로메토르판의 약동학적 상호작용을 평가하고자 텍스트로메토르판 10 mg/kg를 경구투여한 후 24시간동안 혈중 농도를 평가하였다.
- 그림에서 보는 바와 같이 텍스트로메토르판과 대사체인 텍스트로판의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이가 없었다.
- 이로부터 구한 약동학 파라미터인 AUC, metabolic ratio로 세 그룹간 유의적인 차이가 없었다.



Plasma concentration vs time profile of dextromethorphan (DXM) and its metabolite dextrorphan (DXO) in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group



Box plots of pharmacokinetic parameters of dextromethorphan (DXM) and its metabolite dextrorphan (DXO) in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Pharmacokinetic parameters of dextromethorphan (DXM) and its metabolite dextrorphan (DXO) in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Dextromethorphan	RGE CON n=7	RGE SA n=5	RGE 1WRA n=6	K-W test
AUClast(ng/mL)*h	654±406	867±372	1216±1126	0.473
AUCinf(ng/mL)*h	674±387	990±459	1295±1099	0.368
MR	0.26±0.08	0.27±0.26	0.34±0.21	0.603

2-16. 홍삼-digoxin 상호작용

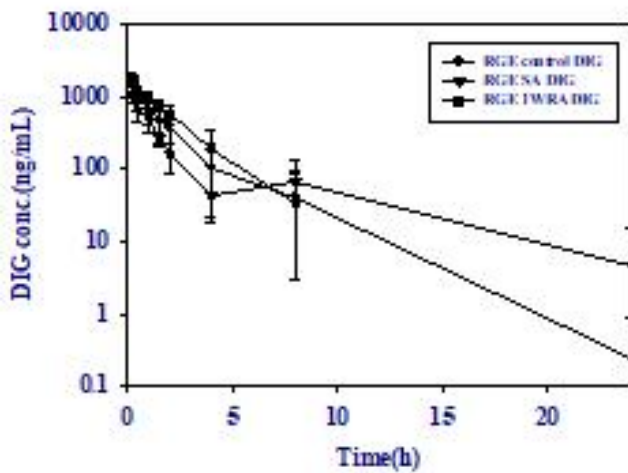
(1) Digoxin

- Digoxin은 디기탈리스 엽으로부터 추출한 배당체로서 매우 중요한 강심제이다. Digoxin은 쇠약해진 심장의 수축력을 증가시킨다. 최근의 임상시험에서는 이노제 혹은 ACE inhibitor를 투여하는 환자의 심부전 증상을 개선시킨 것으로 보고되었다. Digoxin은 특히 심방세동(atrial fibrillation)으로 인한 심부전환자에 사용한다.
- Digoxin은 membrane Na⁺/K⁺-ATPase를 차단한다. 이에 따라 세포내 Na⁺ 농도가 상승하여 2차적으로 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가하여 심근수축력이 증가한다. 세포막을 경계로 하여 Na⁺의 농도 경사가 감소하게 되면 심근 확장이 일어나는 동안에 Na⁺/Ca²⁺ exchanger에 의한 Ca²⁺의 배출이 감소하므로 세포내 Ca²⁺ 농도가 상승한다.

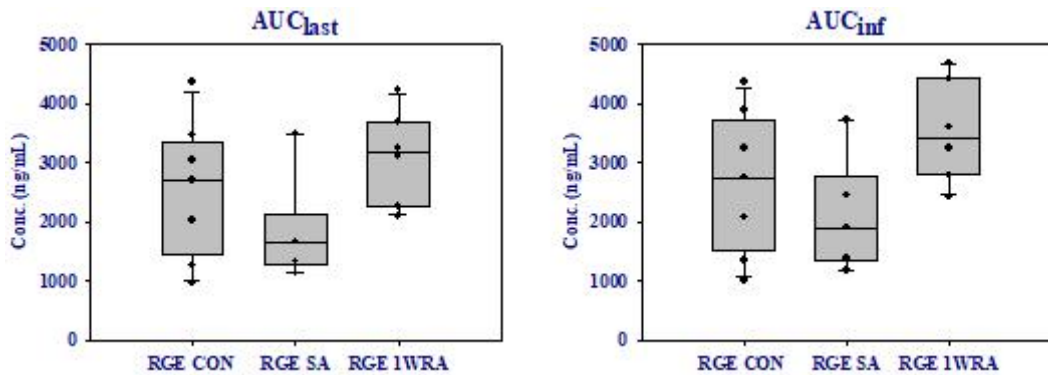
- Digoxin은 모든 흥분성 조직에 영향을 주는데, 특히 심근에서의 Na⁺ 배출속도가 다른 조직에 비해 훨씬 빠르므로 이에 따라 심장 선택성을 나타낸다. 심장 이외의 기타 장기에 대표적인 효과는 소장에 대한 효과로서 식욕감퇴(anorexia), 오심(nausea), 구토(vomiting) 또는 설사이다. 이러한 작용 중 일부는 소장 평활근에 대한 작용에서, 일부는 중추작용(vagal and chemoreceptor trigger zone stimulation)에서 오는 것으로 보인다.
- 디곡신은 위장관에서 60-85%가 흡수되어 혈중으로 전달되고 대부분 변화되지 않은 채 신장으로 배설되고 일부 장간순환을 한다. 신장의로의 배설시 P-gp을 통해 배설되는 것이 잘 알려져있다.

(2) 홍삼에 의한 Digoxin의 약동학적 상호작용

- 홍삼반복투여에 의한 디곡신의 약동학적 상호작용을 평가하고자 디곡신 2 mg/kg 를 정맥주사한 후 24시간동안 혈중 농도를 평가하였다.
- 그림에서 보는 바와 같이 디곡신의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이가 없었다.
- 이로부터 구한 약동학 파라미터인 AUC는 세 그룹간 유의적인 차이가 없었다.



Plasma concentration vs time profile of digoxin following intravenous injection of digoxin 2 mg/kg in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group



Box plots of pharmacokinetic parameters of digoxin following intravenous injection of digoxin 2 mg/kg in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Pharmacokinetic parameters of digoxin following intravenous injection of digoxin 2 mg/kg in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Digoxin	RGE CON n=7	RGE SA n=5	RGE 1WRA n=6	K-W test
AUClast(ng/mL)*h	2549±1217	1856±937	3104±817	0.164
AUCinf (ng/mL)*h	2671±1264	2129±1016	3531±897	0.138

2-17. 간질환군에서 홍삼-실리마린의 상호작용

(1) 간질환 동물모델

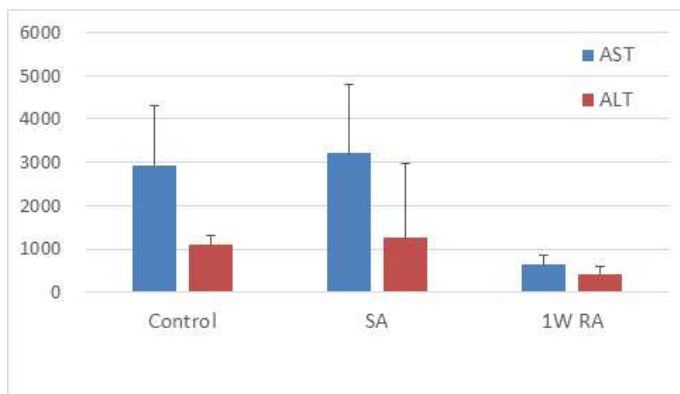
고용량의 Acetaminophen(AAP) 3g/kg의 용량으로 2일간 경구투여하여 급성 간괴사 및 염증작용을 일으키지 않으면서 간기능 저하를 유도하는 약물성 급성 간질환의 실험동물 모델을 사용하였다. 사람에서의 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 수치와 고지혈증 상태가 지속적으로 유지되는 간질환과 유사하다.

(2) 실리마린

영정귀과의 밀크시슬의 잎, 씨, 줄기에 주로 함유되어 있는 성분으로 간기능을 개선하는 효과가 있다. 특히, 실리마린을 간세포의 보호 및 재생작용을 하는 밀크시슬의 주요 활성성분으로 하는 간질환의 예방 및 치료제로서 과로, 스트레스, 음주, 영양불량, 독성물질 등으로 인한 각종 간질환에 우수한 치료효과를 나타내고 간장의 손상으로 인한 만성 피로, 전신권태감, 식욕부진, 소화불량 등의 증상을 개선하였다.

(3) 홍삼-실리마린의 간보호작용

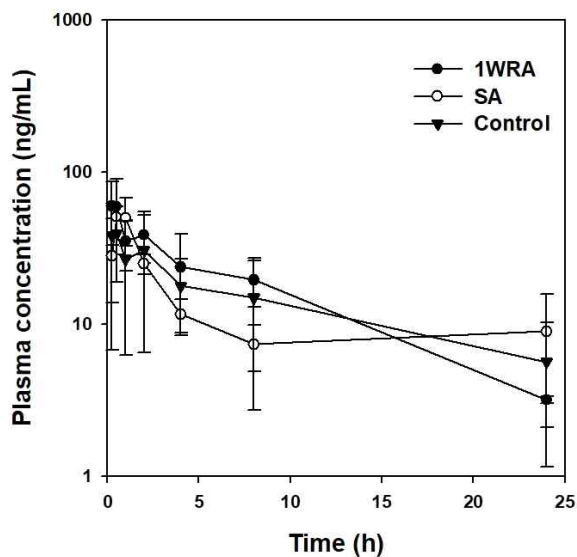
고용량의 Acetaminophen(AAP) 3g/kg의 용량으로 2일간 경구투여하여 급성 간독성을 유도한 쥐에 홍삼추출물과 실리마린을 각각 1.5g/kg와 50 mg/kg 용량으로 1주간 반복투여, 단회투여한 군과 대조군의 ALT, AST의 간독성 지표를 비교하였다. 아래 그림과 같이 대주군과 비교하여 단회투여군에서는 유의적인 독성감소가 없었으나, 홍삼과 실리마린을 병용투여한 군에서는 유의적인 ALT, AST의 감소가 나타났다.



(4) 홍삼-실리마린의 약동학적 상호작용

고용량의 Acetaminophen(AAP) 3g/kg의 용량으로 2일간 경구투여하여 급성 간독성을 유도한 쥐에서 홍삼추출물과의 병용투여에 의한 실리마린의 혈중농도에 변화가 있는지를 확인하고자 실리마린 50 mg/kg을 홍삼 1.5 g/kg을 투여하지 않은 대조군, 단회투여군, 1주 반복투여군에서 경구투여하여 실리마린의 약동학 특성의 변화를 확인하였다.

연구결과, 홍삼의 투여는 실리마린의 약동학 특성에 상호작용을 유도하지 않음을 확인할 있었고, 간독성 지표인 ALT, AST의 감소는 실리마린과 홍삼의 상호작용에 의한 것을 아님을 확인할 수 있다.



Plasma concentration vs time profile of silymarin in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Pharmacokinetic parameters of silymarin in control, single administration of RGE (SA), and 1-week repeated RGE administration (1WRA, 1.5 g/kg/day) group

Parameters	Control	SA	1WRA
	mean±SD	mean±SD	mean±SD
t1/2 (h)	11.78±3.36	10.43±8.11	7.18±1.55
Tmax(h)	1.42±1.01	0.35±0.14	0.92±0.95
Cmax(ng/ml)	83.68±65.00	244.16±120.14	75.34±25.65
AUClast (ng*h/mL)	372.74±228.82	335.56±69.30	333.82±91.23
AUCinf (ng*h/mL)	525.24±322.05	509.52±211.81	447.07±124.39
MRTlast(h)	8.59±0.81	6.22±4.37	5.40±1.84

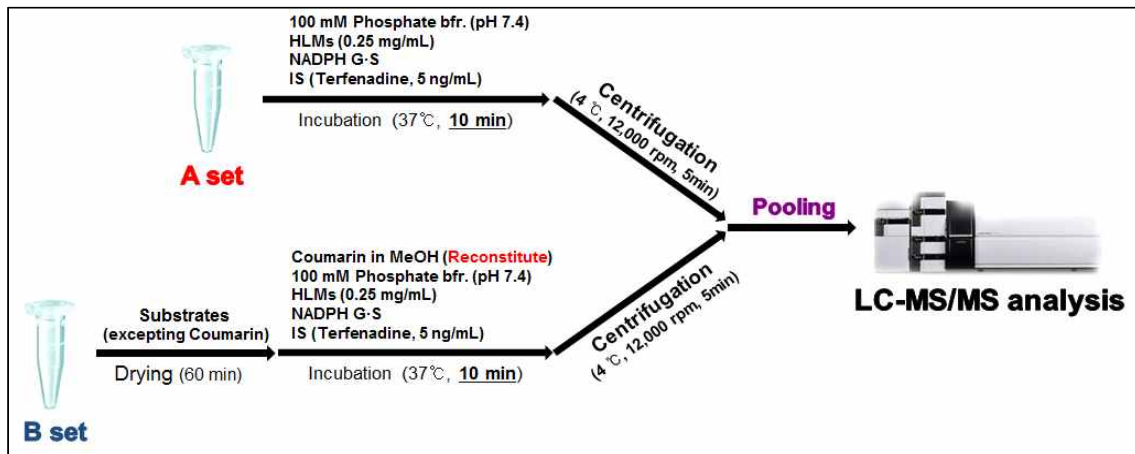
2-18. 고려인삼 추출물의 약물상호작용 평가를 위한 콕테일 기반의 평가기술 개발

(1) 1상 약물대사효소 활성 고속 평가기술 개발

- In vitro에서의 진세노사이드의 약물상호작용 고속 평가를 위한 콕테일 기질 개발
- 국내 특허 출원 및 PCT 출원 하였음 (국내, 10-2017-0063738; PCT, PCT-SAFE 3.51.080.256MT/FOP20180101/0.20.5.24)
- 약물상호작용이 없는 최적의 콕테일 기질 조합 및 기질 농도 결정

A set	B set
CYP1A2 : Phenacetin (20 μ M)	CYP2A6 : Coumarin (1 μ M)
CYP2B6 : Bupropion (3.5 μ M)	CYP2E1 : Chlorzoxazone (5 μ M)
CYP2C8 : Amodiaquine (0.1 μ M)	CYP2J2 : Astemizole (0.5 μ M)
CYP2C9 : Diclofenac (1 μ M)	CYP3A : Midazolam (0.1 μ M)
CYP2C19 : S-Mephenytoin (40 μ M)	CYP3A : Nefedipine (2 μ M)
CYP2D6 : Dextromethorphan (2 μ M)	CYP3A : Testosterone (2 μ M)

- 콕테일 배양 조건 및 LC-MS/MS 분석을 위한 시료 전처리 조건 확립

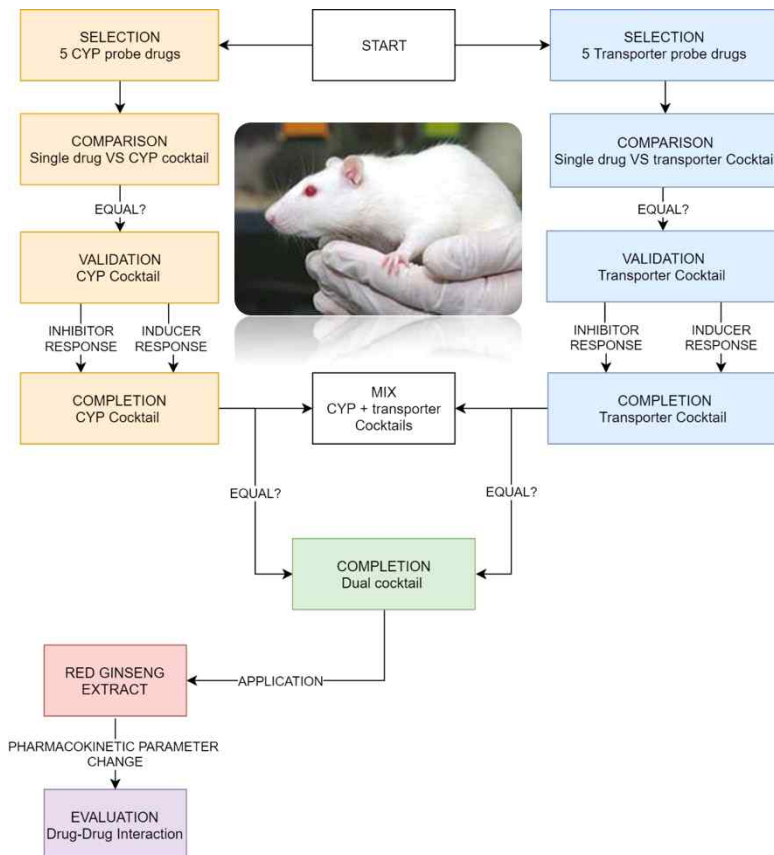


- Single vs cocktail 배양에 따른 10종 P450 동효소 약물대사효소 활성 비교

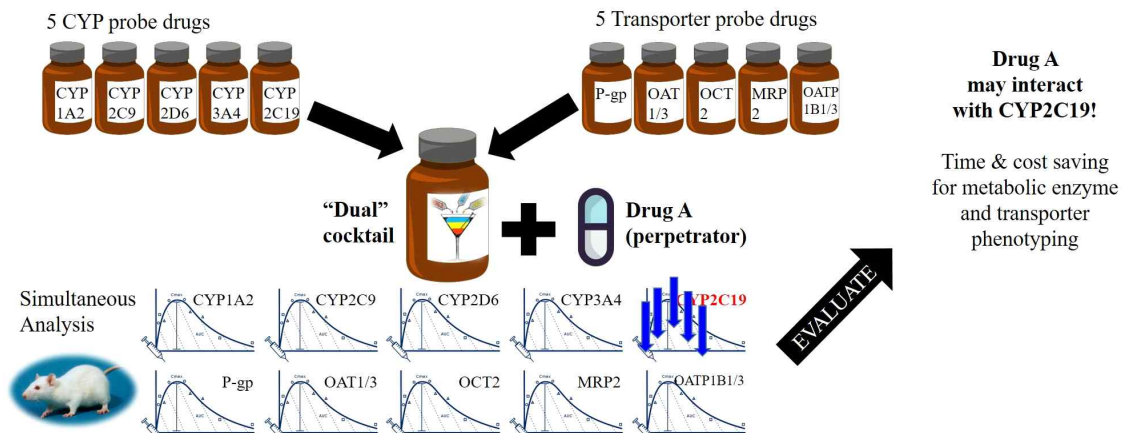
Enzyme	Substrate	Final Conc. (mM)	Enzyme activity (pmol/min/mg protein)		
			Single substrate	Substrate cocktail	Literature
CYP1A2	Phenacetin	20	169.4 ± 8.9	153.2 ± 5.5	55-232
CYP2B6	Bupropion	3.5	7.6 ± 0.3	6.4 ± 0.5	6.2-11.99
CYP2C8	Amodiaquine	0.1	3.9 ± 0.0	3.8 ± 0.2	56.22-56.6
CYP2C9	Diclofenac	1	43.9 ± 5.4	45.8 ± 4.6	152.01-400
CYP2C19	S-Mephenytoin	40	14.0 ± 1.7	11.9 ± 0.3	5-31
CYP2D6	Dextrometorphan	2	46.0 ± 1.4	38.0 ± 0.7	27.22-50
CYP2A6	Coumarin	1	247.9 ± 18.1	236.1 ± 8.1	3.3-174
CYP2E1	Chlorzoxazone	5	55.5 ± 13.9	59.7 ± 15.1	40
CYP2J2	Astemizole	0.5	42.0 ± 0.9	38.7 ± 1.2	-
CYP3A	Midazolam	0.1	29.7 ± 0.9	24.4 ± 0.5	38.3-370
	Nifedipine	2	8.0 ± 0.5	9.1 ± 1.0	3.6
	Testosterone	2	96.6 ± 6.0	83.7 ± 9.7	26.1-291

(2) 대사효소 및 약물수송 단백질 활성도 동시 고속평가를 위한 동물용 듀얼 각테일 개발

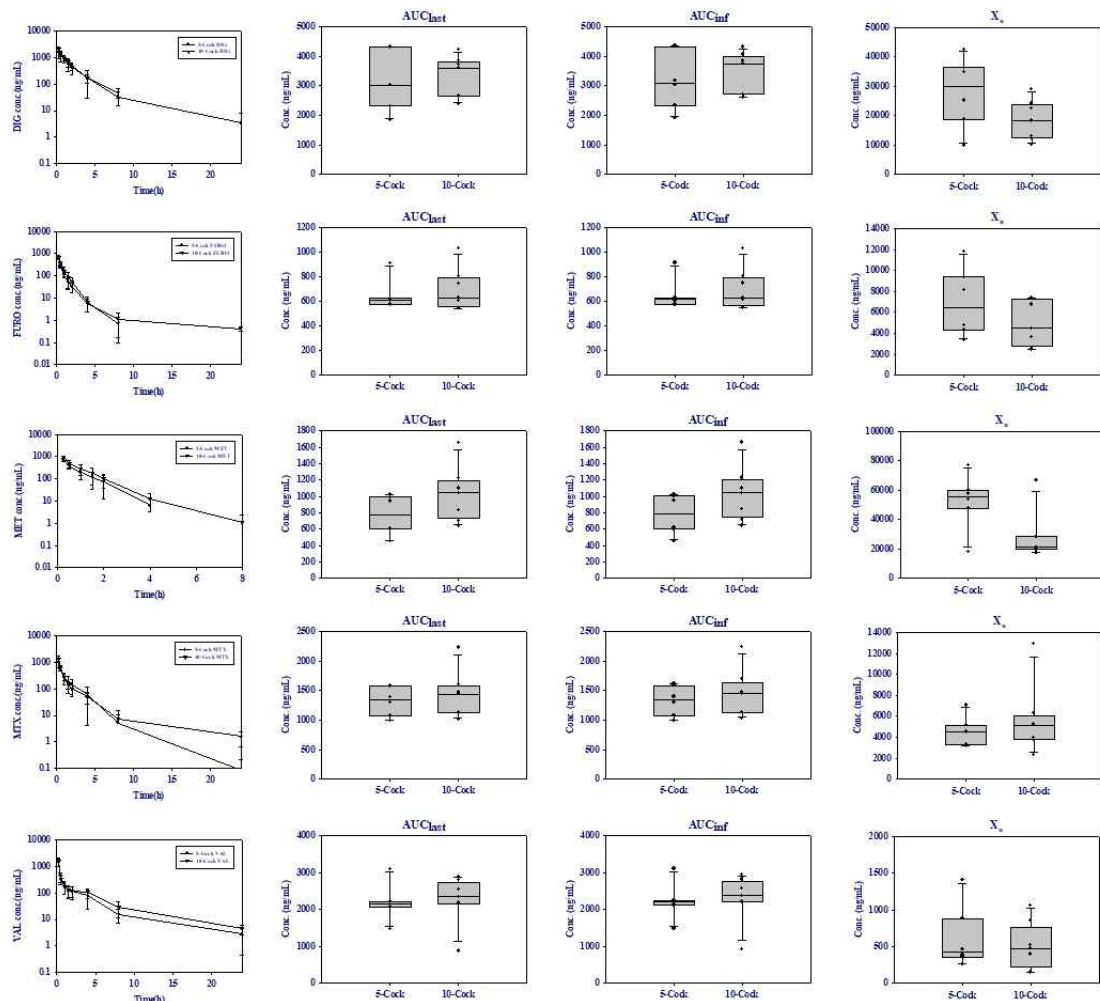
- 사이토크롬 P450 동종효소 및 약물수송 단백질의 활성도 고속평가를 위한 동물용 듀얼각테일 키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 최소용량의 카페인, 디클로페낙, 텍스트로메톨판, 니페디핀, 오메프라졸, 디곡신, 퓨로세마이드, 메포민, 메토티렉세이트 및 발사탄으로 이루어진 탐침약물을 랫드에 동시투여하여 5종의 사이토크롬 P450 동종효소와 5종의 약물수송 단백질의 활성을 동시에 고속으로 측정하도록 함
- 랫드에 10종의 탐침약물을 최소용량을 투여하여 탐침약물 간에 상호작용을 나타내지 않으면서 5종의 사이토크롬 P450 동종효소와 5종의 약물수송 단백질의 활성을 동시에 고속으로 측정할 수 있는 장점이 있다. 특히 최소용량 각테일은 동시투약하고, 모든 약물을 질량분석기를 이용하여 동시분석하므로 편의성과 실용성 면에서 우수함
- 아래 그림은 대사효소 및 약물수송 단백질 활성도 동시 고속평가를 위한 동물용 듀얼 각테일 개발 개요도 및 과정의 flow chart임
- 이상의 결과는 현재 국내특허로 출원되었음 (10-2018-0168269)



[사이토크롬 P450 동종효소 및 약물수송 단백질의 활성도 고속평가를 위한 동물용 듀얼 각테일 키트의 개발과정을 나타낸 플로우차트]



[사이토크롬 P450 동종효소 및 약물수송 단백질의 활성도 고속평가를 위한 동물용 듀얼 콕테일 키트의 개념도]

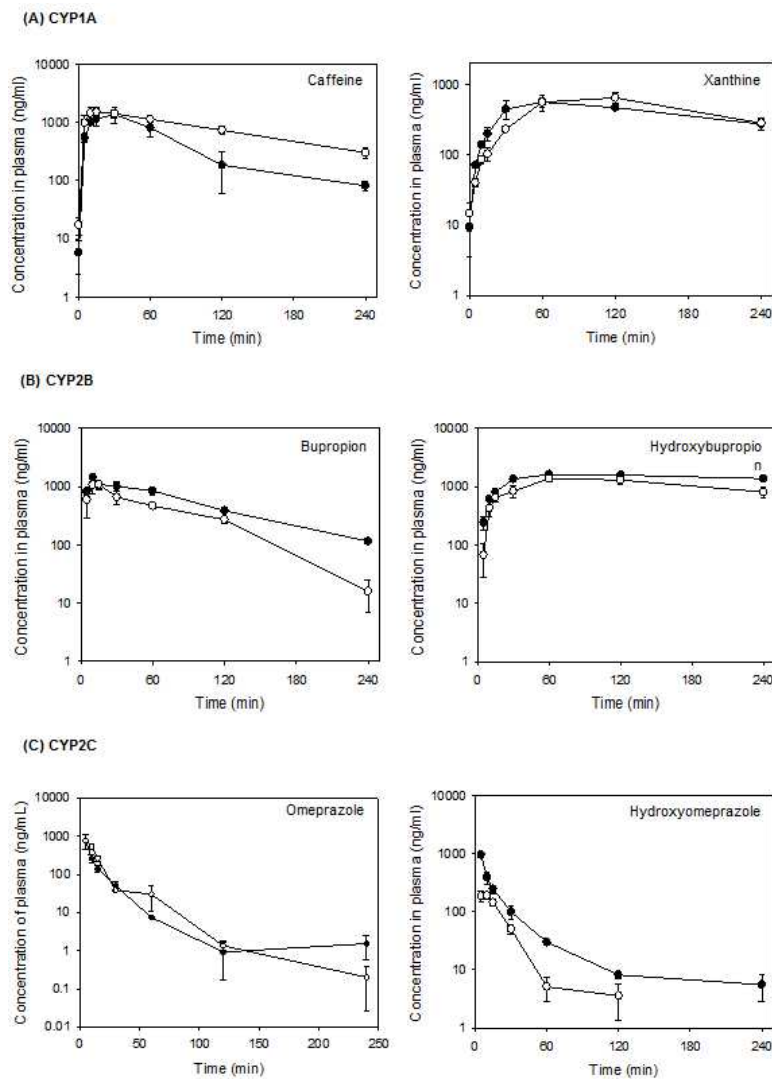


[듀얼콕테일 검증과정으로 대사효소 탐침약물과 동물용 듀얼콕테일 10종 탐침약물 동시투여 후 혈중농도와 약동학 파라미터를 비교하여 상호작용이 없음을 나타냄]

(3) In vivo Cocktail substrate 활용한 약물대사 약물상호작용 평가 시스템 개발 (mouse)

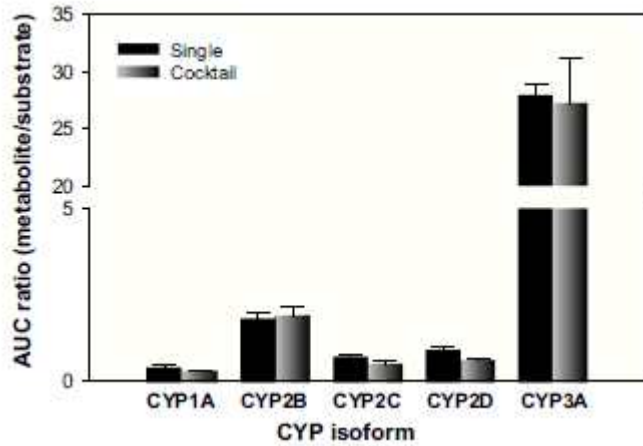
(가) 각테일 투여법 개발 및 validation

- in vivo에서의 인삼제제의 약물상호작용을 평가하기 위한 cocktail substrate 개발
- 마우스에 caffeine (2 mg/kg), bupropion (20 mg/kg), omeprazole (2 mg/kg), dextromethorphan (10 mg/kg) and midazolam (2 mg/kg)를 투여하여 동시평가 시스템 개발
- 5종의 CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A) 활성 동시평가 시스템 개발
- Single vs cocktail 투여에 따른 재현성 평가 및 약동학 파라미터 비교
- 해당 결과는 2018년 Arch Pharm Res에 게재되었음



[Mean plasma concentration-time curves for single probe substrate versus cocktail substrates a

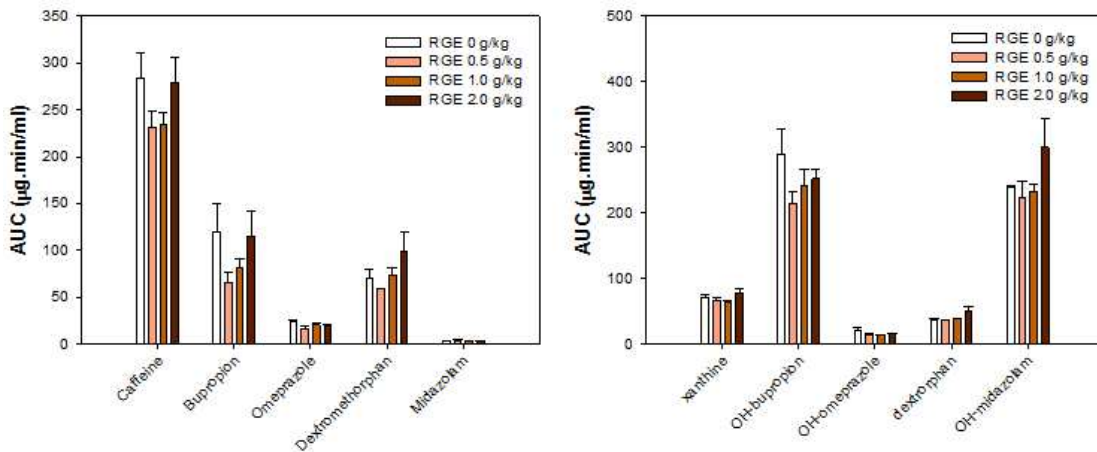
CYP1A, b CYP 2B, c CYP2C, d CYP2D, and e CYP3A]



[단일 탐침약물과 카테일로 투여한 탐침약물의 대사율 비교]

(나) 고려홍삼 추출물의 단회 동시투여에 의한 약물상호작용 평가

- 홍삼추출물을 0, 0.5, 1, 2 g/kg 투여 5분후 5가지 CYP기질을 경구 투여하여, 홍삼 추출물과 약물과 동시 투여시 발생할 수 있는 약물상호작용을 평가함
- CYP1A, 2B, 2C, 2D, 3A 기질 약물을 동시에 투여하는 cocktail assay 방법으로 기반으로, 마우스 혈액을 LC-MS/MS 분석하여 각 약물의 기질/대사체량을 정량하여 약물상호작용을 평가함
- 정량 대상이 되는 지질/대사체의 표준곡선과 method validation을 실시함
- 홍삼과 약물의 동시투여 시 유의적인 약물상호작용은 관찰되지 않았음



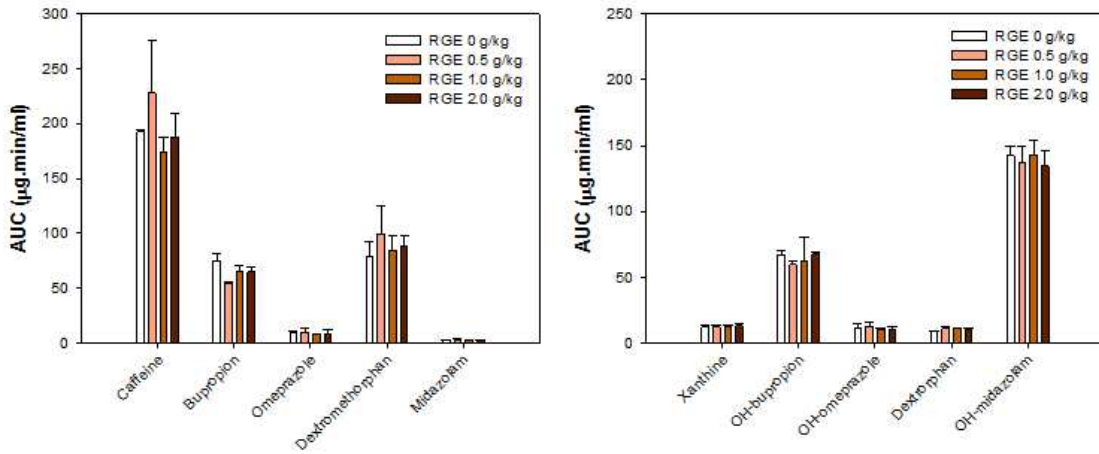
[AUC of 5 CYP substrate and its metabolite after Co-administration of RGE]

(다) 홍삼 추출물의 2/4주 반복투여에 따른 약물상호작용 평가

- 홍삼추출물을 0, 0.5, 1, 2 g/kg 용량으로 2주/4주간 반복 투여하고 최종 투여 24

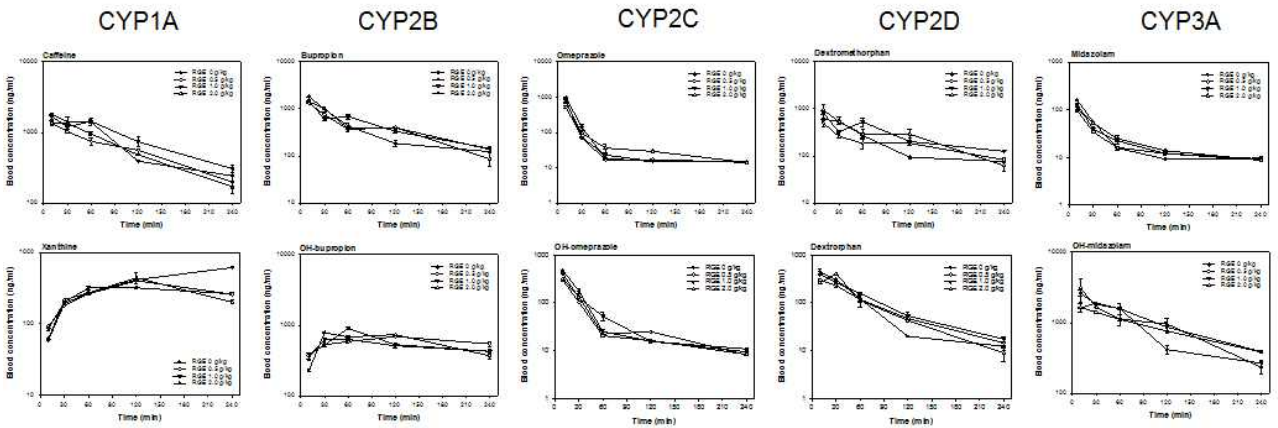
시간 뒤 5가지 CYP기질을 경구 투여하여, 홍삼추출물의 반복투여에 따라 발생할 수 있는 약물상호작용을 평가함

- 투여 마우스의 간에서 활성 평가시 CYP3A의 증가가 되었지만, 기질 약물에 대한 약물동력학적 변화는 관찰되지 않았음

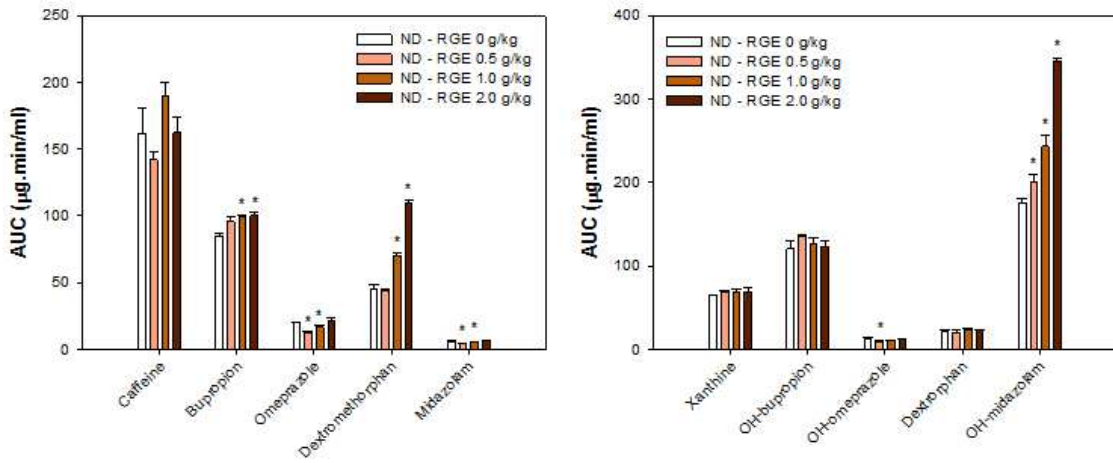


[AUC of 5 CYP substrate and its metabolite after 2 wks administration of RGE]

- 홍삼 추출물을 4주간 반복 투여 후 약물동력학 평가 결과 CYP3A의 대사율이 증가되는 반면에 CYP2D의 대사율은 저해됨이 관찰됨



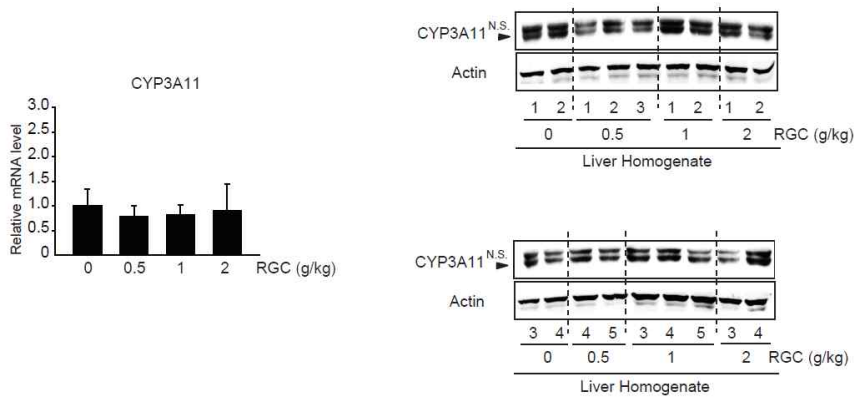
[Plasma concentration of 5 CYP substrate and its metabolite after 4wks administration of RGE]



[AUC of 5 CYP substrate and its metabolite after 4wks dministration of RGE]

(라) 홍삼 추출물의 1상대사효소 유도능 평가

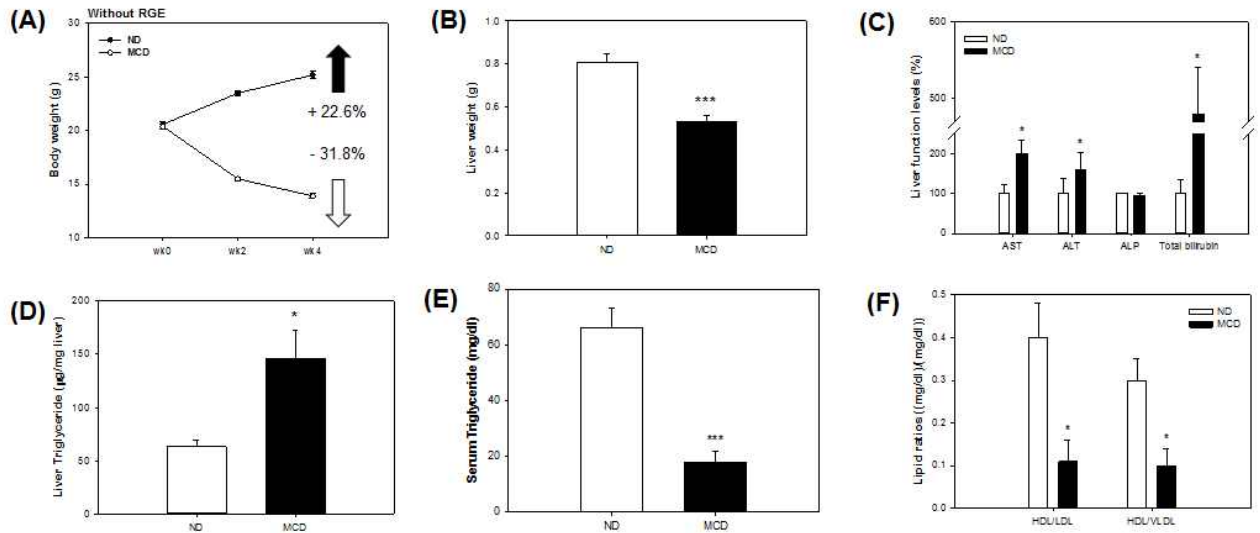
- 홍삼 추출물을 4주간 반복 투여 후 투여 마우스의 간을 적출하여 CYP3A 효소의 유도능을 immunoblot 및 RT-PCR을 통해 평가
- 단백질과 mRNA 수준에서 CYP3A 효소의 유도능은 관찰되지 않음



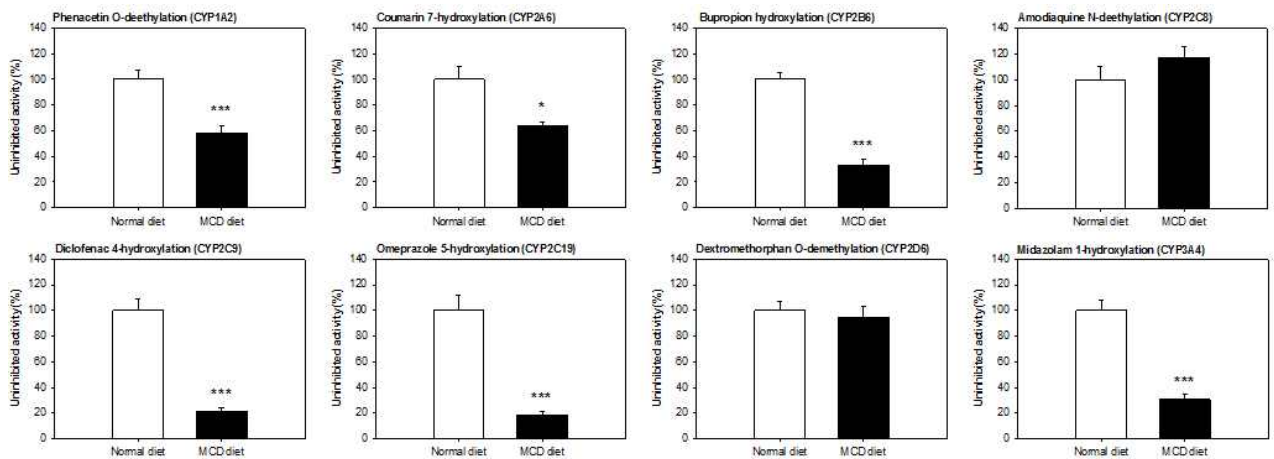
(마) MCD-diet로 유도한 지방간 모델에서의 약물상호작용 평가

① MCD-diet로 유도한 지방간 모델 확립

- 지방간에서의 홍삼의 약물상호작용을 평가하기 위해 마우스에서 MCD-diet를 4주간 투여하여 모델 구축
- MCD-diet에 의해서 유도된 지방간 모델에서 CYP활성이 감소됨을 관찰함
- 지방간을 가진 사람에게서 약물상호작용이 발생할 수 있음을 의미함



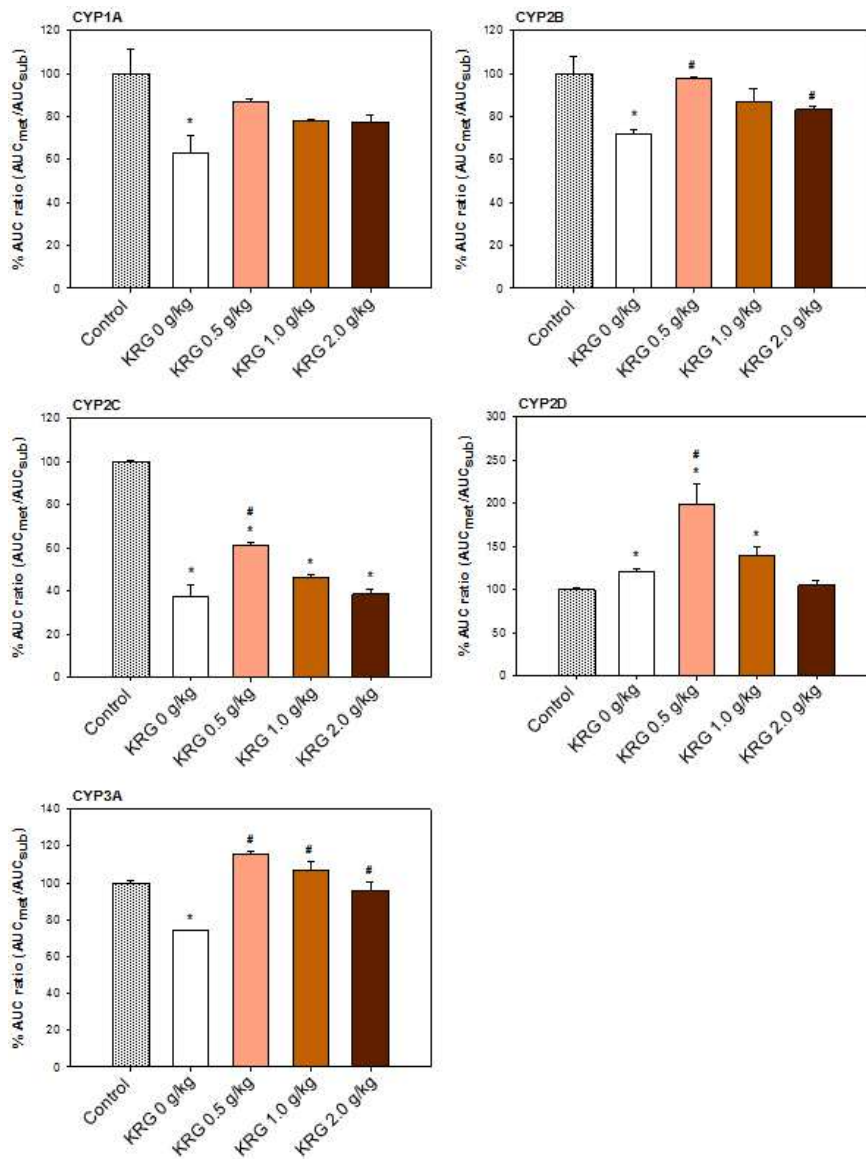
[Changes of (A) body weight, (B) liver weight, (C) Serum parameters of liver injury, (D) TG in liver, (E) TG in serum, and (F) Lipid ratios]



[Activities of 8 CYP isoforms in MCD-diet model vs control]

② MCD-diet 지방간 모델에서의 홍삼 추출물의 약물상호작용 평가

- 구축된 지방간 모델에서 홍삼추출물을 4주간 반복 투여 후 5종의 CYP기질을 cocktail 투여 후 혈중 농도를 정량하여 약물상호작용을 평가함
- MCD-diet모델에 홍삼을 동시 투여시 감소된 CYP활성 회복되어, 기질 약물들의 약물동력학 지표가 개선됨을 확인함
- 지방간을 가진 사람에게서 홍삼의 반복투여는 지방간에 의한 약물상호작용이 개선될 수 있음을 의미



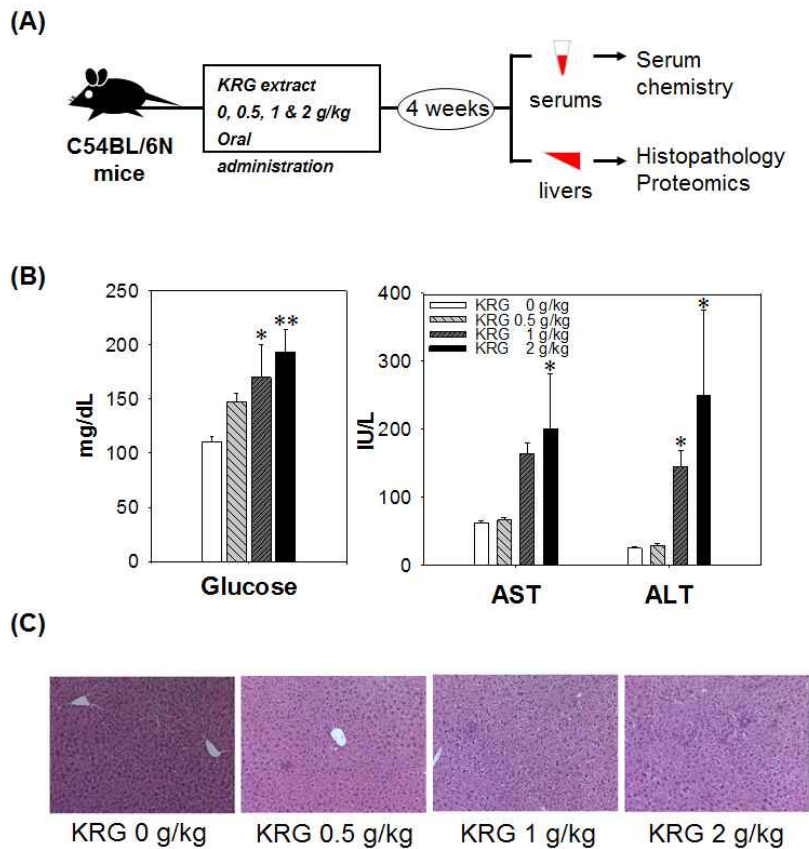
[AUC ratio of CYP substrates and their metabolites after repeated-administration of KRG with MCD diet for 4 weeks]

2-19. 국제 공동연구

(1) 고용량 고려인삼의 아만성 투여 후 안전성 평가를 위한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구

(가) 고용량의 홍삼의 아만성 투여로 인한 안전성 평가

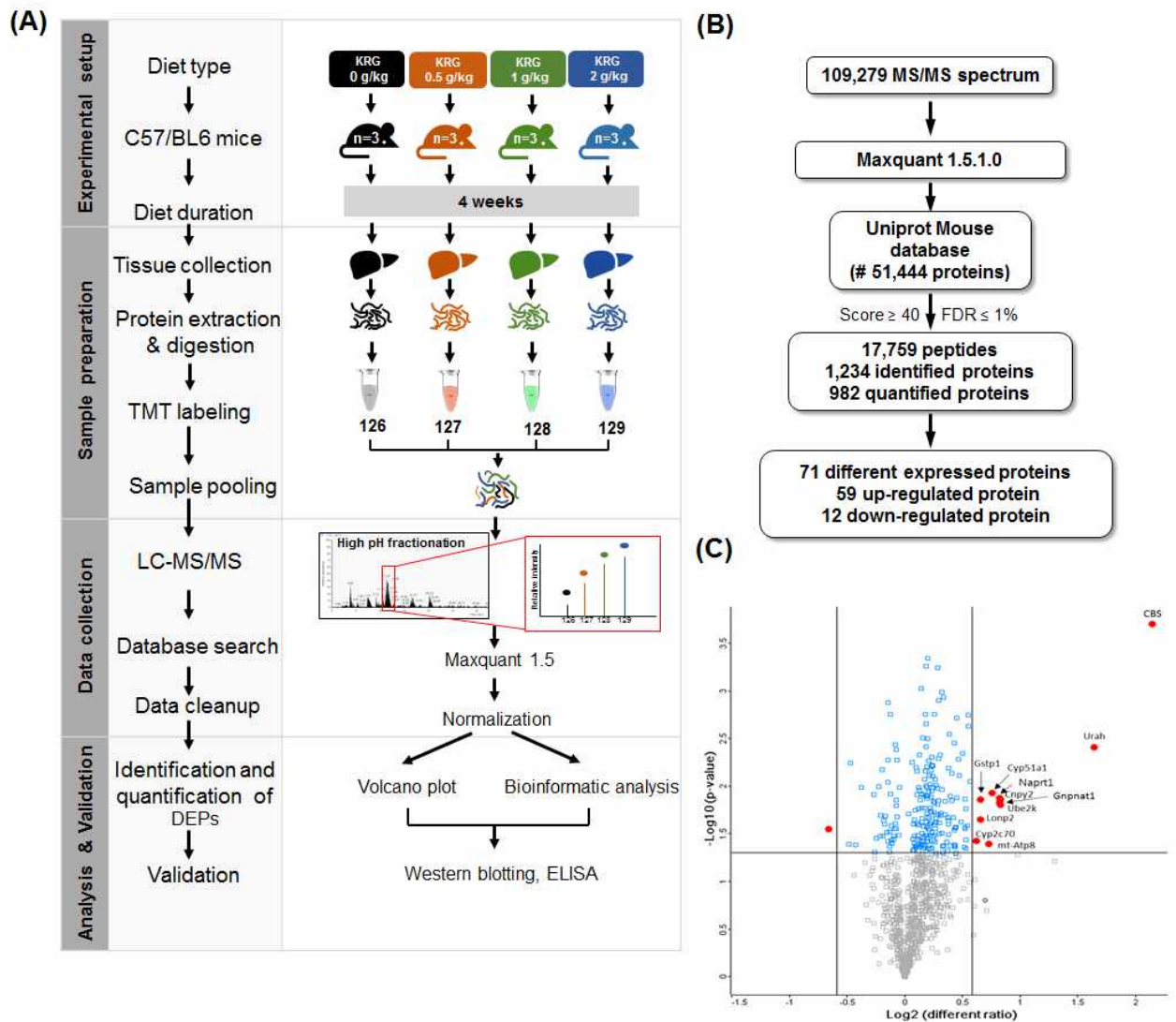
- 홍삼추출물 0.5, 1, 2g/kg로 4주간 마우스에 투여 후 혈액 및 간시료에서 간독성 평가
- 간독성 지표인 ALT, AST가 용량의존적으로 유의적으로 증가하였으며, 조직사진에서 간독성이 진행됨이 확인됨
- 혈액 시료에서 glucose농도가 투여 용량 의존적으로 증가됨이 관찰됨
- 홍삼투여 결과 몸무게, 간무게, 총콜레스테롤 농도, 지질의 농도는 변화되지 않음



[The representative of experimental approach. The 5-week-old C57BL/6 male mice were fed different dose (0.5 g, 1 g and 2 g/kg) of Korean red ginseng (KRG) administration. After 4 weeks, serum and liver tissue were extracted for serum chemistry and proteomic analysis (A). Glucose level, AST and ALT level in serum (B), histological analysis of H & E staining of liver tissue (C) at 200 x magnification.]

(나) 프로테오믹스 기반 간독성 기전 연구

- 고용량 홍삼추출물 투여로 발생한 간독성의 기전을 탐색하기 위해 4주 투여 후 확보한 간시료에 TMT-labeling을 통한 정량적 프로테오믹 분석 실시
- 분석결과 1,234 단백질을 동정하고, 그 중 982개의 단백질을 정량에 사용하였으며, 71개의 변화된 단백질을 동정 (59개 증가, 12개 감소)
- PCA plot에서 변화된 단백질 중 중요한 key 단백질 동정
- 홍삼투여에 의해 유의적으로 증가된 단백질 리스트 (표)



[Overall scheme of global proteomic profiling for mouse liver (A). Schematic illustration of comparative profiling for proteomics via MaxQuant search engine (B). Volcano plot and distribution of quantified proteins by reporter ion ratio value in three KRG groups (C).]

표. List of statistically significant upregulated proteins

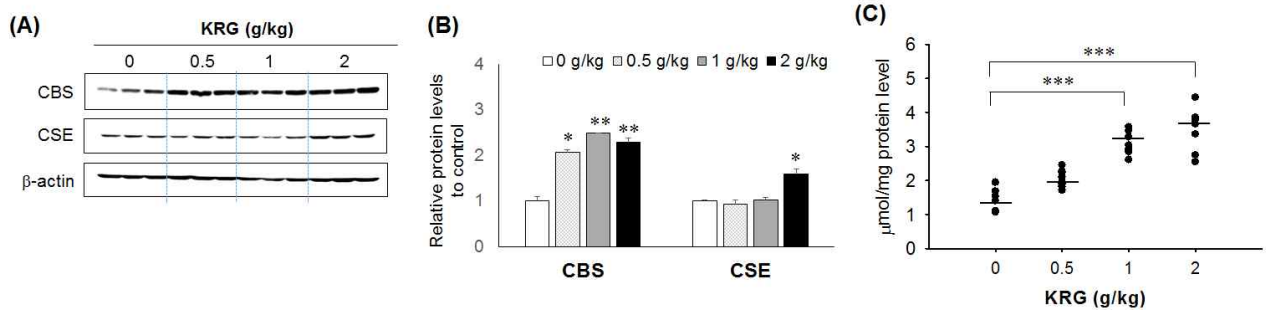
No.	Accession	Protein	Gene names	peptides	Protein coverage (%)	Ratio (KRG/Control)			p-value
						0.5	1	2	
1	Q91WT9	Cystathionine beta-synthase	Cbs	3	3.9	4.48	4.24	4.54	0.000
2	Q9CRB3	5-hydroxyisourate hydrolase	Urah	2	13.6	2.73	3.21	3.48	0.004
3	Q8CC86	Nicotinate phosphoribosyltransferase	Naprt1	6	12.8	1.67	1.64	2.02	0.013
4	Q9JK38	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	Gnpnat1	2	7.1	1.58	1.74	2.01	0.015
5	Q9QXT0	Protein canopy homolog 2	Cnpy2	2	14.3	1.55	1.88	1.92	0.014
6	Q8K0C4	Lanosterol 14-alpha demethylase	Cyp51a1	1	2.4	1.51	1.82	1.76	0.012
7	A0A0J9YUI1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	Ube2k	1	10.8	1.64	2.06	1.67	0.016
8	Q7JCZ0	ATP synthase protein 8	mt-Atp8	2	34.3	1.59	2.00	1.65	0.040
9	P19157	Glutathione S-transferase P 1	Gstp1	8	41	1.42	1.70	1.63	0.014
10	Q9DBN5	Lon protease homolog 2, peroxisomal	Lonp2	2	2.6	1.54	1.80	1.42	0.022
11	Q91W64	Cytochrome P450 2C70	Cyp2c70	5	10.8	1.73	1.61	1.30	0.038

(다) Cystathionine beta-synthase 매개 H₂S에 따른 간독성 기전 규명

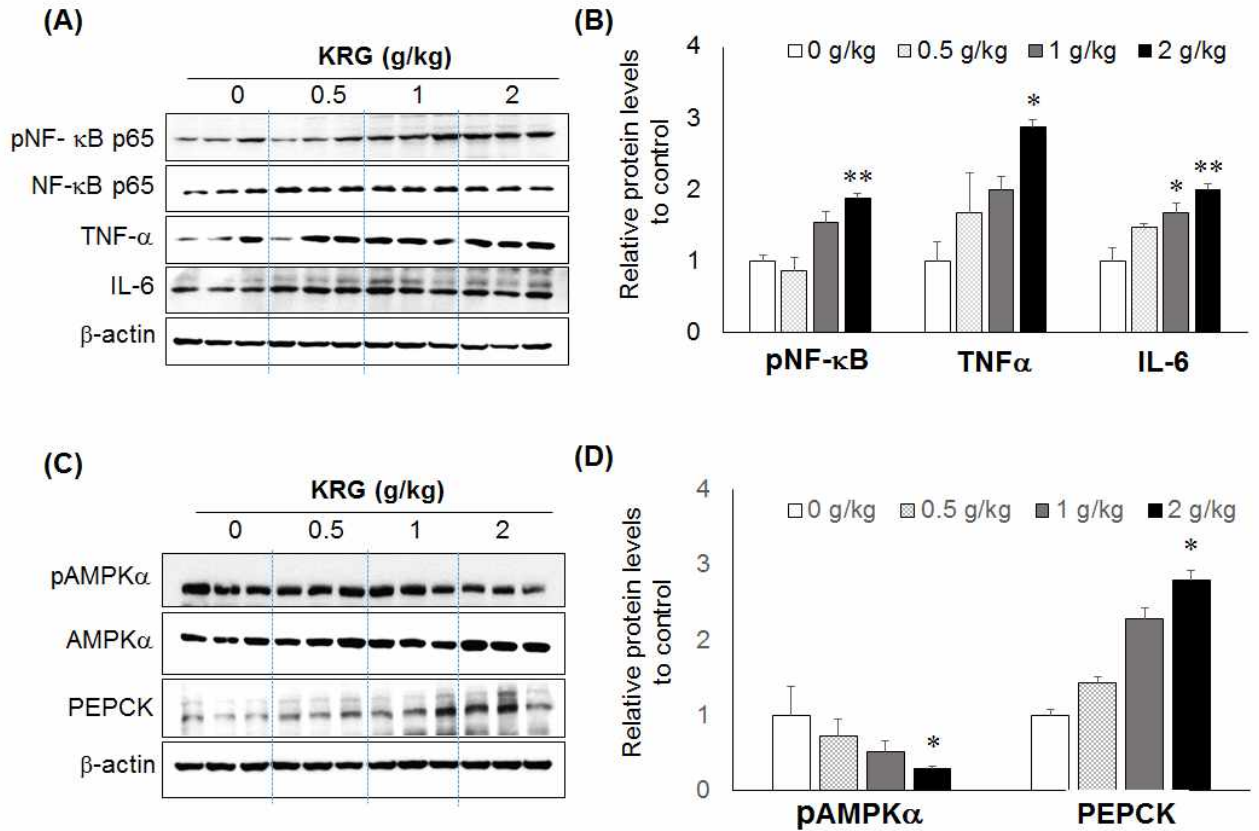
- 홍삼 추출물투여에 따라 증가된 단백질 중 가장 크게 증가된 Cystathionine beta-synthase (CBS) 단백질 동정
- CBS는 생체 내 H₂S를 생산하는 단백질이며, 생성된 H₂S는 cystathionine gamma-lyase(CSE)에 의해 분해됨
- H₂S는 염증 반응을 통한 간독성 및 AMPK pathway를 통한 당대사를 조절한다고 알려짐
- 확보된 간시료에서 증가된 CBS와 변화되지 않은 CSE를 확인 및 농도 의존적으로 증가된 H₂S의 농도 확인
- 염증에 매개 단백질의 증가를 확인 및 당대사의 중요 pathway인 AMPK-PEPCK pathway를 증가를 확인함
- 결론적으로 고용량의 홍삼 추출물의 아만성 투여로 인해 간독성이 발생하고, 그 기전이 CBS의 유도로 인한 H₂S가 증가하고, H₂S에 의해 증가된 ROS로 인한 염증 반응 및 pAMPK감소로 인한 당신생반응의 증가로 고혈당이 유발됨을 제시함
- 따라서 권장복용량을 상회하는 용량으로 장기간 복용시 기대되는 약리작용이외의

독성반응을 야기할 수 있으므로, 정해진 권장복용량을 지킬 수 있도록 환자에 대한 복용지도가 요구됨을 확인함

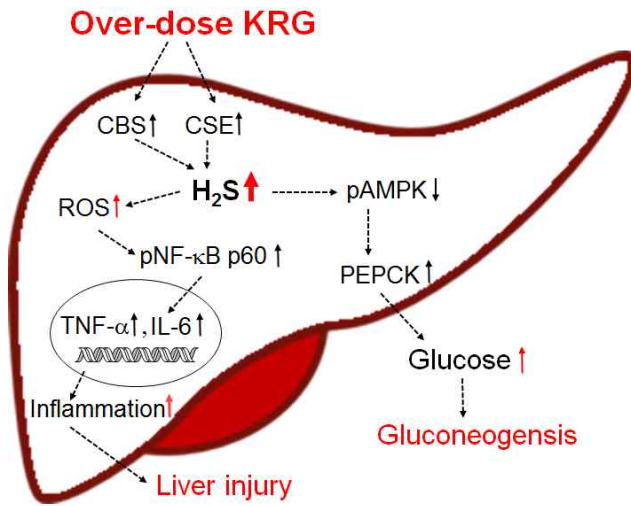
- 본 연구 결과는 2018년 12월 현재 Journal of Ginseng Research에 투고되었음



[Cystathionine beta-synthase (CBS) and cystathionine gamma-lyase (CSE) protein level and hydrogen sulfide (H_2S) production in mouse liver fed over-dose KRG]



[Protein level changes by increased H_2S on liver injury and gluconeogenesis pathway in mouse liver fed over-dose KRG. Immunoblotting analysis of the pNF-kappaB p65, NF-kappaB p65, TNF-alpha, IL-6 protein levels (A), relative ratios by NF-kappaB p65 and β -actin protein level (B). Immunoblotting analysis of the pAMPK α , PEPCK protein levels (C), relative ratios by AMPK α and β -actin protein level (D).]

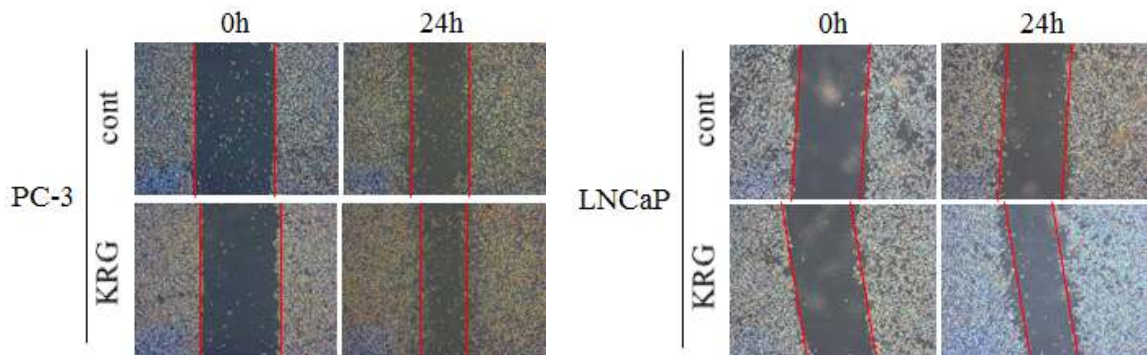


[The signaling pathways underlying over-dose KRG-induced liver injury and gluconeogenesis through H₂S]

(2) 홍삼추출물 및 ginsenoside의 전립선암세포의 migration 및 invasion 저해능평가

(가) Aggressive prostate cancer cell에 대한 인삼유래성분의 활성 탐색

- 홍삼추출물의 신규 활성을 탐색하기 위해 전이성 전립선암의 migration 저해능 평가
- 대표적 전립선암인 PC-3, LNCap 세포에 KRG 추출물 0.1 - 500 ug/ml 용량으로 처리하였을 때 migration 변화에 유의적인 변화를 관찰하지 못하였음
- Invasion 평가에서도 홍삼추출물에 의한 저해효과는 나타나지 않았음
- 전립선암의 전이성은 SIRT5 감소에 따른 PI3K 효소가 증가되어 migration/invasion이 증가됨이 새롭게 규명되었으며, 홍삼추출물 또는 유래물의 SIRT5 활성 유도에 대한 관련 후속 연구를 추가로 진행 중



[전이성 전립선암인 PC-3, LNCap의 migration에 미치는 홍삼추출물의 효능 평가 (500 ug/ml)]

2-20. 고려인삼-약물상호작용 결과 요약

(1) 혈중 ginsenoside 농도

	ginsenoside	plasma (nM)	mw
human	Rb1	11	1132
	Rb2	8	1102
	Rc	9	1102
	Rd	3	969
	Compound K	28	645
rat	Rb1	28	1132
	Rb2	20	1102
	Rc	23	1102
	Rd	11	969

(2) 약물대사효소/수송체 상호작용

	in vitro	in vivo human	in vivo rat
CYP	1A2	X	+ 50%>A>25%
	2B6	X	
	2C9	X	X
	2C19	X	+ 50%>A>25%
	2D6	X	+ 50%>A>25%
	3A4	X	X
UGT	1A1	X	
	1A4	X	
	1A9	X	
	2B7	X	
transporter	OCT2	X	++ >50%
	OAT3	X	+ 50%>A>25%
	OAPT1B1	X	X
	P-gp	X	X
	BCRP	X	
	MRP		

X No inhibition
 + weak inhibition
 ++ moderate inhibition

(3) 고려인삼-다빈도 병용투여 의약품 상호작용

Therapeutics		PK		PD
antidiabetics	metformin	+	A<25%	synergistic in FBG
anticoagulant	warfarin	X		synergistic in INR
antihypertensive	amlodipine	X		
	fimasartan	X		
	hydrochlorothiazide	X		
	nifedipine	+	A<25%	
	valsartan	X		
	furosemide	++	50%>A>25%	
immunosuppresant	methotrexate	++	50%>A>25%	
MOA inhibitor	selegiline	++	50%>A>25%	
NSAID	sulfasalazine	+++	100%>A>50%	
	diclofenac	X		
PPI	omeprazole	++	50%>A>25%	
hepatoprotective	silymarin	X		
ETC	dextromethorphan	X		
	digoxin	X		

2-21. 연구개발 성과

(1) 성과조사표

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술발표	정책 활용		홍보 전시
												SCI	비SCI						
최종목표	2	2									14	6	10		10	1	1		
1차년도	목표	0	0								1	0	2	0	3	0	0		
	실적	0	0								1	4	2	0	4	0	0		
2차년도	목표	1	0								4	2	3	0	3	0	0		
	실적	1	0								4	4	14	0	3	0	0		
3차년도	목표	1	0								5	2	5	0	4	1	1		
	실적	3	0								10	1	7	0	9	1	2		
소계	목표	2	0								10	4	10	0	10	1	1		
	실적	4	0								15	9	23	0	16	1	2		
종료 1차년도		0	1								2	1	0	0	0	0	0		
종료 2차년도		0	1								2	1	0	0	0	0	0		
소계		3	2								14	6	19		10	1	1		
합계																			

(2) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부	게재일	등록번호
1	Inhibitory Effects of 12 Ginsenosides on the Activities of Seven Cytochromes P450 in Human Liver Microsomes	Mass Spectrometry Letter	조정제, 이상규	7(4)	대한민국	한국질량분석학회	비SCI	2016.12	DOI: 10.5478/M SL.2016.7.4.000
2	Identification of absolute conversion to geraldol from fisetin and pharmacokinetics in mouse	J Chromatogr B	조준현, 조정제, 이재목, 이상규	1038	네덜란드	ELSEVIER SCIENCE BV.	SCI	2016.12	http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.1

									0.034
3	Differential Cytotoxic Effects of Jaspine B in Various Cancer Cells	J Life Sci	이지훈, 송임숙	26(12)	대한민국	생명과학회	비SCI	2016.12	http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.12.1392
4	Identification of ML106 Phase 1 Metabolites in Human Liver Microsomes Using High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry	Mass Spectrometry Letter	조준현, 남웅식, 이상규	7(3)	대한민국	한국질량분석학회	비SCI	2016.09	DOI: 10.5478/MSL.2016.7.3.69
5	Decreased absorption of midazolam in the stomach due to low pH induced by coadministration of Banha-sasim-tang	Environmental Health and Toxicology	조준현, 이상규	31	대한민국	환경독성보건학회	비SCI	2016.08	http://dx.doi.org/10.5620/eh.t.2016.016016
6	Investigation of the regulatory effects of saccharin on cytochrome P450s in male ICR mice	Toxicological Research	조준현, 이상규	33(1), 30	대한민국	한국독성학회	비SCI	2017.01	https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.1.025
7	Involvement of intestinal efflux and metabolic instability in the pharmacokinetics of platycodin D in rats	Drug metabolism and Pharmacokinetics	권미화, 지현경, 송임숙	32, 248-254	일본	JSSX	SCI	2017.06	http://dx.doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.05.005
8	Pharmacokinetics and Intestinal Permeability of Amaranth in Rats	J Life Sci	한유진, 권미화, 송임숙	27(7)100-105	대한민국	생명과학회	비SCI	2017.7	https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.7.000
9	Comparison of Gastrointestinal Permeability of Caffeine, Propranolol, Atenolol, Ofloxacin, and Quinidine Measured Using Ussing Chamber System and Caco-2 Cell Monolayer	Mass Spectrometry Letters	송임숙, 최영아, 최민구	8(2)34-38	대한민국	한국질량분석학회	비SCI	2017.6	DOI: 10.5478/MSL.2017.8.2.34
10	Pharmacokinetics and bioequivalence of a rosuvastatin/ezetimibe fixed-dose combination tablet versus single agents in healthy male volunteers	International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	강우열, 성숙진, 윤영란	e-pub	독일	Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle	SCI	2017.11	http://doi.org/10.5414/CIP.2017.026
11	Non-targeted metabolomics-guided sildenafil metabolism study in human liver microsomes	Journal of Chromatography B	김주현, 이상규	1072C, 86-93	네덜란드	Elsevier Science B.V.	SCI	2017.11	doi: 10.1016/j.jchromb.2017.11.009.
12	Pharmacokinetics of Jaspine B and Enhancement of Intestinal Absorption of	Marine drugs	최민구, 이지훈, 송임숙	15(9)	스위스	MDPI	SCI	2017.09	doi: 10.3390/md15090279

	Jaspine B in the Presence of Bile Acid in Rats								
13	Investigation of Herb-Drug Interactions between Korean Red Ginseng Extract and five CYP Substrates by LC-MS/MS	Mass Spectrometry Letters	조정제, 이상규	8(4)	대한민국	한국질량분석학회	비SCI	2017.12	DOI: 10.5478/MSL.2017.8.4.98
14	Simultaneous Determination of Five Cytochrome P450 Probe Substrates and Their Metabolites and Organic Anion Transporting Polypeptide Probe Substrate in Human Plasma Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	Pharmaceutics	허재경, 류광현, 윤영란	10,79	스위스	MDPI	SCI	2018.07	doi:10.3390/pharmaceutics10030079
15	Ursodeoxycholate Restores Biliary Excretion of Methotrexate in Rats with Ethinyl Estradiol Induced-Cholestasis by Restoring Canalicular Mrp2 Expression	IJMS	김민주, 송입숙	19,1120	스위스	MDPI	SCI	2018.04	doi:10.3390/ijms19041120
16	Effect of Red Ginseng Extract on the Pharmacokinetics and Efficacy of Metformin in streptozotocin-Induced Diabetic Rats	Pharmaceutics	남소정, 송입숙	10,80	스위스	MDPI	SCI	2018.07	doi:10.3390/pharmaceutics10030080
17	A comprehensive in vivo and in vitro assessment of the drug interaction potential of red ginseng	Clin Ther	성숙진, 강우열, 송입숙, 윤영란		미국	ELSEVIER	SCI		doi:10.1016/j.clinthera.2018.06.017
18	Development of a simultaneous LC-MS/MS method to predict in vivo drug-drug interaction in mice	Arch Pharm Res	조정제, 이상규	41	미국	SPRINGER	SCI	2018.03	https://doi.org/10.1007/s12272-018-1012-8
19	Selective inhibition of CYP2C8 by fisetin and its methylated metabolite, geraldol, in human liver microsomes	Drug Metabolism and Pharmacokinetics	리아쵸레샤, 김주현, 이상규	33(2)	일본	Japanese Society for the Study of Xenobiotics	SCI	2018.04	10.1016/j.dmpk.2017.12.006
20	Investigation of nonalcoholic fatty liver disease-induced drug metabolism by comparative global toxicoproteomics	Toxicol Appl Pharmacol	나안예, 조정제, 이상규	352	미국	New York, NY : Academic Press	SCI	2018.08	10.1016/j.taap.2018.05.021
21	Simultaneous quantification of 13 ginsenosides by LC-MS/MS and its	Mass Spectrometry Letter	조정제, 이상규	9(2)	대한민국	한국질량분석학회	비SCI	2018.06	10.5478/MSL.2018.9.2.41

	application in diverse ginseng extracts								
22	Revisiting the metabolism of loxoprofen: The role of Cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase in microsomal biotransformation	Pharmaceutics	리아쉐레샤, 이상규	19(3)	스위스	Basel, Switzerland : MDPI	SCI	2018.08	10.3390/pharmaceutics10030112
23	Effects of Red Ginseng Extract on the Pharmacokinetics and Elimination of Methotrexate via Mrp2 Regulation	molecules	이소원, 송임숙	23(2948)	스위스	Basel, Switzerland : MDPI	SCI	2018.11	doi:10.3390/molecules23112948
24	Tolerability and pharmacokinetics of ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, and compound K after single or multiple administration of red ginseng extract in human beings	Journal of Ginseng Research	최민구, 송임숙	online publish	대한민국	KSG	SCI	2018.10	https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.10.006

(3) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
	2016 응용약물학회 추계학술대회	한유진, 권미화, 송임숙	2016.10.07	숙명여자대학교	대한민국
1	Transporter-mediated herb-drug interaction of red ginseng and major ginsenosides Rg1, Re, F1, and protopanaxatriol				
	2016 AAPS annual meeting	권미화, 송임숙	2016.11.13-17	덴버	미국
2	Evaluation of Transporter-Mediated Herb-Drug Interaction Potential of Korean Red Ginseng Extract				
	2017 14 th EuroISSX	조정제, 쉬레샤리아, 조필정, 이태호, 이상규	2017.6.26-29	켈른	독일
3	TMT-based quantitative hepatic proteome profiling of rifampicin-induced liver injury in mice				
4	Isoliquiritigenin treatment ameliorates alcohol-induced steatohepatitis by activation of AMPK-SIRT1 pathway				
5	Metabolic alteration of hepatic proteins by age and calorie-restricted in rat liver				
6	Determination of bakuchicin in mouse plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics				
7	Investigation of osthenol-induced drug interaction on cytochrome P450 in human liver microsome				
	2017 ICEM-ACEM	조정제, 쉬레샤리아, 조필정, 이상규	2017.11.12-16	송도컨벤시아	대한민국
8	Development Of Lc-Ms/ms Method For Pharmacokinetic Study Of Bakuchicin In Mouse Plasma				
9	Prevention Effects Of Isoliquiritigenin Treatment On Alcohol-Induced Hepatic Fat Accumulation By Regulating The Sirt1-Ampk Pathway				
10	In Vitro Inhibition Of Human Cytochrome P450 By Osthenol.				
11	Lysine Crotonylation In Zebrafish Embryos Is Abundant In Myofilament Proteins And Ribosomal Proteins				
	2017 응용생명화학학회 국제 학술대회	윤은영, 조정제, 김영성, 양은주, 송임숙, 류광현, 송경식, 이상규	2017.06.16	부산해운대	대한민국

12	Development of a simple method for preparing saponin-rich fraction from dried Panax ginseng roots				
	2017 응용약물학회 추계학술대회	김현아, 강윤주, 권미화, 송입숙	2017. 10. 13	서울대학교	대한민국
13	Herb-drug interaction of Korean red ginseng extract on the rifampin-induced hepatotoxicity				
14	Pharmacokinetics and Intestinal Permeability of Amaranth in Rats				
	2017 대한 약학회 추계학술대회	이소원, 백선아, 권미화, 송입숙	2017.10.19.-20	더케이호텔서울	대한민국
15	Pharmacokinetic and metabolic evaluation of five cocktail substrates consisting of caffeine, diclofenac, dextromethorphan, nifedipine and omeprazole In rats				
16	Effect of red ginseng extracts on the pharmacokinetics and elimination of methotrexate via Mrp2 regulation				
	2018 Experimental Biology	까오옌, 전주미	2018.04.21.-25	샌디에고	미국
17	Determination of 13 ginsenoside in diverse ginseng product by LC-MS/MS				
18	Investigation of selective induction of Korean red ginseng extract on cytochrome P450 2D and 3A				
19	Comparative proteomics of Zebrafish liver in 5 POPs mixture				
	2018 생명과학회 국제학술대회	송입숙, 전지현, 이소원	2018.08.09.-10	더케이호텔 경주	대한민국
20	In vitro and in vivo assessment of pharmacokinetic interactions by evaluating the effect of red ginseng on cytochrome P450 enzymes and OATP1B1 transporter				
21	Effect of Red Ginseng Extract on the Pharmacokinetics and Efficacy of Metformin in Streptozotocin-induced Diabetic Rats				
22	Effects of red ginseng extract on the pharmacokinetics and elimination of methotrexate via Mrp2 regulation				
	2018 대한약학회 국제학술대회	송입숙	2018.10.17.-19	제주 컨벤션센터	대한민국
23	Development and evaluation of reduced hygroscopic formulation of korean ginseng extract				

(4) 지식재산권(특허)

No	지식재산권 등 명칭 (진별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	신약 후보물질의 약물대사효소 활성 평가용 조성물 및 이를 이용한 약물대사효소 활성 평가 방법	대한민국	경북대학교 산학협력단	2017. 05.23	10-2017-00 63738				20%
2	신약 후보물질의 약물대사효소 활성 평가용 조성물 및 이를 이용한 약물대사효소 활성 평가 방법	PCT	경북대학교 산학협력단	2018.04.2 4	PCT-SAFE 3.51.080.25 6MT/FOP20 180101/0.20 .5.24				20%
3	약물대사 관련 효소 및 수 송체의 활성 평가용 조성물, 및 이를 이용한 평가 방법	대한민국	경북대학교 산학협력단	2018. 12.26	10-2018-01 68269				100%
4	UDP-글루쿠론산 전이효소 활성 저해제 및 이를 이용 한 UDP-글루쿠론산 전이효 소 활성 저해 효과 검증 방 법	대한민국	경북대학교 산학협력단	2019.03.1 2	10-2019-00 28254				50%

(5) 홍보자료 제작 및 연구성과 홍보

No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율
1	고려인삼-약물상호작용 가이드북 vol. 1	2018.08	경북대학교 산학협력단				100%
2	고려인삼-약물상호작용 가이드북 vol. 2	2018.11	경북대학교 산학협력단				100%

연구성과 홍보

1. 한국생명과학회 국제학술대회 홍보부스 운영, 2018.08.09.-10.



2. 대한생약학회 국제학술대회 홍보부스 운영, 2018.11.22.-23.



(6) 전문연구 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	석사졸업	2016		3			0	3				3		
2	박사졸업	2016	1				1		1			0		
3	석사졸업	2017		3			2	1				3		
4	석사졸업	2018		4			1	3				4		
5	박사졸업	2018	5				2	3				5		

2016 - 김서현, 남소정, 강윤주 / 김주현

2017 - 조정계, 김원철, 허재경

2018 - 리아, 전주미, 김민식, 한유진 / 권오광, 권미화, 손종철, 김보경, 김선주

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

(1) 최종 목표

최종성과목표	평가방법	달성도
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼과 의약품 상호작용 규명으로 고려인삼의 과학적 안전성을 확보하여 고려인삼의 효능 신뢰도 제고 및 수출 증대에 기여 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼에 체계적인 약물상호작용 연구로 과학적 근거를 확보를 통한 의약품 수준의 안전성 확보 소비자 안전을 위해 고려인삼의 약물복용에 대한 가이드라인 제시 및 정책 제안 in vivo에서 사이토크롬 P450 효소 활성도의 고속 평가를 위한 최소용량 각테일기술 개발 및 특허 등록 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼과 약물의 상호작용을 in vitro 대사효소/수송활성 저해 및 유도능 평가, 빈용약물에 대한 in vivo 실험동물 평가, 임상시험 2건 수행하여 안전성 및 상호작용 평가함 홍보를 위한 고려인삼-약물 상호작용 가이드북을 제작하고 학회 홍보부스를 2회 운영하여 연구성과를 홍보함 식약처 건강식품정책과에 인삼제품을 포함한 건강기능식품 상호작용 평가프로토콜을 제안함 상호작용을 각테일기반으로 고효율로 평가할 수 있는 in vitro, in vivo 평가법을 개발하고 이를 특허 및 PCT 출원함 (3건) 풍기인삼농협의 해외지사 10곳에 고려인삼-약물 상호작용 가이드북과 연구 논문을 홍보하여 제품수출 및 판매에 기여할 수 있도록 함 이상의 연구성과를 통하여 최종연구목표를 100% 달성함

(2) 연차별 연구목표 및 연구 결과

(가) 1차년도 (2016)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼제제 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 동결건조물 제조 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼제제 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 동결건조물 제조 고려인삼 지표성분인 15종 ginsenoside 분석법 개발 및 함량 	<ul style="list-style-type: none"> 풍기인삼농협으로부터 고려인삼 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 원료를 제공받아 동결건조물을 가공하였으며, 모든 연구팀에서 동일한 시료를 제공하여 연구수행 고려인삼 제제 중 15종 ginsenoside 함량 분석

	분석	<ul style="list-style-type: none"> Ginsenoside 15종 (Rb1, Rb2, Rg1, Rg3, Rc, Rh1, Rh2, Rd, Rf, Re, F1, F2, K)을 대사효소 및 수송체 저해실험에 제공함
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 1상대사효소 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼제제의 1상대사효소 억제능 평가 인삼의 활성물질 5종 (Rb1, Rg1, Rg3, Rd, compound K)의 1상대사효소 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)은 7종의 CYP 활성의 유의적 억제능은 관찰되지 않았음 ginsenoside 5종은 7종의 CYP에 대해 약한 억제현상을 나타내었음
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 2상대사효소 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼제제의 2상대사효소 억제능 평가 인삼의 활성물질 5종의 2상대사효소 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)은 6종의 UGT 활성의 유의적 억제능은 관찰되지 않았음 ginsenoside 5종은 6종의 UGT 활성 약한 억제현상을 나타내었음
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 약물수송체 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼제제의 약물수송체 억제능 평가 인삼의 활성물질 5종의 약물수송체 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 6종 약물수송체에 대한 유의적 억제능은 관찰되지 않았음 ginsenoside 5종은 6종의 약물수송체 활성에 대해 약한 억제현상을 나타내었음
<ul style="list-style-type: none"> 홍삼 추출물 1상/2상대사효소/수송체 유도능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼 추출물 1상/2상대사효소/수송체 유도능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> CYP3A4 mRNA 발현이 58~38%까지 감소하였으므로 고용량에서 CYP3A4 억제에 의한 약물상호작용 유발 가능성이 있을 것으로 예측됨 이외의 1상 대사효소, 2상 대사효소, 수송체에는 유도능이 나타나지 않음

(나) 2차년도 (2017)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> 백삼추출물 분리정제 	<ul style="list-style-type: none"> 백삼으로부터 고사포닌함량 분획 제조 추출물 중 총 사포닌 함량 및 ginsenoside 	<ul style="list-style-type: none"> 풍기인삼농협협동조합으로부터 건조된 세절 백삼원료를 제공받아 에탄올 침전을 이용하여 고사포닌함량 분획을 얻었으며, 이를 동결건조함 백삼추출물 중 총 사포닌 함량은 53 mg/g

	<ul style="list-style-type: none"> 합량 분석법 확립 백삼추출물의 뇌세포 보호활성 측정 	<p>포함됨</p> <ul style="list-style-type: none"> 백삼추출물 중 ginsenoside 15종의 합량 분석하였으며, 총 ginsenosides의 합량은 6.4 mg/g임 백삼 추출물은 glutamate로 유도한 뇌세포 독성을 현저히 감소시킴
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 대사효소 억제능 평가 (human, in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> 인삼의 활성물질 추가 9종 (Ginsenoside Rb2, Rc, Re, Rf, Rh1, Fl, F2, panaxadiol, panaxatriol)의 1상 대사효소 (CYPs) 억제능 평가 인삼의 활성물질 추가 10종의 2상 대사효소 (UGTs) 억제능 평가 10종 P450 동효소 활성 고속 평가기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> Rb1이 CYP2C9에 유의적인 억제능을 보임 F2가 CYP2B6에 대해 강한 억제능을 나타냄 compound K는 CYP2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4에 미약한 억제능을 나타냄 Rb1을 포함한 6종 진세노사이드는 UGT1A9에 대하여 저해능을 나타냄 Rg3는 UGT1A3, UGT1A9 및 UGT2B7에 대해서 저해능을 나타냄 Compound K의 경우는 UGT1A3에 대해서만 약한 저해능을 나타냄 Rg1은 UGT1A4에 대하여 저해능을 나타냄 10종 P450 기질 콕테일 조합 및 LC-MS/MS 분석법 개발
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 약물수송체 억제능 평가 (human, in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> 인삼의 활성물질 추가 9종의 수송체 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> Rb1, Rd, Rg3, compound K는 OATP1B1, OATP1B3에 약한 저해성을 보임 Rb2, Rd, Rf는 OATP1B3에 강한 저해성은 panaxatriol은 OAT3, OATP1B1, OATP1B3에 약한 저해성은 보임
<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 및 활성성분의 1상/2상대사효소/수송체 유도능 평가 human, in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> 백삼 추출물 1상/2상대사효소/수송체 유도능 평가 Ginsenoside Rb1의 1상/2상대사효소 유도능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 백삼 추출물은 1상/2상대사효소/수송체의 발현을 변화시키지 않음 Rb1은 1상/2상대사효소/수송체의 발현을 변화시키지 않았으므로 약물상호작용 가능성이 낮은 것으로 예측됨
<ul style="list-style-type: none"> 홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 및 수송체에 미치는 영향을 평가하여 	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼과 in vivo cocktail 약물과의 약동학적 상호작용 및 안전성 평가 임상시험 후 	<ul style="list-style-type: none"> 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립 - In vivo cocktail (midazolam 2mg (CYP3A), dextromethorphan 30mg (CYP2D6), caffeine 100mg (CYP1A2), losartan 50mg (CYP2C9), omeprazole 20mg

<p>약동학적 상호작용을 확인하기 위한 1상 임상시험 수행 (human, in vivo)</p>	<p>혈장시료에서 투여 약물 및 ginsenoside 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> 임상시험 결과보고서 작성 	<p>(CYP2C19), pitavastatin 2mg (OATP1B1) 적용한 open-label, three-period, single-sequence design의 임상시험 진행</p> <ul style="list-style-type: none"> 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 대상자 모집 및 스크리닝 검사 시행 임상시험 진행 및 임상시료(혈장, 뇨) 확보 단백질 침전법을 이용한 11종 약물 및 ginsenosides 분석법 개발 및 검증 LC-MS/MS 분석조건 최적화 및 인체 혈장 시료중 ginsenoside 농도 분석 완료
<ul style="list-style-type: none"> 수삼, 백삼, 홍삼 추출물의 약물대사 활성 및 수송 활성 저해성에 대한 in vivo PK평가 (mouse/rat, in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> In vivo Cocktail substrate 활용한 약물상호작용 평가 시스템 개발 수삼, 홍삼, 백삼 추출물의 약동학 특성 평가 홍삼의 단회 및 반복투여 후 ginsenoside 약동학 평가 홍삼 추출물을 단회/2주/4주 반복투여 후 5가지 cocktail 기질 투여를 통한 약물상호작용 평가 홍삼 추출물을 in vivo에서의 1상대사효소/2상대사효소/수송체 유도능 평가 Methotrexate와 홍삼의 약동학적 상호작용 평가 nifedipine과 홍삼의 약동학적 상호작용 	<ul style="list-style-type: none"> 약물상호작용 평가를 위한 5종 CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A)에 대한 cocktail 개발 수삼, 홍삼, 백삼 추출물 중 ginsenoside 함량 분석 수삼, 홍삼, 백삼 추출물 1g/kg용량으로 경구투여 후 ginsenoside는 혈장시료에서는 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 4종 ginsenoside만 검출됨 추출물 중 ginsenoside의 함량이 높은 백삼 추출물과 홍삼추출물에서는 모두 유의적으로 높은 농도의 Rb1, Rb2, Rc Rd 가 검출됨 홍삼 0.7g/kg로 단회, 1주, 2주간 반복투여 후 ginsenoside의 혈 중 농도는 단회투여에 비하여 반복투여시 증가함을 확인할 수 있었고, 1주 반복투여와 2주 반복투여의 경우에는 유의적인 차이가 없었으므로, 1주 반복투여 후 정상상태에 도달해있음 5가지 CYP기질 약물과의 상호작용 동시평가 홍삼 단회투여시 CYP기질 약물과의상호작용 관찰 안됨 홍삼 2주, 4주반복 투여시 CYP3A의 활성유도로 기질약물의 대사율이 증가됨이

	평가	<p>확인됨</p> <ul style="list-style-type: none"> • 홍삼 추출물을 반복투여 후 mRNA와 단백질의 발현변화를 확인하였을 때 Mrp2의 발현이 유의적으로 감소함 • methotraxate의 혈중 농도는 대조군에 비하여 1주 반복투여군에서 유의적인 차이는 없었으나 소실속도가 감소하여 혈중 농도가 증가하는 경향을 보임. 담즙배설은 유의적으로 감소함 • nifedipine의 혈중 농도는 대조군에 비하여 1주 반복투여군에서 유의적으로 감소하였으며, 대사체의 생성은 유의적으로 증가
<ul style="list-style-type: none"> • in vivo 질환모델에서 홍삼 추출물과 약물과의 상호작용 평가 (mouse/rat, in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> • Streptozotocin 유도 당뇨병 모델에서 metformin과 홍삼추출물과의 상호작용 평가 • MCD-diet를 통한 지방간 모델에서의 홍삼 추출물과 CYP 기질 약물과의 상호작용 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • Streptozotocine 유도 당뇨병 모델에서 metformin과 홍삼추출물과의 약동학적 상호작용은 관찰되지 않음 • 당뇨병쥐에서 metformin과 홍삼추출물 2 g/kg를 한달간 투여하면 fasting glucose level이 유의적으로 감소하며 이는 홍삼과 metformin의 상가작용이 있는 것으로 확인됨 • MCD-diet 모델에서 CYP활성 감소에 따른 약물상호작용 관찰 • 홍삼추출물의 4주 반복 투여를 통해 CYP활성이 회복되어 약물상호작용 경감됨을 확인함
<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼의 간세포 활성화조절 기전에 대한 프로테오믹스 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 홍삼 추출물을 4주간 반복투여 후 간세포내 단백질 변화 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 홍삼 추출물을 4주간 투여 후 간조직내 단백질 변화의 comparative proteomics 분석 수행

(다) 3차년도 (2018)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
<ul style="list-style-type: none"> • 임상시험 후 ginsenoside의 	<ul style="list-style-type: none"> • Ginsenosides 분석법 validation 	<ul style="list-style-type: none"> • 혈장 시료 중 ginsenoside 분석 (정량가능한 ginsenoside 확인한 결과, 혈장시료에서는 Rb1, Rb2,

<p>혈중 농도 분석 및 약동학 특성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 임상시료 중 ginsenosides 분석 • Ginsenosides 약동학 특성 평가 • 약동학 특성 기전확인을 위한 위장관 투과도 평가 	<p>Rc, Rd, compound K의 5종 ginsenoside만 검출됨)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 사람 혈장 중 5종 ginsenoside 분석법 validation한 결과 재현성있고 감도가 좋은 ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, and compound K 분석법을 확립하였음. • Ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd는 반감기가 길고 반복투여에 의해 측정되는 현상을 보이지만 compound K는 축적현상이 없이 단회와 2주 반복 투여시 유사한 혈중 농도를 나타냄 • Rg3를 제외한 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K의 투과도는 큰 차이가 없었으나, Rg3와 Rh1은 efflux ratio가 크므로 흡수의 저해현상이 있어 혈중 농도가 낮을 수 있음을 확인함.
<ul style="list-style-type: none"> • 홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 홍삼의 단회 및 반복투여시 다빈도 처방의약품의 약동학적 상호작용 평가 • 질환모델에서 홍삼의 단회 또는 병용투여시 약동학적 상호작용 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 정상군에서 홍삼-메포민 상호작용: 홍삼반복투여는 중요 수송체인 Oct1의 발현을 변화시켜 반복투여시 메포민의 소실반감기가 감소하고 혈중 농도가 증가함. 또한 24시간까지의 총 배설량도 증가함. 그러나 이러한 변화는 20% 내외로 임상적으로 유의한 변화는 아닌 것으로 판단됨. • 당뇨병 질환군에서의 홍삼-메포민 상호작용: 홍삼과 메포민의 약동학적 상호작용은 나타나지 않았으나 공복후 혈당농도는 메포민 단독투여군 또는 홍삼 단독투여군에 비하여 메포민과 홍삼을 동시에 투여한 군에서 유의적으로 낮은 값을 보임 • 홍삼-warfarin 상호작용: 홍삼과 와파린을 병용투여했을 경우 와파린의 혈중농도에는 유의적인 변화가 없음. 또한 대사체의 혈중 농도에도 유의적인 변화가 없음 • 홍삼-고혈압치료제 상호작용: amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제는 amlodipine의 흡수가 느려지지만 유의미한 상호작용 없음. 니페디핀과는 유의미한 상호작용 없으나 위장관 대사효소의 감소로 대사체 생성이 감소함. Valsartan, furosemide와는 유의한 상호작용 없음. furosemide와 홍삼단회투여시 furosemide의 흡수가 증가하여 혈중 농도가 증가함. • 홍삼-메토트렉세이트 상호작용: 복투여할 경우

		<p>methotrexate의 소실이 감소하여 체내에 축적되므로 혈중농도가 유의적으로 증가할 수 있고, 이에 따라 약효의 변화를 유도할 수 있으므로 주의가 필요</p> <ul style="list-style-type: none"> • 백삼-monoamine oxidase (MOA) 상호작용: 혈중농도는 대조군에서의 혈중농도에 비하여 감소하였으며, 반감기와 Tmax의 변화 없이 Cmax와 AUC가 감소하였다. • 홍삼-NSAID계 진통제 상호작용: sulfasalazine의 혈중농도는 임상적으로 유의미한 정도는 아니지만 Tmax와 MRT의 변화가 없이 Cmax와 AUC가 1주 반복투여군에서 유의적으로 증가하였음. 디클로페낙과 대사체인 hydroxydiclofenac의 혈중농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이가 없음. • 홍삼-omeprazole 상호작용: 오메프라졸과 대사체인 hydroxy omeprazole의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이 없음. • 홍삼-dextromethorphan 상호작용: 텍스트로메토르판과 대사체인 텍스트로판의 혈중농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이 없음 • 홍삼-digoxin 상호작용: 디곡신의 혈중 농도는 대조군에 비하여 단회 또는 1주 반복투여군과 유의적인 차이 없음. 간질환군에서 홍삼-실리마린의 상호작용: 홍삼의 투여는 실리마린의 약동학 특성에 상호작용을 유도하지 않음을 확인할 있었고, 간독성 지표인 ALT, AST의 감소는 실리마린과 홍삼의 상호작용에 의한 것이 아님.
<ul style="list-style-type: none"> • 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 in vivo 동물용 각테일 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가용 in vivo rat dual 각테일 개발 • 대사효소 상호작용 평가를 위한 in vivo mouse 각테일 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 최소용량의 카페인, 디클로페낙, 텍스트로메톨판, 니페디핀, 오메프라졸, 디곡신, 퓨로세마이드, 메포민, 메토티렉세이트 및 발사탄으로 이루어진 탐침약물을 랫드에 동시투여하여 5종의 사이토크롬 P450 동종효소와 5종의 약물수송 단백질의 활성을 동시에 고속으로 측정할 수 있는 각테일 개발. 현재 국내특허로 출원되었음 (10-2018-0168269). • 5종의 CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A) 활성 동시평가법 개발

<ul style="list-style-type: none"> • 대사효소 및 약물수송체 유도능에 대한 in vivo rat PK 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물) 약물수송체 억제능 평가 • 인삼의 활성물질 5종의 약물수송체 억제능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 홍삼 추출물의 단회 동시투여에 의한 약물상호작용 평가시 유의적인 상호작용은 나타나지 않음 • 홍삼 추출물의 2/4주 반복투여에 따른 약물상호작용 평가시 CYP3A의 대사율이 증가되는 반면에 CYP2D의 대사율은 저해됨이 관찰됨. 단백질과 mRNA 수준에서 CYP3A효소의 유도능은 관찰되지 않음 MCD-diet로 유도한 지방간 모델에서 홍삼추출물의 약물상호작용 평가시 감소된 CYP활성 회복되어, 기질 약물들의 약물동력학 지표가 개선됨을 확인함
<ul style="list-style-type: none"> • 다빈도 병용투여 의약품인 metformin과 고려인삼 상호작용 평가를 위한 임상시험 진행 	<ul style="list-style-type: none"> • 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 • 식품의약품안전처 임상시험계획승인(IND) 신청 및 승인 • 대상자 모집 및 스크리닝 38명 진행 • 임상시험 진행 및 시료(혈장) 확보 • 약동·약력학 분석 및 약물상호작용과 안전성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립 • 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 • 고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품 제품과 용량 선정 • 공개, 무작위배정, 2-시기, 1-순서군 디자인 확립 • 대상자 모집과 임상시험 완료 • 혈장 시료 확보 및 주관기관에 배송 • 혈중 약물농도 결과 전달받아 약동학 분석 시행 • 경구당부하 검사 결과 기반 약력학 분석 시행 • paired t-test, ANOVA 등 통계분석 시행 • 측정된 약물농도를 이용하여 약동학 분석 수행 후 주요 약동학 파라미터 AUC와 C_{max} 산출 • 경구당부하 검사를 수행하여 glucose의 AUC와 C_{max} 산출 • 고려인삼과 metformin 병용투여 시와 metformin 단독투여 시 약동학 파라미터의 변화를 통계적으로 확인하여 약동·약력학적 상호작용 평가
<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품인 metformin 안전성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 자·타각 증상 등 이상반응 발생 여부, 정도 및 빈도 비교·평가 • 신체검진, 활력징후, 12-lead 심전도, 임상실험실검사, 병용약물 복용 여부 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 연구 전 기간에 걸쳐 대상자의 상태(증상 및 징후)를 수시로 관찰 • 활력징후 중 혈압과 맥박수는 매 시기 첫 투여 전과 병용투여 시작 전, 매 시기 마지막 반복투여 전(0h)와 투약 후 4h, 24h에 측정 • 체온은 매 시기 첫 투여 전, 병용투여 시작 전과 2기 마지막 반복투여 전(0h), 2, 4, 6, 8, 12, 24h에 측정 • 심전도 검사는 스크리닝과 제 2기 퇴원 후 측정하여 평가

		<ul style="list-style-type: none"> • 임상실험실검사는 매 시기 퇴원 전에 AST, ALT, BUN, 혈액응고검사를 시행
<ul style="list-style-type: none"> • 고용량 고려인삼의 아만성 투여 후 안전성 평가를 위한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 고용량의 홍삼의 아만성 투여로 인한 안전성 평가 • 프로테오믹스 기반 간독성 기전 연구 • Cystathionine beta-synthase 매개 H₂S에 따른 간독성 기전 규명 	<ul style="list-style-type: none"> • 고용량 홍삼추출물 투여로 발생한 간독성의 기전을 탐색하기 위해 4주 투여 후 확보한 간시료에 TMT-labeling을 통한 정량적 프로테오믹 분석 실시 • 고용량의 홍삼 추출물의 아만성 투여로 인해 간독성이 발생하고, 그 기전이 CBS의 유도로 인한 H₂S가 증가하고, H₂S에 의해 증가된 ROS로 인한 염증반응 및 pAMPK감소로 인한 당신생반응의 증가로 고혈당이 유발됨을 제시함 • 따라서 권장복용량을 상회하는 용량으로 장기간 복용시 기대되는 약리작용이외의 독성반응을 야기할 수 있으므로, 정해진 권장복용량을 지킬 수 있도록 환자에 대한 복약지도가 요구됨을 확인함
<ul style="list-style-type: none"> • 홍삼추출물의 신규 활성을 탐색하기 위한 국제 공동연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 홍삼추출물 및 ginsenoside의 전립선암세포의 migration 및 invasion 저해능평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 전립선암인 PC-3, LNCap 세포에 KRG 추출물 0.1 - 500 ug/ml 용량으로 처리하였을 때 migration 변화에 유의적인 변화를 관찰하지 못함 • Invasion 평가에서도 홍삼추출물에 의한 저해효과는 나타나지 않았음

3-2. 목표 달성여부

(1) 세부목표 및 달성도

세부 연구 목표 (연구계획서의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 1상/2상 대사효소/수송체 저해성 및 유도능 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)에 대한 평가 1상대사효소 8종, 2상대사효소 6종, 약물수송체 8종에 대한 저해성 평가 인간간세포에서 홍삼과 백삼에 대한 대사효소/수송체 13종에 대한 유도능 평가
고려인삼의 유효 성분인 ginsenosides의 1상/2상 대사효소/수송체 저해성 및 유도능 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> Ginsenosides 14종 (Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K, Rg1, Rg3, Re, Rf, Rh1, F1, F2, panaxadiol, panaxatriol)에 대한 평가 1상대사효소 8종, 2상대사효소 6종, 약물수송체 8종에 대한 저해성 평가 인간간세포에서 Rb1에 대한 대사효소/수송체 13종에 대한 유도능 평가
홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 및 수송체에 대한 상호작용을 확인하기 위한 1상 임상시험 수행	20	100	<ul style="list-style-type: none"> In vivo cocktail (midazolam 2mg (CYP3A), dextromethorphan 30mg (CYP2D6), caffeine 100mg (CYP1A2), losartan 50mg (CYP2C9), omeprazole 20mg (CYP2C19), pitavastatin 2mg (OATP1B1)) 적용한 open-label, three-period, single-sequence design의 임상시험 진행 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 식품의약품안전처 임상시험계획승인(IND) 신청 및 승인
사람 혈장 중 ginsenoside의 농도 분석 및 약동학 특성 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> Ginsenosides 분석법 validation 임상시료 중 ginsenosides 분석 Ginsenosides 약동학 특성 평가 약동학 특성 기전확인을 위한 위장관 투과도 평가
대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 in vitro	10	100	<ul style="list-style-type: none"> In vitro에서의 고려인삼 제제 및 진세노사

/in vivo 동물용 각테일 개발			<p>이드의 약물상호작용 고속 평가를 위한 각테일 기반의 1상 약물대사효소 활성 고속 평가기술 개발기질 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가용 in vivo rat dual 각테일 개발 • 대사효소 상호작용 평가를 위한 in vivo mouse 각테일 개발
홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가	20	100	<ul style="list-style-type: none"> • 다빈도 처방의약품 중 당뇨병치료제 (메포민), warfarin, 고혈압치료제 (amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제, valsartan, furosemide), 메토트렉세이트, monoamine oxidase (MOA, selegiline), NSAID계 진통제 (sulfasalazine, 디클로페낙), omeprazole, dextromethorphan, digoxin, 실리마린의 상호작용을 평가함 • 당뇨병질환군, 간질환군, MCD-diet로 유도한 지방간 모델에서 홍삼의 약효 또는 홍삼과 치료약물 (메포민, 실리마린) 또는 대사활성 탐침약물과의 상호작용을 평가함
고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품인 metformin의 상호작용 및 안전성 평가 (임상시험 수행)	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립 • 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 • 고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품 제품과 용량 선정 • 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 • 식품의약품안전처 임상시험계획승인(IND) 신청 및 승인
고용량 고려인삼의 아만성 투여 후 안전성 평가를 위한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 고용량의 홍삼의 아만성 투여로 인한 안전성 평가 • 프로테오믹스 기반 간독성 기전 연구 • Cystathionine beta-synthase 매개 H₂S에 따른 간독성 기전 규명
합계	100점		

(2) 성과지표에 대한 달성도

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
1차년도	목표	0	0									1	0	2	0	3	0	0	
	실적	0	0									1	4	2	0	4	0	0	
2차년도	목표	1	0									4	2	3	0	3	0	0	
	실적	1	0									4	4	14	0	3	0	0	
3차년도	목표	1	0									5	2	5	0	4	1	1	
	실적	3	0									10	1	7	0	9	1	2	
소계	목표	2	0									10	4	10	0	10	1	1	
	실적	4	0									15	9	23	0	16	1	2	

성과지표 목표	자 체 평 가
SCI논문 10편, 비SCI논문 4편	고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구결과를 SCI논문 15편과 비SCI논문 9편을 게재하였으므로 성과 목표를 초과달성함
특허등록(출원) 2건	in vitro/ in vivo 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 각테일기반의 평가기술 개발 결과를 3건의 특허와 1건의 PCT 출원함
인력양성 10명	고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구인력으로 석사급 10명과 박사급 6명, 총 16명을 배출하였으므로 성과목표를 초과달성함
학술발표 10개 포스터 발표	고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구결과를 2016년 응용약물학회 추계 국제학술대회와 미국 약학회에 2건 발표, 2017년 응용생명화학회 (1건), 응용약물학회 (1건), 대한 약학회 (3건) 및 17차 유럽 ISSX학회 (5건), 2017

	ICEM-ACEM (4건), 2018년 Experimental Biology (3건), 2018 생명과학회 국제학술대회 (3건), 대한약학회 (1건) 등의 10개 국내 및 국제학회에 총 23건 발표하였으므로 성과 목표를 초과달성함
정책 제안 1건	홍삼추출물 등 건강기능식품의 약물상호작용 평가 프로토콜로 3개의 프로토콜을 식품의약품안전처 건강기능식품정책과에 제안하였음
홍보전시 1건	고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구결과를 한국생명과학회 국제학술대회 (2018.08.09.-10.)와 대한생약학회 국제학술대회 (2018.11.22.-23.) 홍보부스 전시를 통하여 홍보하였으므로 성과목표를 초과달성함

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

4. 연구결과의 활용 계획 등

본 연구결과의 홍보이외에도 본 연구를 통하여 확립된 기반기술인 각테일기반의 in vitro 약물대사/수송의 저해성 및 유도능 평가, 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가용 in vivo rat dual 각테일 개발, 대사효소 상호작용 평가를 위한 in vivo mouse 각테일 개발, 홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 및 수송체에 미치는 영향을 평가하여 약동학적 상호작용을 확인하기 위한 1상 임상시험 프로토콜은 다른 인삼제품 및 건강기능 식품의 안전성 평가를 위해 유용하게 활용될 수 있으므로, 이에 대한 홍보과 연구진행을 병행할 필요가 있음.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 고려인삼이 약물상호작용에 미치는 영향 연구				
	(영문) Herb-Drug Interaction Studies on Korean Ginseng				
주관연구기관	경북대학교 산학협력단		주 관 연 구	(소속) 경북대학교 산학협력단	
참 여 기 업			책 임 자	(성명) 송 임 숙	
총연구개발비 (1,330,000 천원)	계	1,330,000천원	총 연 구 기 간	2016.05.19.~2018.12.31.(2년7월)	
	정부출연 연구개발비	1,330,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	39
	기업부담금	0		내부인원	8
	연구기관부담금	0		외부인원	31
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> 고려인삼과 의약품 상호작용 규명으로 고려인삼의 과학적 안전성을 확보하여 고려인삼의 효능 신뢰도 제고 및 수출 증대에 기여하고자 함 <ul style="list-style-type: none"> in vitro/ in vivo 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 각테일기반의 평가기술 개발 결과를 2건의 특허와 1건의 PCT 출원함 고려인삼의 안정성 및 우수성을 강조하기위한 상호작용 연구결과의 국제학술지 및 학회 발표 (국제 SCI급 논문 15편, KSCI급 논문 9편, 학회발표 23건) 소비자 안전을 위해 고려인삼의 약물복용에 대한 홍보자료로 고려인삼-약물상호작용 가이드북 제작 (2회) 및 정책 제안 (3개 프로토콜 1건), 학술대회 홍보부스 운영을 통한 연구성과 홍보 (2건) <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> 고려인삼의 미국(US FDA), 유럽(EMEA), 및 한국(KFDA)의 가이드라인에 따른 약물 상호작용 연구 수행 <ul style="list-style-type: none"> 고려인삼제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼추출물) 및 활성성분 14종 (ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, F2, compound K, Rg1, Rg3, Rf, Re, Rh1, Fl, panaxadiol, panaxatriol)의 1상 대사효소 (7종; CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A), 2상 대사효소 (6종; UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7) 및 약물수송체 (8종; OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp, BCRP) 억제능 평가 고려인삼 추출물 (백삼, 홍삼추출물) 및 ginsenoside Rb1의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능 평가 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 in vitro /in vivo 동물용 각테일 개발 <ul style="list-style-type: none"> In vitro에서의 고려인삼 제제 및 진세노사이드의 약물상호작용 고속 평가를 위한 각테일 기반의 1상 약물대사효소 활성 고속 평가기술 개발 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가용 in vivo rat dual 각테일 개발 					

- 대사효소 상호작용 평가를 위한 in vivo mouse 각테일 개발
- 고려인삼제제의 약물대사 및 수송체 상호작용에 대한 in vivo PK 평가 및 홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가
 - 홍삼 추출물의 단회 동시투여에 의한 약물상호작용 평가시 유의적인 상호작용은 나타나지 않음
 - 홍삼 추출물의 4주 반복투여에 따른 약물상호작용 평가시 CYP3A의 대사율이 증가되는 반면에 CYP2D의 대사율은 저해됨이 관찰됨.
 - 다빈도 처방의약품 중 당뇨병치료제 (메포민), warfarin, 고혈압치료제 (amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제, valsartan, furosemide), 메토티렉세이트, monoamine oxidase (MOA, selegiline), NSAID계 진통제 (sulfasalazine, 디클로페낙), omeprazole, dextromethorphan, digoxin, 실리마린의 약동학적 상호작용을 평가한 결과 신중한 투여가 요구되는 약물이 있지만 임상적으로 유의적인 상호작용은 없음
 - 당뇨병질환군, 간질환군, MCD-diet로 유도한 지방간 모델에서 홍삼의 약효 또는 홍삼과 치료약물 (메포민, 실리마린) 또는 대사활성 탐침약물과의 상호작용을 평가함
 - 사람 혈장 중 ginsenoside의 농도 분석 및 약동학 특성 평가, 약동학 특성 기전확인을 위한 위장관 투과도 평가
- 임상 1상시험을 통해 사람에서 약물상호작용이 없는 안전용량 규명
 - 홍삼추출물 제제 (dried ginseng >60%; 85.1 mg/day as sum of Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg3, and Rh1)의 2주 반복투여는 혈압, ALT, AST, 체온 등의 변화 없이 복용함
 - 홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A) 및 수송체 (OATP1B1)의 활성에 임상적으로 유의한 상호작용을 나타내지 않음
 - 다빈도 병용투여 의약품인 metformin의 상호작용 및 안전성 평가결과 홍삼추출물 제제의 2주 반복투여는 metformin의 약동학 및 약효에 유의한 상호작용을 나타내지 않음
- 고려인삼과 약물복용에 대한 가이드라인 설정 및 안전관리 체계 마련
 - 소비자 안전을 위해 고려인삼에서 유래한 건강기능식품의 약물상호작용 위험도 표시
 - 지표물질 함량 또는 복용량에 따른 상호작용 가능성의 등급화
 - 다량의 건강기능식품의 약물상호작용 평가를 위한 고효율평가 시스템 제안
- 고려인삼의 수출증대를 위한 약물상호작용 및 안전성에 대한 홍보
 - 고려인삼-약물상호작용 가이드북 제작 (2회)
 - 학술대회 홍보부스 운영을 통한 연구성과 홍보 (2건)
 - 풍기인삼농협 해외영업소 및 해외전시실에 논문 및 가이드북 전시 (9개국 11개소)
- 연구성과 활용실적 및 계획
 - 고려인삼-의약품 상호작용 결과 중 주요 사항은 인삼가공품의 표시기재부에 기재하여 의약품과의 복용시 상호작용에 대한 정보를 쉽게 얻을 수 있도록 함
 - 국내 홍보자료 제작 및 배포를 통한 내수 증대
 - 고려인삼과 약물복용에 대한 가이드라인 및 정책 제안
 - 소비자 안전을 위해 고려인삼 유래한 건강기능식품의 약물상호작용 위험도 표시

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	316017-03		
사업구분	수출전략기술개발사업				
연구분야	약용작물		과제구분	단위	
사업명	수출전략기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	고려인삼이 약물상호작용에 미치는 영향연구		과제유형	(기초, 응용, 개발)	
연구기관	경북대학교 산학협력단		연구책임자	송임숙	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.05.19.-2016.1 2.31	330,000	0	330,000
	2차연도	2017.01.01.-2017.1 2.31	500,000	0	500,000
	3차연도	2018.01.01.-2018.1 2.31	500,000	0	500,000
	4차연도				
	5차연도				
	계		1,330,000	0	1,330,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018.12

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경북대학교 산학협력단	부교수	송임숙

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	송임숙
----	-----

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구를 통하여 고려인삼을 포함한 건강기능식품의 상호작용을 평가할 수 있는 in vitro/in vivo 평가기술을 확립하고 이를 가장 대표적인 고려인삼제제인 홍삼추출물의 약물상호작용 평가에 적용하였음
- 홍삼과 다빈도 복용 의약품 15종 (메포민, warfarin, 고혈압치료제 (amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제, valsartan, furosemide), 메토트렉세이트, monoamine oxidase (selegiline), NSAID계 진통제 (sulfasalazine, 디클로페낙), omeprazole, dextromethorphan, digoxin, 실리마린의 약동학적 상호작용을 평가하였음
 - in vitro/ in vivo 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 각테일기반의 평가기술 개발 결과를 2건의 특허와 1건의 PCT 출원함
 - 고려인삼의 안정성 및 우수성을 강조하기위한 상호작용 연구결과의 국제학술지 및 학회 발표 (국제 SCI급 논문 15편, KSCI급 논문 9편, 학회발표 23건)
 - 소비자 안전을 위해 고려인삼의 약물복용에 대한 홍보자료로 고려인삼-약물상호작용 가이드북 제작 (2회) 및 정책 제안 (3개 프로토콜 1건), 학술대회 홍보부스 운영을 통한 연구성과 홍보 (2건)

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 고려인삼제제를 포함한 건강기능 식품에 범용할 수 있는 고속 1상/2상 효소 및 약물수송체 약물상호작용 평가 기술 개발
 - 건강기능식품의 가능성의 신속 정확 평가
 - 건강기능식품과 의약품 병용투여시 안전성에 대한 정보 확보를 통한 개별인정 및 수출 경쟁력 강화
- 인삼제제 특히 인삼과 약물상호작용 약물의 정보 확보
 - 고려인삼과 의약품 상호작용 규명으로 고려인삼의 과학적 안전성을 확보
 - 상호작용 결과를 국제학술지 및 학회 발표하여 연구결과의 신뢰도 제고 및 수출 증대에 기여

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 홍삼추출물을 이용한 상호작용 평가 프로토콜을 적용하여 홍삼 등 건강기능식품의 안전성 확보의 필요
 - 본 제안은 홍삼의 상호작용을 in vitro 인간유래 세포실험, in vivo 동물실험, 임상1상 시험에 관한 전주기적 프로토콜을 통하여 상호작용을 평가하는 프로토콜 제안서임
 - 홍삼추출물 이외의 인삼제품, 기타 건강기능식품에 모두 적용가능한 방법이므로 적용분야가 매우 광범위함
- 건강기능식품 안전성 및 기능성 식품 산업 활성화 및 수출 증대를 위한 인체적용시험 요구에 적합한 프로토콜 제안
 - 식약처 법규에 의하여 인체적용시험이 관리되고 있으나 인체적용시험 수행시마다 프로토콜을 작성하는 시간적, 인적 낭비를 줄여야 함
 - 미국 식약처 가이드라인에서 권고하는 바와 같아 인체 적용시험 전 in vitro 인간유래 세포실험, in vivo 동물실험을 수행하여 인체적용시험을 면제할 수 있는 자료로 활용 가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 고려인삼의 미국(US FDA), 유럽(EMEA), 및 한국(KFDA)의 가이드라인에 따른 약물 상호작용 연구 수행
 - 고려인삼제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼추출물) 및 활성성분 14종 (ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, F2, compound K, Rg1, Rg3, Rf, Re, Rh1, F1, panaxadiol, panaxatriol)의 1상 대사효소 (7종; CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A), 2상 대사효소 (6종; UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7) 및 약물수송체 (8종; OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp, BCRP) 억제능 평가, 고려인삼 추출물 (백삼, 홍삼추출물) 및 ginsenoside Rb1의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능 평가
 - 각테일 기반의 약물대사효소/수송체에 대한 홍삼추출물의 약물상호작용 평가에 대한 임상시험 수행함. 본 임상시험은 경북대학교 IRB 와 식약처 임상시험 승인을 받음
 - 다종의 인삼제제에 대한 광범위한 약물상호작용 평가를 매우 성실히 수행하고, 연구결과를 Journal of Ginseng research, Clinical therapeutics 등 논문에 게재함
- 홍삼과 다빈도 복용 의약품 15종 (메포민, warfarin, 고혈압치료제 (amlodipine, fimasartan,

hydrochlorothiazide 3제 복합제, valsartan, furosemide), 메토트렉세이트, monoamine oxidase (selegiline), NSAID계 진통제 (sulfasalazine, 디클로페낙), omeprazole, dextromethorphan, digoxin, 실리마린의 in vivo 약동학적 상호작용을 수행하였으며, 해당 연구결과를 Molecules, Pharmaceutics 등 논문에 게재함

- 고려인삼의 약물상호작용 평가기술 개발 및 이를 활용한 다양한 약물군에 대한 in vitro/ in vivo 상호작용을 매우 성실히 수행하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- in vitro/ in vivo 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 각테일기반의 평가기술 개발 결과를 2건의 특허와 1건의 PCT 출원함
 - 10-2017-0063738 , PCT-SAFE3.51.080.256MT/FOP20180101/0.20.5.24, 10-2018-0168269
- 고려인삼의 안정성 및 우수성을 강조하기위한 상호작용 연구결과의 국제학술지 및 학회 발표 (국제 SCI급 논문 15편, KSCI급 논문 9편, 학회발표 23건)
 - Journal of Ginseng Research, Clin Ther, Pharmaceutics, molecules, Toxicol Appl Pharmacol, Drug metabolism and Pharmacokinetics, IJMS 등 24편의 논문을 국제학술지에 게재함
- 고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구결과를 2016년 응용약물학회 추계 국제학술대회와 미국 약학회에 2건 발표, 2017년 응용생명화학회 (1건), 응용약물학회 (1건), 대한 약학회 (3건) 및 17차 유럽 ISSX학회 (5건), 2017 ICEM-ACEM (4건), 2018년 Experimental Biology (3건), 2018 생명과학회 국제학술대회 (3건), 대한약학회 (1건) 등의 10개 국내 및 국제학회에 총 23건 발표함
- 소비자 안전을 위해 고려인삼의 약물복용에 대한 홍보자료로 고려인삼-약물상호작용 가이드북 제작 (2회) 및 홍삼추출물 등 건강기능식품의 약물상호작용 평가 프로토콜로 3개의 프로토콜을 식품의약품안전처 건강기능식품정책과에 제안, 한국생명과학회 국제학술대회 (2018.08.09.-10.)와 대한생약학회 국제학술대회 (2018.11.22.-23.) 홍보부스 운영을 통한 연구성과 홍보 (2건)

II. 연구목표 달성도

세부 연구 목표 (연구계획서의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 1상/2상 대사효소/수송체 저해성 및 유도능 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)에 대한 평가 1상대사효소 8종, 2상대사효소 6종, 약물수송체 8종에 대한 저해성 평가 인간간세포에서 홍삼과 백삼에 대한 대사효소/수송체 13종에 대한 유도능 평가
고려인삼의 유효 성분인 ginsenosides의 1상/2상 대사효소/수송체 저해성 및 유도능 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> Ginsenosides 14종 (Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K, Rg1, Rg3, Re, Rf, Rh1, Fl, F2, panaxadiol, panaxatriol)에 대한 평가 1상대사효소 8종, 2상대사효소 6종, 약물수송체 8종에 대한 저해성 평가 인간간세포에서 Rb1에 대한 대사효소/수송체 13종에 대한 유도능 평가
홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 및 수송체에 대한 상호작용을 확인하기 위한 1상 임상시험 수행	20	100	<ul style="list-style-type: none"> In vivo cocktail (midazolam 2mg (CYP3A), dextromethorphan 30mg (CYP2D6), caffeine 100mg (CYP1A2), losartan 50mg (CYP2C9), omeprazole 20mg (CYP2C19), pitavastatin 2mg (OATP1B1)) 적용한 open-label, three-period, single-sequence design의 임상시험 진행 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 식품의약품안전처 임상시험계획승인(IND) 신청 및 승인
사람 혈장 중 ginsenoside의 농도 분석 및 약동학 특성 평가	10	100	<ul style="list-style-type: none"> Ginsenosides 분석법 validation 임상시료 중 ginsenosides 분석 Ginsenosides 약동학 특성 평가 약동학 특성 기전확인을 위한 위장관 투과도 평가
대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 in vitro /in vivo 동물용 각테일 개발	10	100	<ul style="list-style-type: none"> In vitro에서의 고려인삼 제제 및 진세노사이드의 약물상호작용 고속 평가를 위한 각테일 기반의 1상 약물대사효소 활성 고속

			<p>평가기술 개발기질 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가용 in vivo rat dual 콕테일 개발 • 대사효소 상호작용 평가를 위한 in vivo mouse 콕테일 개발
홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가	20	100	<ul style="list-style-type: none"> • 다빈도 처방의약품 중 당뇨병치료제 (메포민), warfarin, 고혈압치료제 (amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제, valsartan, furosemide), 메토트렉세이트, monoamine oxidase (MOA, selegiline), NSAID계 진통제 (sulfasalazine, 디클로페낙), omeprazole, dextromethorphan, digoxin, 실리마린의 상호작용을 평가함 • 당뇨병질환군, 간질환군, MCD-diet로 유도한 지방간 모델에서 홍삼의 약효 또는 홍삼과 치료약물 (메포민, 실리마린) 또는 대사활성 탐침약물과의 상호작용을 평가함
고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품인 metformin의 상호작용 및 안전성 평가 (임상시험 수행)	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립 • 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 • 고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품 제품과 용량 선정 • 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 • 식품의약품안전처 임상시험계획승인(IND) 신청 및 승인
고용량 고려인삼의 아만성 투여 후 안전성 평가를 위한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 고용량의 홍삼의 아만성 투여로 인한 안전성 평가 • 프로테오믹스 기반 간독성 기전 연구 • Cystathionine beta-synthase 매개 H₂S에 따른 간독성 기전 규명
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 짧은 연구기간 (2년 7개월)에도 불구하고 미국(US FDA), 유럽(EMA), 및 한국(KFDA)의 가이드라인에 따른 고려인삼제제 3종 (수삼, 백삼, 홍삼추출물) 및 활성성분 14종 (ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, F2, compound K, Rg1, Rg3, Rf, Re, Rh1, F1, panaxadiol, panaxatriol)의 1상 대사효소 (7종; CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A), 2상 대사효소 (6종; UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7) 및 약물수송체 (8종; OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp, BCRP) 억제능 평가, 고려인삼 추출물 (백삼, 홍삼추출물) 및 ginsenoside Rb1의 1상/2상 대사효소 및 약물수송체 유도능 평가하였고, 연구성과를 2건의 특허와 1건의 PCT 출원하였고, 고려인삼의 안정성 및 우수성을 강조하기위한 상호작용 연구결과의 국제학술지 및 학회 발표 함 (국제 SCI급 논문 15편, KSCI급 논문 9편, 학회발표 23건)
- 고려인삼의 약물복용에 대한 홍보자료로 고려인삼-약물상호작용 가이드북 제작 (2회) 및 홍삼추출물 등 건강기능식품의 약물상호작용 평가 프로토콜로 3개의 프로토콜을 식품의약품안전처 건강기능식품정책과에 제안하여 고려인삼 제제외에도 건강기능식품에 광범위하게 활용할 수 있는 프로토콜을 확립하였음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 연구 계획에 부합하여 고려인삼 제제 3종에 대한 in vitro 약물상호작용 평가, 2건의 임상시험 수행, 15종의 다빈도 병용투여 약물에 대한 in vivo 약물상호작용을 평가한 점
- 성과 목표의 초과 달성: 국제 SCI급 논문 15편, KSCI급 논문 9편, 학회발표 23건 및 특허 2건 및 PCT 출원, 연구성과 홍보 (2건)
- 2건의 MOU를 체결하고 홍삼의 안전성 평가를 위한 국제공동연구 수행한 점

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구를 통하여 확립한 약물대사/동태 평가 기술은 국내에서 제조된 홍삼추출물 이외의 인삼제품, 기타 건강기능식품에 모두 적용가능한 방법이므로 적용분야가 매우 광범위하고 이를 통하여 고려인삼제제 및 건강기능식품의 과학적 안전성을 확보하여 고려인삼의 효능 신뢰도 제고 및 수출 증대에 기여할 수 있을 것임.

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	약용작물분야
연구과제명	고려인삼이 약물상호작용에 미치는 영향연구		
주관연구기관	경북대학교 산학협력단	주관연구책임자	송 임 숙
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금 총연구개발비
	1,330,000	0	0 1,330,000
연구개발기간	2016.05.19.-2018.12.31		
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)		

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)의 1상/2상 대사효소/수송체 저해성 및 유도능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼 3종 (수삼, 백삼, 홍삼 추출물)에 대한 평가 • 1상대사효소 8종, 2상대사효소 6종, 약물수송체 8종에 대한 저해성 평가 • 인간간세포에서 홍삼과 백삼에 대한 대사효소/수송체 13종에 대한 유도능 평가
② 고려인삼의 유효 성분인 ginsenosides의 1상/2상 대사효소/수송체 저해성 및 유도능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • Ginsenosides 14종 (Rb1, Rb2, Rc, Rd, compound K, Rg1, Rg3, Re, Rf, Rh1, F1, F2, panaxadiol, panaxatriol)에 대한 평가 • 1상대사효소 8종, 2상대사효소 6종, 약물수송체 8종에 대한 저해성 평가 • 인간간세포에서 Rb1에 대한 대사효소/수송체 13종에 대한 유도능 평가
③ 홍삼의 단회 및 반복투여 시 CYP 약물대사효소 및 수송체에 대한 상호작용	<ul style="list-style-type: none"> • In vivo cocktail (midazolam 2mg (CYP3A), dextromethorphan 30mg (CYP2D6), caffeine 100mg (CYP1A2), losartan 50mg (CYP2C9),

<p>을 확인하기 위한 1상 임상 시험 수행</p>	<p>omeprazole 20mg (CYP2C19), pitavastatin 2mg (OATP1B1) 적용한 open-label, three-period, single-sequence design의 임상시험 진행</p> <ul style="list-style-type: none"> • 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 • 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 • 식품의약품안전처 임상시험계획승인(IND) 신청 및 승인
<p>④ 홍삼추출물과 다빈도 처방 의약품의 약물동력학적 상호작용 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 다빈도 처방의약품 중 당뇨병치료제 (메포민), warfarin, 고혈압치료제 (amlodipine, fimasartan, hydrochlorothiazide 3제 복합제, valsartan, furosemide), 메토티렉세이트, monoamine oxidase (MOA, selegiline), NSAID계 진통제 (sulfasalazine, 디클로페낙), omeprazole, dextromethorphan, digoxin, 실리마린의 상호작용을 평가함 • 당뇨병질환군, 간질환군, MCD-diet로 유도한 지방간 모델에서 홍삼의 약효 또는 홍삼과 치료약물 (메포민, 실리마린) 또는 대사활성 탐침약물과의 상호작용을 평가함
<p>⑤ 고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품인 metformin의 상호작용 및 안전성 평가 (임상시험 수행)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 문헌조사 및 임상시험 디자인 확립 • 연구계획서 및 증례기록서(CRF) 개발 • 고려인삼과 다빈도 병용투여 의약품 제품과 용량 선정 • 경북대병원 임상시험 심사위원회(IRB) 심의 및 승인 • 식품의약품안전처 임상시험계획승인(IND) 신청 및 승인
<p>⑥ 고용량 고려인삼의 아만성 투여 후 안전성 평가를 위한 프로테오믹스 기반의 국제공동 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 고용량의 홍삼의 아만성 투여로 인한 안전성 평가 • 프로테오믹스 기반 간독성 기전 연구 • Cystathionine beta-synthase 매개 H₂S에 따른 간독성 기전 규명
<p>⑦ SCI논문 10편, 비SCI논문 4편</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구결과를 SCI논문 15편과 비SCI논문 9편을 게재하였으므로 성과 목표를 초과달성함
<p>⑧ 특허등록 2건</p>	<ul style="list-style-type: none"> • in vitro/ in vivo 대사효소 및 약물수송체 상호작용 평가를 위한 각테일기반의 평가기술 개발 결과를 2건의 특허와 1건의 PCT 출원함
<p>⑨ 인력양성 10명</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구인력으로 석사급 10명과 박사급 6명, 총 16명을 배출하였으므로

	성과목표를 초과달성함
⑩ 학술발표 10개 포스터 발표	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구결과를 2016년 응용약물학회 추계 국제학술대회와 미국 약학회에 2건 발표, 2017년 응용생명화학회 (1건), 응용약물학회 (1건), 대한 약학회 (3건) 및 17차 유럽 ISSX학회 (5건), 2017 ICEM-ACEM (4건), 2018년 Experimental Biology (3건), 2018 생명과학회 국제학술대회 (3건), 대한약학회 (1건) 등의 10개 국내 및 국제학회에 총 23건 발표하였으므로 성과목표를 초과달성함
⑪ 정책 제안 1건	<ul style="list-style-type: none"> 홍삼추출물 등 건강기능식품의 약물상호작용 평가 프로토콜로 3개의 프로토콜을 식품의약품안전처 건강기능식품정책과에 제안하였음
⑫ 홍보전시 1건	<ul style="list-style-type: none"> 고려인삼 상호작용 평가 및 기반기술을 활용한 연구결과를 한국생명과학회 국제학술대회 (2018.08.09.-10.)와 대한생약학회 국제학술대회 (2018.11.22.-23.) 홍보부스 전시를 통하여 홍보하였으므로 성과목표를 초과 달성함

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		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	명	명	건	건		
가중치																			
최종목표	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	4	10	0	10	1	1		
연구기간내 달성실적	4										15	9	23	0	16	1	2		
달성율(%)	200										150	225	230		160	100	200		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	홍삼추출물 등 건강기능식품의 상호작용 평가를 위한 in vitro 약물대사/수송 저해성 및 유도능 평가 기술
②	홍삼추출물 등 건강기능식품의 상호작용 평가를 위한 in vivo 각테일 평가 기술
③	홍삼추출물 등 건강기능식품의 상호작용 평가를 위한 각테일 기반의 in vivo 임상시험 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		V			V	V				
②의 기술	V	V				V				
③의 기술					V					

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	홍삼추출물 등 건강기능식품을 타 약물과 동시 복용시 약물상호작용 평가를 위한 프로토콜로 활용가능
②의 기술	다빈도 병용투여 약물에 대한 in vivo 상호작용 가능성을 인체적용시험전에 실험동물에서 평가하기 위한 프로토콜로써 인체적용시험을 최소화하여 시간 및 비용 절감효과가 클 것으로 예상됨
③의 기술	프로토콜은 다수의 천연물 및 신약후보물질, 약물에 적용가능한 방법이며, 홍삼을 이용한 평가방법을 논문으로 출판하여 신뢰도를 확보하였음. 본 임상시험프로토콜을 건강기능식품의 상호작용 평가에 그대로 적용하여 임상프로토콜 개발시간 및 비용을 절감할 수 있음

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	10	4	10	0	10	1	1		
연구기간내 달성실적	4										15	9	23	0	16	1	2		
연구종료 후 성과창출 계획		4									2	2							

8. 연구결과 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함): 해당없음

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

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

<뒷면지>

주 의

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