

최 종 보 고 서

발간등록번호

11-154300-000646-01

오가피 및 문주란 추출물 복합제를 이용한 발모제 개발

(Development of hair growth solutions from
Acanthopanax koreanum and *Critinum asiaticum*
complex extracts)

삼천당제약

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “오가피 및 문주란 추출물 복합제를 이용한 발모제 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 9월 5일

주관연구기관명 : 삼천당제약

주관연구책임자 : 임 광 진

협동연구기관명 : 제 주 대

협동연구책임자 : 강 희 경

요 약 문

I. 제 목

오가피 및 문주란 추출물 복합제를 이용한 발모제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 사용되고 있는 미녹시딜과 피나스테라이드 등의 발모제는 충분한 효과를 보여주지 못하고 있을 뿐만 아니라, 발기부전, 저혈압 환자의 혈압저하, 임부복용 시 남성태아 외부생식기의 비정상 초래 등의 심각한 부작용을 나타내 장기간 사용하기에는 부적합하다고 보고되고 있음. 따라서 발모 효과가 확인된 오가피와 문주란 추출물의 복합제를 제조하여 화학성분의 기존 발모제보다 효과는 우수하고 부작용은 개선된 천연물 발모제를 개발하고자 함

III. 연구개발 내용 및 범위

- 오가피와 문주란에서 발모에 효과적인 활성분획 추출
- 활성분획 추출체계 확립
- 발모제 제조공정 확립
- 발모제 효능 실험
- 제제연구
- 기전연구
- 안전성시험
- 탈모치료에 효과적인 발모제 개발

IV. 연구개발결과

- 오가피와 문주란 추출물 복합제의 표준제조공정 확립 및 지표성분 도출
- 기존 제품인 5% minoxidil과 동등한 효능을 발휘하는 천연물 발모제 개발 기술 확보
- 기전연구 결과 오가피와 문주란 추출물 복합제가 dermal papilla cells에서 모발의 성장에 관여하는 wnt/ β -catenin pathway 활성화 및 세포주기 진행에 관여하는 단백질의 발현을 조절하여 세포 성장 유도하는 것을 확인
- 단회투여독성시험, 4주 DRF 시험, 항원성시험, 피부자극시험, 안점막자극시험 완료

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 오가피와 문주란 추출물 복합제의 장기독성시험을 진행하여 확보된 안전성시험 자료를 토대로 IND 허가 신청 예정
- 본 연구 성과를 바탕으로 발모제 조성물 특허출원을 완료하였으며, PCT 출원을 진행 중에 있어 획득한 기술 및 정보를 활용하여 향후 천연물신약 개발에 응용 계획
- 발모촉진에 효능을 나타내는 국내자생식물의 활용으로 재배농가의 소득 증대 기여
- 삼천당제약의 병원 및 약국 유통망을 이용하여 제품 유통 및 판매

SUMMARY

I. Title

Development of hair growth solutions from *Acanthopanax koreanum* and *Critinum asiaticum* complex extracts

II. Purpose and necessity of research and development

The hair growth drugs on the market, minoxidil and finasteride, have no satisfactory potency, but serious side effects such as erectile dysfunction, blood pressure drops in hypotensive patients, and abnormal external genitalia of male fetus in pregnant women. Therefore, long-term use of these drugs is not recommended. We started to develop a more effective and safer than the current hair growth drugs using extracts from *Acanthopanax koreanum* and *Critinum asiaticum* which had hair growth effects.

III. Content and scope of research and development

- Establishment of the extraction process of hair growth fraction
- Establishment of the manufacturing process of hair growth fraction
- Efficacy study
- Formulation study
- Drug mechanism study
- Safety study
- Development of hair growth solutions

IV. Result of research and development

- Establishment of the manufacturing process and the marker compounds for *Acanthopanax koreanum* and *Critinum asiaticum* complex extracts
- Development of *Acanthopanax koreanum* and *Critinum asiaticum* complex extracts having the hair regrowth promoting effects similar to 5% minoxidil in animal studies
- Finding that *Acanthopanax koreanum* and *Critinum asiaticum* complex extracts induce hair cell proliferation through the regulation of protein expression involved in the cell cycle and activation of wnt/ β -catenin pathway involved in hair growth in dermal papilla cells
- Completion of single dose toxicity study, repeated dose 4 week dose-range finding toxicity study, antigenicity study, skin irritation test, and eye irritation test

V. Future plan for the utilization of research and development

- IND submission after long-term repeated dose toxicity studies of *Acanthopanax koreanum* and *Critinum asiaticum* complex extracts
- Patent Application in Korea and PCT application
- Contribution to Korean farmers' income by using Korean native plants
- Marketing the natural hair growth drug through the hospitals and pharmacies related with SCD Pharm.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of Research Project

Chapter 2. Domestic and International Research Status

Chapter 3. Contents of the Research Project and Results

Chapter 4. Level of Achievement and Contribution to Related Areas

Chapter 5. Application of Research Results

Chapter 6. Research Facility and Machinery Status

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구시설 장비·현황

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 대상기술의 개요

- 대상기술은 인체의 머리 부분에 발라서 발모작용을 나타내는 발모제에 대한 기술 분야로서 합성의약품과 의약외품으로 출시되어 있음
- 모발은 상피세포로 이루어진 고형의 원추 섬유로서, 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하조직(subcutaneous tissue)의 3층 구조로 구성되어 있으며, 모발은 자외선 차단 및 완충작용 등 두개골을 보호하는 역할과 신체내의 불필요한 성분인 비소, 수은, 아연 등의 중금속을 체외로 배출시키는 기능을 가지고 있음
- 특히 건강한 두피는 적당히 촉촉하고, 윤기와 탄력이 있으며, 매끄러우며, 피부와 마찬가지로 표피에 함유되어 있는 수분을 컨트롤하고 피지선으로부터 분비된 피지와 균형을 맞춰 촉촉한 막을 만들어 수분 방어막을 형성하는 역할을 수행함(그림 1-2)

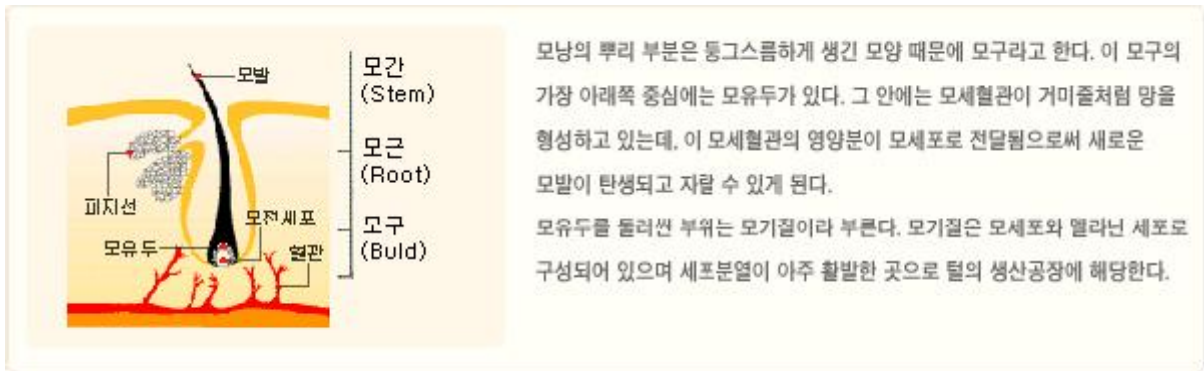


그림 1. 모발의 구조

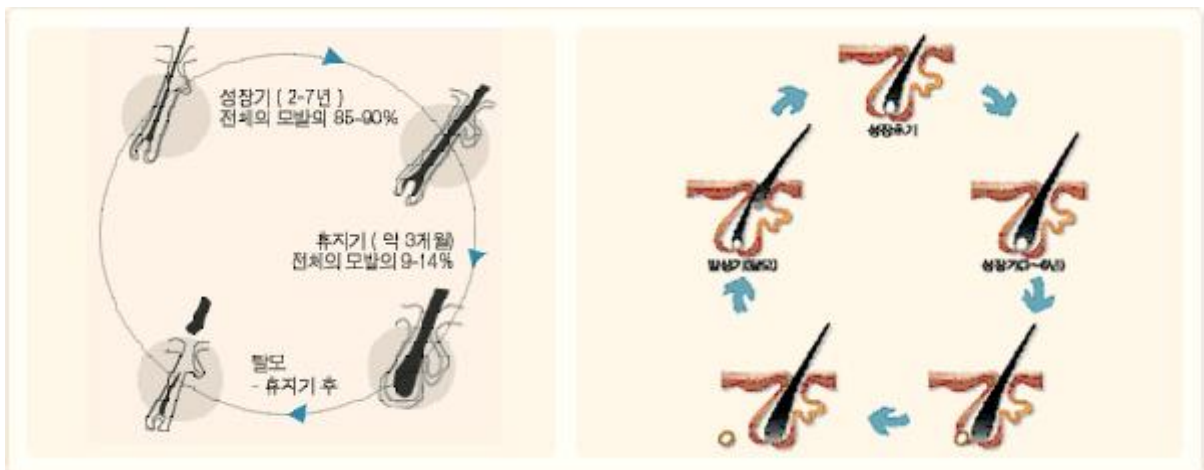


그림 2. 모발의 일생

- 인체의 모발은 약 10만 내지 15만개 정도이고, 각각의 모발은 서로 다른 주기를 가지며, 성장기, 퇴행기, 휴지기를 거쳐 성장하고 탈락함. 이러한 주기는 3년 내지 6년에 걸쳐 반복되는데 그 결과 일일 평균 60개-100개의 모발이 정상적으로 탈락하게 됨
- 일반적으로 탈모증이라 함은 이러한 주기 중에서 성장기의 모발비율이 적어지고 퇴행기 또는 휴지기의 모발이 많아져 비정상적으로 모발이 탈락하는 숫자가 많아지는 것을 일컬음
- 탈모는 과거에는 중, 장년층에서 주로 발생하였지만, 현재는 산업의 고도화와 복잡화에 의한 과로, 환경오염, 식품 등에 기인하여 20-30대의 젊은 층에서 두드러지게 증가하고 있으며, 대표적인 탈모원인으로는 스트레스, 샴푸나 무스의 과다한 사용, 파마나 염색 및 드라이기 사용에 의한 모발과 두피 손상, 비듬이나 피지 분비의 불균형, 고열로 인한 중병, 항암제 및 각종 항갑상선제의 복용, 경구 피임약의 투여, 영양의 불균형, 가공식품의 섭취, 유전적인 요인 등을 들 수 있으며, 이 중에서 두피의 영양부족이 가장 큰 원인으로 알려져 있음
- 남성과 여성의 탈모에는 여러 가지 차이점이 있는데 남성형 탈모증의 경우, 95% 이상이 유전적 소인에 바탕을 둔 남성호르몬의 과다 분비에 기인함. 구체적으로 설명하면 체내에서 분비된 테스토스테론(testosterone)이라는 남성호르몬이 특정효소에 의해 디하이드로테스토스테론(DHT; dihydrotestosterone)이라는 물질로 전환되고, 이 DHT의 체내 농도가 상대적으로 높으면 모낭의 축소가 촉진돼 탈모가 빠르게 진행됨
- 여성형 탈모증에서도 DHT가 주요 원인으로 작용하지만 여성의 경우 여성호르몬이 분비되고 있어 상대적으로 DHT의 모낭 파괴작용을 억제해 준다고 함
- 이러한 탈모현상의 치료방법으로는 국소도포제, 경구복용제, 건강보조식품, 유전자이식수술, 모발 이식수술과 대체의학 등 다양한 방법이 시행되고 있으나, 아직까지 만족할 만한 결과를 나타내는 치료방법이나 물질은 없는 것으로 알려져 있음
- 탈모나 모발의 얇아짐 등 두발에 관한 문제로 고민하는 사람들이 해마다 증가하고 있어 양모제, 육모제, 발모제로 칭하는 많은 제품들이 발매되어 왔으나 국내 약사법에는 양모제, 육모제, 발모제에 대해 명확히 정의되어있지 않음. 따라서 시중에서는 이들 용어가 혼돈되어 사용되고 있고, 발모제는 의료용어로만 사용이 제한되어야 함에도 불구하고 일반인들에게 폭넓게 사용되고 있는 실정임. 육모 또는 양모란 '살아있는 모공에 모발이 자랄 수 있는 최적의 환경을 만들어 준다'는 의미를 갖고 있는 반면, 발모란 '모근을 생성하여 모발을 자라게 한다'는 의미를 갖고 있음

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 소재 시장 확대 가능성 vs 산업화 유망 아이템 부족

- 고령사회 도래와 함께 건강장수 및 웰빙(well-being)에 대한 소비자 욕구가 증가하여 세계적으로 천연물 유래의 기능성식품·의약품의 글로벌 마켓은 계속 확대될 전망이다
- 세계보건기구(WHO)의 보고에 따르면 세계 천연물의약품 시장 규모가 2011년 187조원을 형성하였으며, 2017년에는 316조원, 2023년에는 423조원을 형성할 것으로 예측하고 있음
- 현재 40억명(세계 인구의 80%)이 1차 건강관리를 위해 천연물의약품을 사용함
- 국내 천연물의약품 시장 규모는 2011년 기준 약 5,000억원을 형성하고 있으며 향후 지속적인 성장을 할 것으로 예상됨

2. 생물주권확보를 통한 세계 의약품 시장 경쟁력 강화 절실

- 세계적으로 생물자원에 대한 관심이 증대되고 있으며 자국의 생물자원에 대한 가치를 인식하고 이를 자원화하고 있음
 - ▶ 국제적으로 생물다양성협약(CBD), 세계생물다양성정보기구(GBIF), OECD 세계 생물자원센터네트워크(OECD/GBRCN), 국제식물신품종보호협약(UPOV), 세계생물마크드컨소시엄(CBOL) 등을 통해 생물자원에 대한 관심이 증대되고 있음
- 2010년 10월 일본 나고야에서 열린 제10차 생물다양성협약 당사국총회에서 유전자원 접근 및 이익 공유에 관한 나고야 의정서가 채택됨
 - ▶ 자원 이용에 관한 최초의 국제조약인 나고야 의정서는 생물자원 및 관련 지식을 이용해 이익을 얻으면 원산지 국가와 이익을 공유해야 한다는 것임
- 나고야 의정서가 발효되면 협약을 거쳐 원료 원산지 국가에 로열티를 지불해야 함
 - ▶ 중국 자생식물인 ‘스타아니스’를 분석해서 만든 타미플루의 경우 나고야 의정서가 발효되면 독점생산하고 있는 스위스 제약회사 로슈는 중국과 이익을 배분해야 함
- 국내 제약 및 기능성 식품회사의 약 3분의 2가 해외생물자원을 이용하고 있어 관련 업계에 부담이 크게 가증될 것으로 예상됨
- 나고야의정서에서 부각된 생물주권 경쟁에 대처하고 국내 의약산업의 글로벌시장의 독점가치 향상을 통한 시장경쟁력 제고를 위해서는 국내 식물자원을 활용한 천연물 의약 소재의 산업화 전략은 필수적임
- 따라서 국내 자생식물 자원을 이용한 의약 소재 산업화는 고유의 자원 활용에 따른

시장독점력 창출 가능성을 높일 수 있음

- 이를 위해서는 조기 실용화를 통한 시장 선점과 독점력 제고가 필요하며, 개발 성과의 적기 산업화 이전을 위한 연계활동이 매우 중요하고 절실함

3. 오가피와 문주란 복합제를 활용한 천연물 발모제 개발

- 현재 발모제로서 미국 FDA의 허가를 받은 의약품은 경구용인 '프로페시아'(성분명: 피나스테라이드)와 외용제인 '로게인'(성분명: 미녹시딜) 2종뿐임
- 미국 머크(Merck)사가 판매하고 있는 발모제 '프로페시아'의 경우, 임상연구 결과 86% 정도의 탈모 방지효과를 나타내고, 약물투여군의 66% 정도에서 발모 현상을 보였지만, 이 임상결과는 약물투여 당시에 나타나는 일시적인 효과일 뿐, 투약을 중단하면 다시 탈모가 진행되기 때문에 약물을 지속적으로 복용해야 하며, 일부 투여군에서는 성욕감퇴, 발기부전 등의 부작용이 보고됨
- 또한, 파마시아 앤 업존(Pharmacia & Upjohn)사는 오래전에 '미녹시딜'이라는 물질을 개발하여 혈관 이완작용을 나타내는 고혈압 치료제로 사용하여 왔으나, 고혈압 환자들이 이 약물을 복용하면 부작용으로 머리, 팔, 다리 등의 전신에 털이 2~4 cm까지 자란다는 사실에 착안, '미녹시딜'을 바르는 발모제로 개발하여 '로게인'이란 상품명으로 판매하기 시작하였으나, 과다 사용 시 두피건조, 홍반 등의 두피 자극증상, 알레르기성 접촉 피부염, 안면부 다모증과 혈관확장, 항고혈압 작용에 의한 허탈감, 저혈압, 빈맥 등의 부작용을 일으키는 것으로 밝혀졌음
- 지금 사용되고 있는 발모제들은 탈모방지 및 발모에 충분한 효과를 보여주지 못하고 있을 뿐만 아니라, 여러 부작용으로 인하여 장기적으로 사용하기에는 문제점이 있음
- 따라서, 대부분의 탈모환자들은 탈모증상을 완치하지는 못하지만 발모제들을 번갈아 사용해가면서 일시적인 개선효과에 만족해하고 있으며, 장기사용에 따른 비용문제도 있어 치료를 포기하는 경우도 있는 실정임
- 현재 오가피와 문주란을 재배하는 농가는 활용방안이 충분하지 못하여 안정적인 수요처 확보에 어려움을 겪고 있음
- 오가피를 원료로 하는 제품은 액상차, 잎을 원료로 한 잎차, 엑기스 형태의 음료 등이 출시되고 있으나, 이용도가 넓지 못하고 판매량도 미미한 수준임
- 문주란은 현재 제주도에서 자생하는 식물로써 관상용으로 많이 이용되고 있지만, 산업적 활용가치는 극히 미미한 상황임

- 이러한 상황에서 오가피와 문주란을 이용하여 천연물 발모제로 개발하여 제품화한다면 탈모환자의 질환치료에도 도움이 될 뿐만 아니라 오가피 및 문주란 재배 농가의 소득 증대에도 큰 도움이 될 것으로 사료됨

- 기존 발모제는 외국에서 개발된 합성의약품 제품들이므로 국내에서 천연물로부터 유래한 제품이 개발된다면 외국에서 개발된 발모제의 수입대체 효과가 클 것으로 기대됨

- 천연물신약 개발의 성공은 국내 천연자원의 이용을 극대화시키고, 천연물 신약 연구의 활성화와 관련 산업의 발전으로 이어질 것으로 예상하고 있음

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술 개발 동향

1. 국내 기술 개발 동향

- 2011년 식품의약품안전청의 국내 천연물신약 개발현황 자료에 따르면 국내 제약사들의 천연물신약의 경우 단일제보다는 복합제를 이용하여 약효의 우수성을 입증한 제품 개발이 주를 이루고 있음
- 그 중 녹십자의 ‘신바로 캡슐’은 무릎 관절염, 퇴행성 척추염, 허리디스크 등의 치료에 사용되며 효능과 안전성이 입증된 구척, 우슬, 두충 등 6가지 생약 추출물 복합제를 사용하였고, 동아제약의 ‘모티리톤’은 한약재 현호색의 덩이줄기에서 분리한 추출물과, 견우자의 추출물을 혼합한 복합제를 이용해 우수한 효능을 나타내는 천연물의약품을 개발하였음(표1)

표 1. 2011년 국내 복합제를 이용한 천연물신약 개발현황					
제품명	주성분(생약)	회사명	개발형태	적응증	허가일자
신바로캡슐	차오가, 우슬, 방풍, 두충, 구척, 흑두	녹십자	복합제	골관절염	2011.1.25
시네츄라시럽	황련, 아이비엽	안국약품	복합제	기관지염	2011.3.11
모티리톤정	현호색, 견우자	동아제약	복합제	기능성 소화불량증	2011.5.16

(2011년 식품의약품안전청 제품 허가자료)

- 국내 자생 오가피나무(가시오가피, 털오가피, 지리오가피 등)는 10종 3품종이 있으며, 날로 고조되는 국제적인 생물다양성 보호추세 및 이들의 고부가가치 자원화 전략 면에서 우리나라가 내세울 수 있는 중요 식물자원 중의 하나임
- 오가피는 다양한 약리작용 및 생리활성을 나타내는 성분들을 지니고 있기 때문에 의학 및 약리분야에서 많은 연구가 이루어지고 있으며, 최근에는 오가피를 이용한 건강음료와 오가피차 등 다양한 제품이 개발되고 있음
- 또한 수선화과의 문주란(*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)은 한국 및 일본지역에서

만 넓게 분포하는 식물로서 유용성분 및 다양한 약리효과가 논문으로 많이 알려져 있음

- 따라서 본 연구에서는 탈모 방지 및 발모에 대한 우수한 효과가 세포 및 동물실험을 통해 입증된 오가피(Acanthopanax)와 문주란(Crinum asiaticum)의 추출물이 모발성장 촉진 활성이 뛰어난 사람을 사람에게서 확인함으로써 기존의 화학물질을 이용한 발모제를 대체할 천연물 유래 발모제 제품을 개발하고자 함

2. 국외 기술 개발 동향

- 세계적으로 FDA 공인을 받은 발모제는 합성의약품인 미녹시딜과 피나스테라이드 두 종류이며, 이들 두 가지를 주성분으로 하는 제네릭 제품의 개발이 미국 등에서 활발히 이루어지고 있는 것과 동시에 천연물을 원료로 하는 제품 개발 또한 지속적으로 이루어지고 있음
- 일본의 경우, 서양고추나물 추출물을 복합 처방한 가오의 ‘석세스 약용’, 정향나무의 Eugenol 성분 유도체를 주성분으로 하여 개발된 가네보의 ‘약용 자전개Z’, 회화나무와 일본 산차인 야마차를 주성분으로 하는 시세이도의 ‘약용 블로립’ 등이 발모제품으로 개발되는 등 천연물 유래의 발모제품 개발이 활발히 이루어지고 있음(표2)

표 2. 천연물을 이용한 발모제 개발 일본 동향				
기업명	가오	츠무라	가네보	시세이도
제품명	석세스 약용	인센트모우가	약용 자전개Z	약용 블로립
성분명	서양고추나물 추출물	용담과의 월년초를 포함한 3종의 생약복합 추출물	정향나무의 Eugenol 성분 유도체	회화나무와 야마차 복합 추출물

- 미국에서도 천연물 소재의 발모제 개발이 활발히 진행 중임
- 탈모방지 및 발모관련 출원특허의 62%가 천연물을 소재로 하고 있음

제 2 절 국내외 시장현황

1. 국내 시장현황

- 건강보험심사평가원에 따르면 탈모로 병원을 찾은 환자는 2007년 16만 6000명에서 2011년에는 19만 4000명으로 약 17.0% 증가하였음
- 전체 환자 중 20, 30대 젊은 남자가 46%를 차지했고 최근에는 젊은 여성 탈모환자도 늘고 있음. 이처럼 탈모 인구가 급속히 증가하면서 탈모치료제 시장도 확대되고 있어 잠재시장을 포함해 약 2조원에 달하는 것으로 알려짐
- 국내 탈모방지 및 발모제, 모발이식 등 관련 전체 시장 규모는 2004년 약 4천억원에서 2005년 8천억원대로 2배 성장했고, 2006년 1조원대, 그리고 2010년에는 2조원을 넘어섰으며 그 증가세는 더욱더 확대될 것으로 예상되고 있음(표3)

표 3. 탈모 관련 시장 규모			
(단위 : 억원)			
구 분	2010년	2016년 예측	2018년 예측
세계시장규모	252,890	448,010	542,092
한국시장규모	26,620	47,158	57,062

자료 출처 : Datamonitor(매년 10% 성장 기준)

- 현재 발모제 시장은 경구제와 외용제로 나뉨. 경구용 발모제 시장은 2012년 521억원으로 성장함
- 2012년 IMS보고서 기준으로 경구용 발모제 프로페시아 매출이 240억원에 달하는 것으로 나타났으며 국내 출시 이후 13년간 시장점유율 1위 자리를 놓치지 않고 있음. 외용제 시장에서는 미녹시딜이 2011년 기준 약 70억원의 규모를 형성하며 독점하고 있음(표4)
- 최근 GSK의 신약 '아보다트'가 부동의 1위 MSD의 '프로페시아'에 이어 경구용 발모제 시장 매출 2위로 올라섰음
- GSK의 아보다트 2012년 매출은 약 60억원으로 1위와의 격차는 크지만 KFDA로부터 발모제로 허가를 받은 뒤 단숨에 2위를 기록함. 아보다트는 2002년 전립선 비대증 치료제로 FDA 허가를 받은 뒤 2009년 한국에서 발모제로 KFDA 승인을 획득하였음. 현재까지 발모제로 FDA 승인은 받지 못한 상태임

- 경구용 탈모제는 효소 5-알파 환원효소(5-alpha reductase)의 작용을 억제하여 테스토스테론이 디하이드로테스토스테론(DHT, dihydrotestosterone)으로 전환되는 것을 억제하는 기전으로 탈모를 치료함
- DHT는 2가지 형태인 1형과 2형으로 나뉘는데 프로페시아는 이 중 2형만 차단함. 반면 아보다트는 두 효소타입을 모두 차단하기 때문에 프로페시아 보다 효과는 크지만 그만큼 부작용의 범위가 넓다고 보고됨
- 아보다트(성분명 : 두타스테라이드)는 하루 0.5 mg으로 혈청 DHT 91%, 두피 DHT 54% 감소시켜, 기존 프로페시아(성분명 : 피나스테라이드) 1.0 mg의 혈청 DHT 71%, 두피 DHT 38% 감소 보다 효과 높음
- 아보다트 복용 시 첫 6개월 동안 성불능증이 4.7%의 대상자에서 관찰되었으며 성욕감퇴, 사정장애, 여성형유방증, 유방연화증이 보고됨. 임신 여성은 이 약을 만져도 안 된다고 하며 프로페시아 보다 혈액 내 잔류시간도 길어 복용 중지 후 반년까지도 혈액 내에서 약물이 검출되는 문제점 있음

표 4. 국내 탈모치료제 현황			
제품명	프로페시아	아보다트	로게인
성분명	피나스테라이드	두타스테라이드	미녹시딜
회사	MSD	GSK	Pharmacia & Upjohn
복용	경구제	경구제	외용제
기전	5-알파 환원효소 억제 : DHT 2형 차단	5-알파 환원효소 억제 : DHT 1형, 2형 차단	칼륨 채널 개방
매출	240억원(2012)	60억원(2012)	70억원 (현대약품 마이녹실, 2011)
부작용	성기능장애(발기력 저하, 성욕감퇴) 여성 사용금지(임부복용 시 기형아 출산 위험)	성기능장애(발기력 저하, 성욕감퇴) 여성 사용금지(임부복용 시 기형아 출산 위험) 여성형유방증, 유방연화증	가려움증, 홍반, 발적, 피부염, 모낭염, 심혈관계 질환 환자 사용금지(특히 저혈압 환자) 가임 여성 사용금지

(IMS 헬스데이터, 2012)

- 또한 아직까지 아보다트에 대한 장기 연구결과가 없으므로 탈모치료 효과 및 부작용에 대한 충분한 연구가 필요한 상황이어서 업계에서는 추가 임상시험 결과를 주시하고 있음. 현재 아보다트는 프로페시아로 큰 효과를 보지 못한 환자들을 대상으로 처방을 하고 있음

- 따라서 업계에서는 경구용 발모제 시장의 경우 프로페시아가 사용자의 만족도도 높고 세계에서 가장 많이 판매된 탈모치료제라는 명성 덕분에 선두 자리를 고수할 것으로 전망하고 있음
- 외용제인 미녹시딜의 경우 의사의 처방 없이 약국 등에서 구입 가능해 경구용 제품보다 더 폭넓은 구매자 층을 형성하고 있음
- 외용제인 미녹시딜은 기전이 명확히 밝혀지지는 않았으나 칼륨 채널 개방에 의한 것으로 보고되고 있으며 과다 사용 시 저혈압환자의 경우 혈압 저하 등이 나타나므로 심혈관계 질환 환자는 사용을 금지하는 등 심각한 부작용 있음
- 국내 발모제 시장은 매년 큰 폭으로 성장하고 있으나 해외 제약회사들이 독점하고 있어 국산 발모제 개발이 시급한 상황임

2. 국외 시장현황

- 국외 발모제 시장은 피나스테라이드와 미녹시딜을 주성분으로 하는 제품이 주도하고 있음
- GlobalData에 따르면 임상 3상 진행 약물은 현재 없으며, 임상 2상에 진입한 약물은 4종류임(표 5)
- 그 중 Allergan의 bimatoprost는 prostaglandin F2 수용체 작용제로서 휴지기 모낭을 성장기 모낭으로 변화도록 자극을 주는 기전으로 임상 2상 진행 중이었으나 2013년 5월 임상 중단하였음
- 그 밖에 Medicis의 CB-03-01은 여드름 치료제에서 시작된 약물로서 안드로겐 길항제로 알려져 있음
- Kasiak Research Pvt.의 Refagro는 혈소판 유래 물질을 자가 이식하여 새로운 혈관형성을 촉진함으로써 모낭의 성장을 촉진시킨다고 알려짐
- R-Tech Ueno에서 개발 중인 RK-023의 주요기전은 알려져 있지 않으나 남성탈모증만으로 한정된 속눈썹 빈모증을 동시 target으로 개발 중인 것으로 파악됨

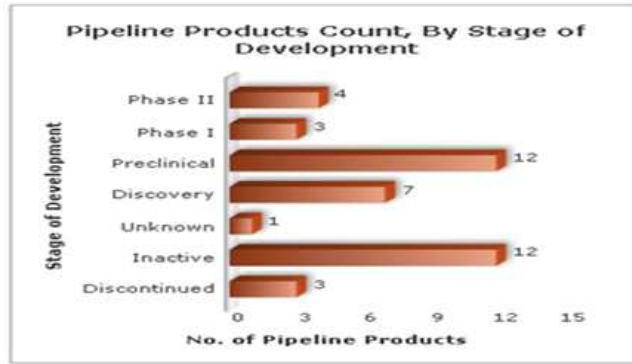


표 5. 국외 탈모치료제 개발 현황

Drug Name	Company	Mechanism	Product Stage	Administration
Bimatoprost	Allergan, Inc.	prostaglandin F2 receptor agonist. stimulate the resting follicles to growing follicle	Phase II	Topical
CB-03-01	Medicis Pharmaceutical Corporation	steroid ester and a androgen antagonist	Phase II	Topical
Refagro	Kasiak Research Pvt. Ltd.	autologous Human Platelet Lysate, stimulates new blood vessels to grow for the hair follicles	Phase II	Injection
RK-023	R-Tech Ueno, Ltd.	-	Phase II	Topical

(GlobalData, 2011)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 목표 및 수행내용

1. 연구개발의 최종목표

- 오가피와 문주란 추출물 복합제의 최적조합을 도출하여 대조약물인 미녹시딜 대비 동등 이상의 효과를 나타내는 천연물 발모제 의약품 개발을 목표로 함
- 완제품 및 원료 수출을 통한 신부가가치 창출

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

구분	기관명	책임자	연구개발의 목표	연구개발의 내용
주관기관	삼천당제약	임광진	후보생약의 제품화 후보생약의 유효성 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 제제연구 • 안정성시험 • Scale up 생산공정 확립 • 제품 기준 및 시험법 설정 • 후보생약의 표준화 연구 • 후보생약 활성분획 제조방법 확립 • <i>in vivo</i> 효력검증시험
	캠온	강부현	후보생약의 안전성 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 단회투여독성시험(설치류) • 4주 DRF시험(설치류) • 항원성시험 • 국소독성시험
협동기관	제주대학교	강희경	후보생약의 기전 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 기전연구
위탁기관	충남대학교	김영호	후보생약의 분석법 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 후보생약 활성분획 제조 • 지표성분 분석법 확립

□ 추진일정

구분		추진일정							
		1년차				2년차			
		1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4
주 관 기 관 및 위 탁	후보생약 활성분획 제조(위탁)	■	■	■					
	분석법 확립(위탁)			■	■	■	■		
	제제연구					■	■		
	안정성시험							■	■
	제품 기준 및 시험방법 설정						■	■	
	Scale up 생산공정 확립							■	■
	설치류 단회투여독성시험					■			
	설치류 4주 DRF시험						■	■	
	항원성시험(피부감작시험)							■	■
	국소독성시험 (피부자극시험, 안점막자극시험)								■
	후보생약의 표준화	■							
	후보생약 활성분획 제조방법 확립		■	■					
	효능확인			■	■	■	■		
협 동	약효 및 기전확립			■	■	■	■	■	

3. 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용																		
활성분획 제조방법 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 극성에 따른 용매 분획 방법 이용한 활성 분획 분리 - 제조단계별 표준제조 방법 설정 	<ul style="list-style-type: none"> - 오가피의 발모효능을 나타내는 acankoreoside J를 극성 높은 용매로 분획하여 분리 및 구조 동정 - 문주란의 발모효능을 나타내는 norgalanthamine의 분리정제 및 구조 동정 - 활성물질을 함유하는 추출물을 50% 에탄올(원료 무게의 8배)로 90℃에서 2시간 환류 추출하여 제조하는 방법 설정 																		
후보생약 표준화	<ul style="list-style-type: none"> - 원료 시험법에 따라 수분/회분/엑스함량 등 설정 - 유해성분 분석시험 통해 안전성 확보 	<ul style="list-style-type: none"> - 대한약전 의약품 각조의 생약에 적용하는 시험법에 준하여 실시하였으며, 오가피 및 문주란의 육안으로 성상 확인, 이화학적 확인시험, 회분, 순도시험 수행 - 유해성분 분석시험(잔류농약시험, 잔류이산화황시험, 중금속 시험) 진행 																		
<i>in vivo</i> 효능확립	<ul style="list-style-type: none"> - 마우스에서 발모효과 확인 위해 Kang 등 방법 이용 약효실험 수행 	<ul style="list-style-type: none"> - 휴지기(catagen) 앞둔 5주령 마우스(C57BL/6)를 사육실에서 1주일 적응시킨 후, 마취 시킨 마우스의 등 부위 털을 제모한 후 약 4주간 하루에 한번 씩 시험물질 도포 - 양성 대조군 5% 미녹시딜 사용 - 오가피 및 문주란 추출물의 마우스에서의 발모효과 사진 촬영 관찰 																		
분석시험	<ul style="list-style-type: none"> - HPLC 사용 각 성분의 함량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 지표성분 설정 : 오가피(Kaurenoic acid) 문주란(Lycorine, Crinamine) - 분석 조건 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Kaurenoic acid</th> <th>Lycorine, Crinamine</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Column</td> <td>C-18 ODS</td> <td>C-18 ODS</td> </tr> <tr> <td>Temp.</td> <td>40℃</td> <td>40℃</td> </tr> <tr> <td>Solvent</td> <td>60% ACN → 100% ACN</td> <td>10% ACN→50% ACN /20mM CH₃COONH₄</td> </tr> <tr> <td>Flow</td> <td>1 mL/min</td> <td>1 mL/min</td> </tr> <tr> <td>UV</td> <td>210nm</td> <td>210nm</td> </tr> </tbody> </table>		Kaurenoic acid	Lycorine, Crinamine	Column	C-18 ODS	C-18 ODS	Temp.	40℃	40℃	Solvent	60% ACN → 100% ACN	10% ACN→50% ACN /20mM CH ₃ COONH ₄	Flow	1 mL/min	1 mL/min	UV	210nm	210nm
	Kaurenoic acid	Lycorine, Crinamine																		
Column	C-18 ODS	C-18 ODS																		
Temp.	40℃	40℃																		
Solvent	60% ACN → 100% ACN	10% ACN→50% ACN /20mM CH ₃ COONH ₄																		
Flow	1 mL/min	1 mL/min																		
UV	210nm	210nm																		

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
모유두세포의 성장 증식 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - rat vibrissa hair follicle 유래 immortalized 모유두세포(모발주기 조절에 가장 중요한 세포)의 증식 정도 MTT법으로 측정 	<ul style="list-style-type: none"> - well에 모유두세포 넣고 24시간 배양 후 시료 처리 - 양성 대조군은 10 μM minoxidil 처리 - 4일 배양 후 MTT assay 실시
5 α -Reductase 억제 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - Dihydrotestosterone (DHT)은 안드로젠성 탈모의 원인으로 알려져 있으며, 5α-reductase에 의하여 testosterone으로부터 생성됨 	<ul style="list-style-type: none"> - rat prostate 5α-reductase 이용하여 [³H]테스토스테론(T)이 [³H]DHT로 전환되는 양으로 5α-reductase 활성 평가 - 5α-reductase 활성에 의한 테스토스테론의 전환율을 DHT/(T+DHT) 비로 계산하여 5α-reductase 억제 활성 측정
3T3 세포 증식 평가	<ul style="list-style-type: none"> - Minoxidil은 ATP-sensitive K⁺-channel opener로 mitogenic 효과 나타내며, ATP-sensitive K⁺-channel blocker에 의해 효과 차단 - 3T3 세포주 사용 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 오가피와 문주란 추출물 복합제가 ATP-sensitive K⁺-channel opening 효과 있는지 NIH3T3 fibroblast cells의 증식 효능 조사 - well에 NIH3T3 세포 넣고 24시간 배양 후 시료 처리 - 양성 대조군은 75 μM minoxidil 처리 - 4일 배양 후 MTT assay 실시
모발주기조절 인자 β -catenin 신호전달 기전 관련 단백질의 발현 변화 조사	<ul style="list-style-type: none"> - Wnt/β-catenin signaling pathway의 활성화, 즉 β-catenin의 인산화는 상위조절자인 GSK3β 인산화에 의해 조절됨 - Akt/protein kinase A (PKA)도 β-catenin의 인산화 유도 - 세포 증식은 세포주기 조절인자들에 의해 조절되며, 세포주기 조절인자들은 Erk의 인산화에 의해 조절 - 세포주기 조절인자들은 wnt/β-catenin signaling pathway의 target으로도 알려져 있음 	<ul style="list-style-type: none"> - 오가피와 문주란 개별추출물과 추출물 복합제가 dermal papilla cells에서 wnt/β-catenin signaling pathway와 세포주기 조절인자들의 발현을 조절하여 모발의 성장기 유지 효과 나타내는지 확인 위해, rat vibrissa follicles 유래 immortalized dermal papilla cells에서 단백질 분리 발현 변화 확인

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
단회투여독성시험	<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질을 실험동물에 단회 경구투여 하였을 때 전신독성과 함께, 임상예정경로(경피)에 대한 단기간 나타나는 독성을 질적, 양적으로 검사 	<ul style="list-style-type: none"> - 투여경로 : 경구, 경피 - 사용동물 : Sprague-Dawley 랫드 - 적용농도 : 1250, 2500, 5000 mg/kg - 부형제대조군과 시험물질투여군을 설정하여 군당 10마리(암수 각 5마리)에 단회 경구 투여 - 2주간 사망률, 일반증상 관찰, 체중변화 및 육안적 부검소견을 관찰
4주 DRF 시험	<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질을 실험동물에 임상예정경로(경피)로 반복투여하여 중, 장기간 내에 나타나는 독성을 질적, 양적으로 검사하여 추후 실시할 반복 경피투여 독성시험에서의 용량설정 근거로 활용 	<ul style="list-style-type: none"> - 투여경로 : 경피 - 사용동물 : Sprague-Dawley 랫드 - 적용농도 : 1000, 2000, 4000 mg/kg/day - 시험물질 투여군, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제 대조군을 설정하여 군당 1마리(암수 각 5마리)에 4주간 경피 투여 - 일반증상관찰, 체중측정, 사료 및 물섭취량 산출, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량측정, 부검소견관찰 및 투여부위에 대한 조직병리학적 검사를 실시
항원성시험 (피부감작성시험)	<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질이 생체의 항원으로 작용하여 나타나는 면역원성 유발여부를 검사하는 것으로, 피부 감작성시험을 통해 시험물질의 피부 접촉으로 인한 감작성을 예측하기 위함 	<ul style="list-style-type: none"> - 투여경로 : 경피 - 사용동물 : 기니픽 - 적용농도 : 0.5 ml/site (500 mg/site) - 실험군과 비교 평가하기 위해 음성대조군 5마리와 양성대조군 5마리 사용 - 10마리의 시험물질 투여군에 시험물질을 적용하여 감작 및 야기한 후 야기처치 제거 후 24, 48, 72 시간의 피부반응 평가
피부자극시험	<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질의 피부노출에 따른 피부자극을 평가하는 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 투여경로 : 경피(찰과 및 비찰과 피부) - 사용동물 : New Zealand White계 토끼 - 적용농도 : 0.5 g/site - 6마리 토끼의 찰과 및 비찰과 피부에 24시간 시험물질 적용 후 24시간, 72시간째에 일반증상 및 도포 국소 부위의 홍반, 부종, 출혈, 가피형성의 변화를 육안적으로 관찰
안점막자극시험	<ul style="list-style-type: none"> - 안점막에 접촉하거나 접촉할 우려가 있는 시험물질의 자극성을 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 투여경로 : 안점막 - 사용동물 : 백색토끼 - 적용농도 : 0.1 g - 시험물질을 세안군 3마리, 미세안군 6마리로 나누어 적용 후 1, 2, 3, 4 및 7일에 토끼의 눈주위, 안구 및 행동을 관찰하여 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등의 변화를 육안 확인

제 2 절 세부연구 수행결과

[주관기관]

□ 후보생약의 표준제조방법 확립 및 발모 효능 평가

1. 후보생약 수급방안

- 후보생약인 오가피와 문주란은 국내 자생식물로서 오가피는 원료 재배업체인 천안 수신오가피와 제주 한라산오가피로부터 원료물질을 공급 받고, 문주란은 제주 구좌읍 재배농가로부터 원료물질을 공급받는 것으로 후보생약 수급계획 확립
- 확보된 원료는 성상, 기원을 명확히 연구하고, 재배조건 및 채취시기에 따른 원료의 차이를 계량화하여 표준원료 모델을 개발함



오가피



문주란

- 오가피와 문주란 추출물 복합제로 발모제 개발 시 환자가 1일 2ml씩 4개월 사용할 경우, 10만명 환자 기준 약 4톤의 생약이 필요하므로 원료를 재배하는 농가의 소득 증대에 크게 기여할 것임

2. 후보생약 표준화

- 천연물의 경우 산지와 채취시기에 따라 함유 성분 및 함량에 차이가 있으므로 구입처 및 구입 시기를 확정지었으며 이화학적 시험 등의 확인시험을 진행하여 원료를 규격화하였음
- 원료시험은 원료 구입과 동시에 진행하였으며, 각 시험방법은 의약품 각조의 생약에 적용하는 시험법에 준하였음

가. 원료의 시험방법

(1) 순도시험(이물검사)

따로 규정이 없는 한 검체 25~500 g을 달아 얇게 펴서 생약 중 이물을 육안 또는 10배의 확대경으로 골라내어 그 질량을 달아 이물의 양(%)으로 함

(2) 건조감량

◆ 시험방법

분석용 검체 2~6 g을 미리 질량을 단 칭량병에 넣어 질량을 정밀 측정

→ 105℃에서 5시간 건조 후 데시케이터(실리카겔)에서 식힌 다음 질량을 정밀 측정

→ 105℃에서 다시 건조하여 1시간마다 질량을 정밀 측정하여 항량 될 때의 감량을 건조 감량(%)으로 함. 단 건조시간이 규정되어 있을 때는 규정시간 동안 건조 후 질량을 정밀 측정하여 그 감량을 건조감량(%)으로 함

◆ 사용기기 : Analytical Balance, 건조기

◆ 시험조건 : 방치하여 식힐 때는 데시케이터(실리카 겔) 사용

(3) 회분시험

◆ 시험방법

도가니를 500~550℃에서 1시간 강열하고 식힌 후 질량 측정

→ 검체 2~4 g을 도가니에 넣어 질량측정 후 약하게 가열하다 500~550℃에서 4시간 이상 강열

→ 방치해 식힌 후 질량 측정하고, 잔류물이 항량 될 때까지 회화하고 방치해 식힌 후 질량 측정

→ 항량 되지 않을 경우 열탕 넣어 침출, 여과하고 잔류물 강열

→ 여액 넣은 후 증발 건조해 강열하고 방치해 식힌 후 질량 측정

→ 항량 되지 않을 경우 소량 에탄올로 적셔 탄화물 부수고 에탄올 증발시킨 후 앞의 방법으로 조작하여 질량 측정

◆ 사용기기 : Analytical Balance, 회화로

◆ 시험조건 : 방치하여 식힐 때는 데시케이터(실리카 겔) 사용

(4) 산불용성회분 시험

◆ 시험방법

회분에 묽은 염산 25 mL 넣고

→ 5분간 약한 열로 끓여 불용물을 정량용 여과지로 여과

→ 잔류물을 열탕으로 씻어 여과지와 함께 건조

→ 회분시험과 같은 방법으로 3시간 강열

→ 데시케이터에서 식힌 다음 질량 정밀 측정

→ 얻은 값이 규정 값보다 클 경우 항량 될 때까지 강열

◆ 사용기기 : Analytical Balance, 건조기, 회화로

◆ 시험조건 : 방치하여 식힐 때는 데시케이터(실리카 겔) 사용

(5) 잔류이산화황

◆ 시험방법

증류플라스크에 물 400 mL 넣고 분액깔때기 코크 잠근 후 4 mol/L 염산 90 mL 넣음
→ 가스주입관 통해 질소가스를 0.21 L/min 속도로 통과시키고 냉각기(E)에 냉수 통과시킴

→ 수기에는 3% 과산화수소액 30 mL 넣음 → 15분 후 분액깔때기 떼어냄

→ 검체 50 g과 5% 에탄올 100 mL 혼합하여 증류플라스크에 넣음

→ 분액깔때기 달고 코크 열어 4 mol/L 염산 3 mL가 남을 때까지 플라스크에 넣음

→ 가스 유도관 끝을 소량의 3% 과산화수소액으로 씻어 수기에 합친 후 마이크로 뷰렛 이용 적정(0.01 mol/L NaOH 용액)

◆ 사용기기 : 잔류이산화황 장치

◆ 시험조건 : 적정 종말점은 황색이 20초 이상 지속될 때. 같은 방법으로 공시험 하여 보정

(6) 엑스함량

◆ 시험방법

검체 약 2.3 g 정밀 측정하여 플라스크에 넣음

→ 묽은 에탄올(또는 에탄올) 70 mL 넣고 때때로 흔들어서 섞으며 5시간 침출

→ 16~20시간 방치 후 여과

→ 플라스크 및 잔류물은 여액이 100 mL 될 때까지 묽은 에탄올(또는 에탄올)로 씻음

→ 여액 50 mL 수욕에서 증발건조하고 105°C에서 4시간 건조한 후 데시케이터에서 식힘

→ 완전히 식힌 후 질량 측정

→ 측정된 값에 2를 곱하여 묽은 에탄올 엑스(또는 에탄올 엑스) 양으로 함

→ 건조감량에서 얻은 값에서 건조물로 환산한 검체량에 대한 엑스함량(%) 산출

◆ 사용기기

Analytical Balance, 건조기, water bath, rotary evaporator

◆ 시험조건 : 방치하여 식힐 때는 데시케이터(실리카 겔) 사용

◆ 계산식

$$\frac{(C-A)}{B} \times 100 \times 2 \quad (A : \text{용기 무게}, B : \text{검체 무게}, C : \text{처리 후 A 무게})$$

나. 원료시험 결과

○ 오가피 및 문주란의 육안 정상 확인, 이화학적 확인시험, 회분, 순도시험 수행 결과 각 원료의 시험 기준에 적합하였음

○ 오가피

시험항목		시험기준	시험성적
성상		잎이 다섯 개로 갈라져 있으며, 연녹색 띈다.	잎이 다섯 개로 갈라져 있으며, 연녹색 띈다.
확인시험		아칸토시드 D 표준품에서 얻은 반점과 색상 및 Rf값 비교	아칸토시드 D 표준품에서 얻은 반점과 색상 및 Rf값 동일
회분		10.0% 이하	9.1%
순도시험		이 약은 목부조직 및 가는 가지가 2.0% 이상 섞여 있지 않다.	1.7%
건조감량		5.6% 이하	5.1%
뭍은 엑스함량		37.0% 이상	41.3%
중금속	납	5 ppm 이하	0.84 ppm
	비소	3 ppm 이하	0.45 ppm
	수은	0.2 ppm 이하	0.03 ppm
	카드뮴	0.3 ppm 이하	0.04 ppm
잔류농약	총 BHC	0.2 ppm 이하	불검출
	총 DDT	0.1 ppm 이하	불검출
	알드린	0.01 ppm 이하	불검출
	디엘드린	0.01 ppm 이하	불검출
	엔드린	0.01 ppm 이하	불검출
이산화황		30 ppm 이하	1.2 ppm

○ 문주란

시험항목		시험기준	시험성적
성상		끝이 뾰족하고, 가장자리에 톱니가 없다. 두껍고, 광택이 난다.	끝이 뾰족하고, 가장자리에 톱니가 없다. 두껍고, 광택이 난다.
회분		7.9% 이하	7.1%
순도시험		흙 등의 잡질이 3.0% 이상 섞여 있지 않다.	1.2%
건조감량		3.1% 이하	2.8%
뭍은 엑스함량		40.0% 이상	45.3%
중금속	납	5 ppm 이하	0.16 ppm
	비소	3 ppm 이하	0.16 ppm
	수은	0.2 ppm 이하	0.002 ppm
	카드뮴	0.3 ppm 이하	0.15 ppm
잔류농약	총 BHC	0.2 ppm 이하	불검출
	총 DDT	0.1 ppm 이하	불검출
	알드린	0.01 ppm 이하	불검출
	디엘드린	0.01 ppm 이하	불검출
	엔드린	0.01 ppm 이하	불검출
이산화황		30 ppm 이하	0.5 ppm

3. 오가피와 문주란 추출물 복합제의 표준 제조공정 확립

○ 오가피 추출물의 표준 제조공정

오가피를 분쇄, 세척 및 건조하여 원료로 하고, 원료량의 8배에 해당하는 50% 에탄올 추출물로 90℃에서 1회 환류 추출하여 여과한 후 고형분 함량이 약 34%인 오가피 추출액 제조

○ 문주란 추출물의 표준 제조공정

문주란을 분쇄, 세척 및 건조하여 원료로 하고, 원료량의 8배에 해당하는 50% 에탄올 추출물로 90℃에서 1회 환류 추출하여 여과한 후 고형분 함량이 약 35%인 문주란 추출액 제조

- 원료 각각의 최적 추출용매 및 시간 등 최적 추출조건 개발하여 표준 제조 공정을 확립한 후 이를 활용하여 최적의 오가피와 문주란 추출물 복합제 제조공정 확립(그림3)

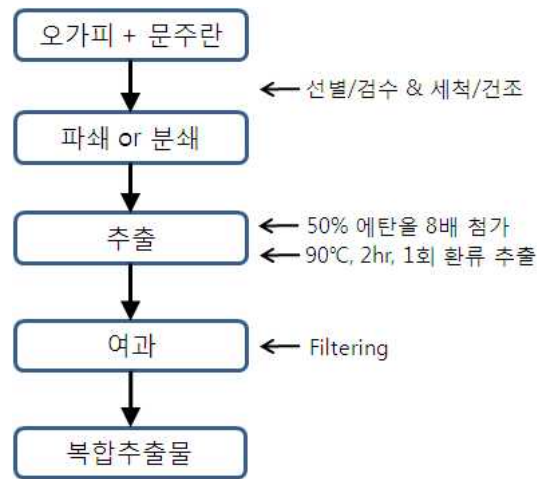


그림 3. 오가피와 문주란 추출물 복합제 제조공정도

4. 오가피와 문주란 추출물 복합제의 기준 설정 및 시험 결과

- 오가피와 문주란 추출물 복합제의 육안 성상 확인, 확인시험, 수분, 회분시험 수행하여 기준을 설정하였으며, 이 기준에 따른 원료시험 결과 시험 기준에 적합하였음

시험항목		시험기준	시험결과
성 상		연갈색의 분말	연갈색의 분말
확인시험		아칸토시드 D 표준품에서 얻은 반점과 색상 및 Rf값 비교	아칸토시드 D 표준품에서 얻은 반점과 색상 및 Rf값 동일
수 분		7.5% 이하	6.6%
회 분		10.0% 이하	8.5%
뭍은 엑스함량		37.0% 이상	41.3%
함량	Kaurenoic acid	2.55mg/g 이상	2.88mg/g
	Lycorine	1.42mg/g 이상	1.62mg/g
	Crinamine	1.31mg/g 이상	1.52mg/g

5. 오가피와 문주란 추출물 복합제의 안정성시험 결과

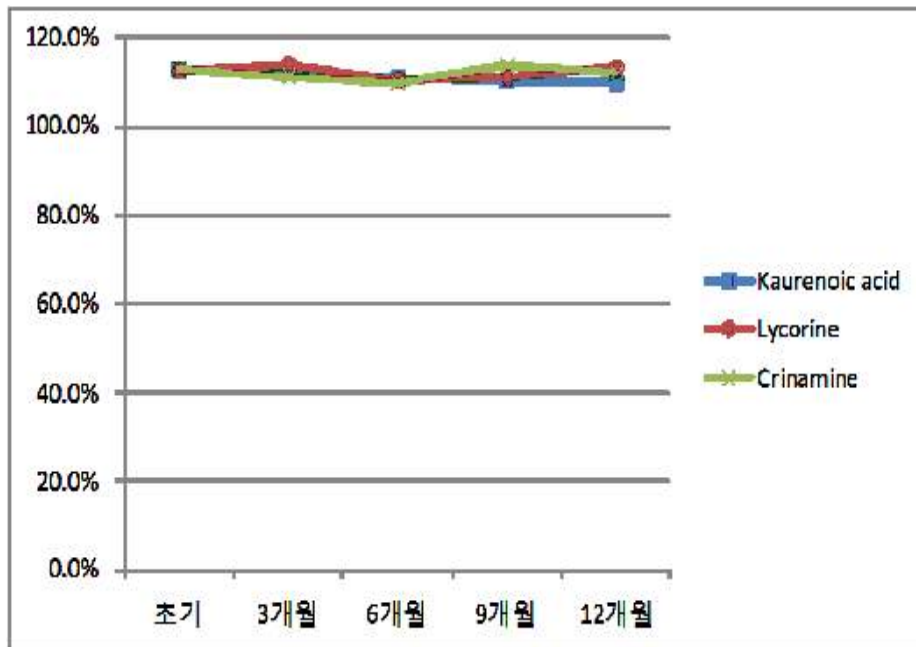
- 오가피와 문주란 추출물 복합제의 안정성시험 결과 지표성분인 kaurenoic acid, lycorine, corinamine의 함량은 장기보존시험에서 12개월, 가속시험에서 12개월 보관에서 변화가 일어나지 않았으며, 이화학적 분석항목인 수분, 회분 등의 실험결과도 안정

하계 나타남

가. 장기보존시험

- 보존조건 : 25±2℃/상대습도 60±5
- 시험기간 : 2013. 6. 25 ~ 2014. 6. 24

항목	시험기준	초기	3개월	6개월	9개월	12개월	
성상	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	
수분	7.50%이하	6.61%	6.63%	6.63%	6.65%	6.64%	
회분	10.00%이하	8.81%	8.79%	8.73%	8.80%	8.71%	
함량	Kaurenoic acid	2.55mg/g이상	2.88 (112.9%)	2.87 (112.5%)	2.83 (111.0%)	2.82 (110.6%)	2.80 (109.8%)
	Lycorine	1.42mg/g이상	1.60 (112.7%)	1.62 (114.1%)	1.57 (110.6%)	1.58 (111.3%)	1.61 (113.4%)
	Crinamine	1.31mg/g이상	1.48 (113.0%)	1.46 (111.5%)	1.44 (109.9%)	1.49 (113.7%)	1.47 (112.2%)
판정	적합	적합	적합	적합	적합	적합	

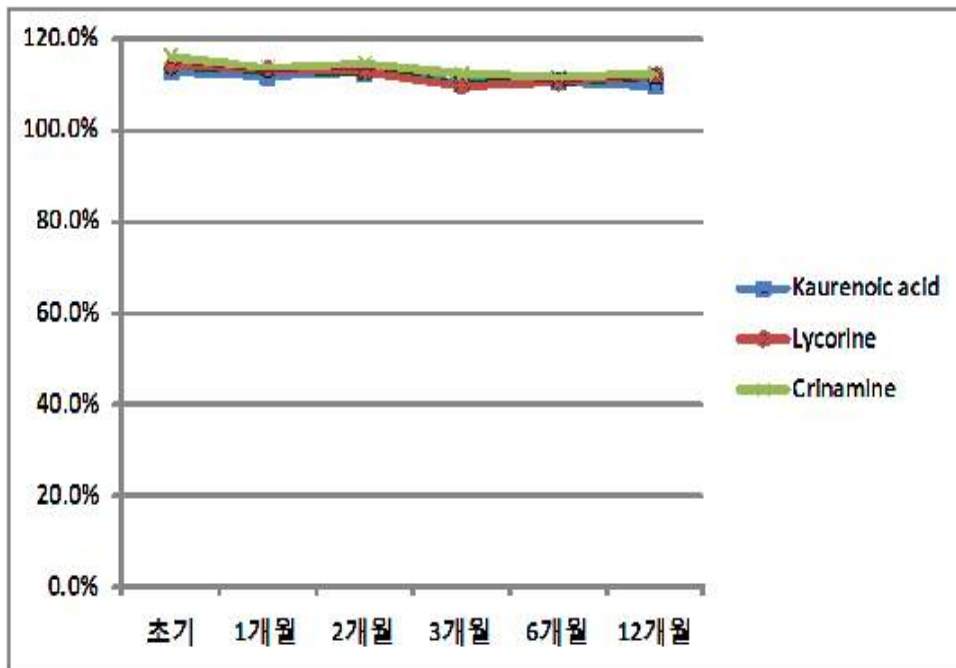


<장기보존시험의 지표성분 함량 변화>

나. 가속시험

- 보존조건 : 40±2℃/상대습도 75±5
- 시험기간 : 2013. 6. 25 ~ 2014. 6. 24

항목	시험기준	초기	1개월	2개월	3개월	6개월	12개월	
성상	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	연갈색의 분말	
수분	7.5%이하	6.61%	6.65%	6.68%	6.70%	6.70%	6.75%	
회분	10.0%이하	8.81%	8.80%	8.71%	8.75%	8.77%	8.81%	
함량	Kaurenoic acid 이상	2.83mg/g (112.9%)	2.88 (111.8%)	2.85 (111.8%)	2.87 (112.5%)	2.81 (110.2%)	2.82 (110.6%)	2.80 (109.8%)
	Lycorine 이상	1.58mg/g (114.1%)	1.62 (114.1%)	1.61 (113.4%)	1.60 (112.7%)	1.56 (109.9%)	1.57 (110.6%)	1.59 (112.0%)
	Crinamine 이상	1.46mg/g (116.0%)	1.52 (116.0%)	1.49 (113.7%)	1.50 (114.5%)	1.47 (112.2%)	1.46 (111.5%)	1.47 (112.2%)
관정	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	



<가속시험의 지표성분 함량 변화>

6. 오가피와 문주란 추출물 복합제의 제제연구 결과

- 오가피와 문주란 추출물 복합제에 제제연구를 진행하여 흡수율이 증진된 최적 formulation 도출(표6)

표 6. 제제시험결과			
원료명	함량(%)	원료명	함량(%)
추출물 복합제	4.0	Copovidone	0.05
Dexpanthenol	1.0	Citric acid	0.05
Propyl gallate	0.05	Ethanol	50.0
Conc. glycerin	10.0	Distilled water	적량
Polyoxyloleyether	1.0	Transcutol	5.0
Labrasol	10.0		

7. 오가피와 문주란 추출물 복합제의 마우스 발모효능 평가

- 마우스에서 오가피와 문주란 추출물 복합제의 발모 촉진 효과 확인 위해 Kang 등의 방법(Hee Kyoung Kang et al.. *Eur J Dermatol*, 20(1):42-48, 2010) 이용 실험 수행 (이하, 오가피 'AK', 문주란 'CA'로 명칭)
- 휴지기(catagen) 앞둔 5주령 마우스(C57BL/6, SLC Japan, 15-18 g)를 1주일 사육실에 적응시킨 후, 마취제를 근육 투여하여(2.5 mg/개체) 마취시킨 마우스의 등 부위 털 제거 모기로 제거
- 군 분리 후 등 부위에 0.2 ml 약물 하루에 한 번씩 4주 동안 도포. 양성대조군 5% 미녹시딜 사용
- 마우스 등 부위 디지털 카메라(Canon, Japan)로 촬영 후 이미지 화상분석기(Image analyzer/Image-Pro, USA) 이용 채성장면적(털을 제거한 면적 대비 신생모 자란 면적비) 계산
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 개별추출물의 효능시험을 마우스에서 진행한 결과 오가피(AK), 문주란(CA) 개별추출물 1% 도포군에서 미녹시딜 대비 각각 55% (P <0.05), 56% (P <0.01)로 발모효과가 유사하게 나타나 복합제 배합비율을 1:1로 정함(표7)
- 마우스에서 오가피(AK), 문주란(CA) 개별추출물과 추출물 복합제의 발모효능 비교 결과, 복합제(1:1) 1% 도포군 control군 대비 뚜렷한 발모효과 나타냈으며 미녹시딜 대비 77% (P <0.001)의 유의적 발모효과 나타낸 반면, 오가피(AK), 문주란(CA) 개별추출물 1% 도포군 미녹시딜 대비 각각 55% (P <0.05), 56% (P <0.01) 발모효과 나타내어 개별추출물보다 복합제의 발모효과 우수함 확인(표7)

표 7. 오가피(AK)와 문주란(CA) 개별추출물과 추출물 복합제 발모효능		
실험군(약물도포 25일)	재성장면적값	5% Minoxidil 대비 발모 효능
Control	28.18±7.97	-
1% AK/CA 추출물 복합제 1:1	73.40±14.78***	77%
1% AK 개별추출물	52.12±28.05*	55%
1% CA 개별추출물	53.03±17.04**	56%
5% Minoxidil	94.94±8.27***	100%

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 1%, 2%를 배합비율 1:1, 1:2로 달리하여 발모효능 평가
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 2% 1:1 도포군 미녹시딜 대비 71% (P <0.01)의 유의적 발모효과 나타냈으나, 복합제 1%, 2% 1:2 도포군 각각 42% (P <0.01), 43% (P <0.01) 발모효과 나타냄(표8)

표 8. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제의 배합비율별 발모효능		
실험군(약물도포 25일)	재성장면적값	5% Minoxidil 대비 발모 효능
Control	7.69±5.07	-
1% AK/CA 추출물 복합제 1:1	28.59±13.27**	36%
2% AK/CA 추출물 복합제 1:1	55.60±25.87**	71%
1% AK/CA 추출물 복합제 1:2	33.09±18.69**	42%
2% AK/CA 추출물 복합제 1:2	33.97±14.53**	43%
5% Minoxidil	78.72±15.64***	100%

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 2%, 4%를 배합비율 1:1, 2:1로 달리하여 발모효능 평가
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 4% 1:1 도포군 미녹시딜 대비 78% (P <0.05)의 유의적 발모효과 나타냈으나, 복합제 2%, 4% 2:1 도포군 각각 33%, 60% 발

모효과 나타냄(표9)

표 9. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제의 배합비율별 발모효능		
실험군(약물도포 25일)	재성장면적값	5% Minoxidil 대비 발모 효능
Control	32.27±15.96	-
2% AK/CA 추출물 복합제 1:1	54.61±27.60	66%
4% AK/CA 추출물 복합제 1:1	64.92±27.63*	78%
2% AK/CA 추출물 복합제 2:1	27.17±13.65	33%
4% AK/CA 추출물 복합제 2:1	50.05±29.48	60%
5% Minoxidil	82.75±17.05***	100%

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 2%를 배합비율 1:1, 1:3, 3:1로 달리하여 발모효능 평가
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 1:1 도포군 미녹시딜 대비 82% (P <0.001)의 유의적 발모효과 나타냈으나, 복합제 1:3, 3:1 도포군 각각 60% (P <0.05), 63% (P <0.05) 발모효과 나타내어 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 배합비율 1:1 결정(표10)

표 8. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제의 배합비율별 발모효능		
실험군(약물도포 18일 기준)	재성장면적값	5% Minoxidil 대비 발모 효능
Control	19.95±18.19	-
2% AK/CA 추출물 복합제 1:1	74.44±19.63***	82%
2% AK/CA 추출물 복합제 1:3	54.06±36.70*	60%
2% AK/CA 추출물 복합제 3:1	56.54±31.39*	63%
5% Minoxidil	90.46±7.56***	100%

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 1:1 비율에서 2%, 4%, 6% 농도별 발모효능 평가

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 4% 도포군 미녹시딜 대비 91% ($P < 0.001$) 유의적 발모효과 나타냈으며, 복합제 2%, 6% 도포군은 각각 75% ($P < 0.05$), 77% ($P < 0.01$) 발모효과 나타내어 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 4% 결정(그림4)

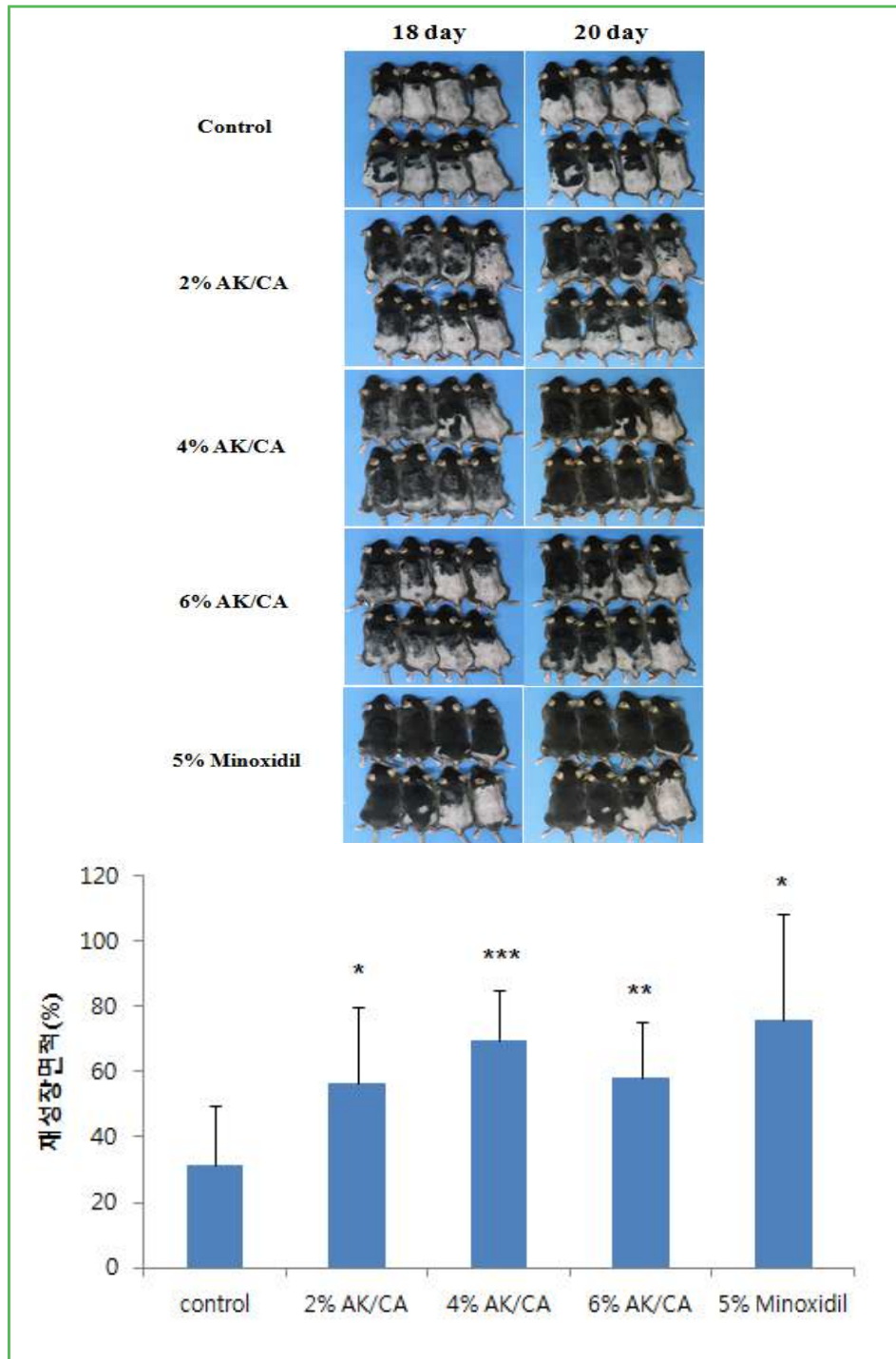
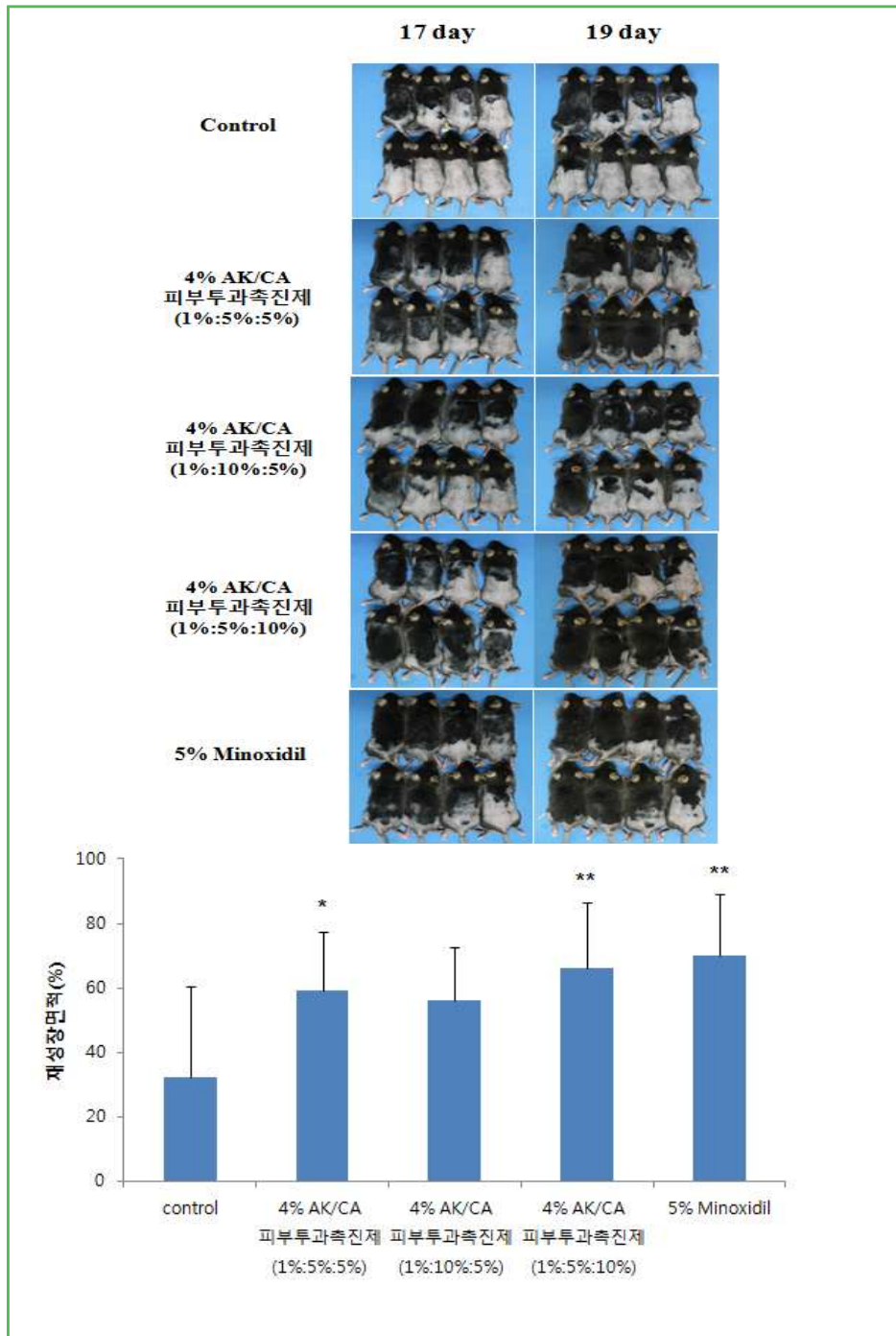


그림 4. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제의 농도별 발모효능

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 4%에 formulation을 적용하여 발모효능 평가

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 4%에 피부투과촉진제(Polyoxyloleyether : Transcutol : Labrasol = 1%:5%:10%) 도포 시 미녹시딜 대비 94% (P <0.01)의 유의적 발모효과 나타내었으며, 피부투과촉진제 1%:5%:5%, 1%:10%:5%,도포군은 각각 85% (P <0.05), 80% 발모효과 나타냄(그림5)



(피부투과촉진제 Polyoxyloleyether : Transcutol : Labrasol)

그림 5. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제의 formulation에 따른 발모효능

- 마우스에서의 발모효능시험 결과 오가피(AK)와 문주란(CA) 1:1 추출물 복합제 4%에 피부투과촉진제(Polyoxyloleyether : Transcutol : Labrasol = 1%:5%:10%) 도포 시 기존 제품인 5% 미녹시딜 대비 유의적인 발모 효과 확인하였음

[제1협동]

□ *in vitro* 효능 평가 및 기전 연구

1. Dermal papilla cells의 성장 효능 평가

- 모낭은 여러 종류의 상피세포들과 dermal papilla cells간의 상호작용에 의해 형성되며, dermal papilla cells은 모낭의 형성, 재생 및 모발의 성장에서 중요한 역할을 함. 특히 dermal papilla cells의 성장증식은 모발주기 중 성장기로의 유도 및 유지에 있어 필요함. Dermal papilla cells의 성장 효능 평가는 rat 의 vibrissa follicles로부터 유래된 불멸화된 dermal papilla cells을 사용하였음
- 연구방법: 흰쥐 콧털 불멸화된 모유두 세포(rat vibrissa immortalized dermal papilla cells)를 100 units/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin (Gibco Inc, NY, USA)과 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco Inc, NY, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: Hyclone Inc, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3 일마다 계대배양 하였음. Rat vibrissa immortalized dermal papilla cells의 증식은 다음과 같이 MTT assay를 이용하여 측정하였음. Rat vibrissa immortalized dermal papilla cells (1.0×10⁴ cells/mL)을 1% FBS를 포함한 DMEM 배지에 혼탁하여 96 well plate에 넣고 24시간 배양 후 시료들을 여러 농도로 처리하였음. 양성 대조군인 minoxidil (MXD: Sigma, MO, USA)는 10 µM의 농도가 되게 처리하였음. 4 일 동안 배양한 후 50 µL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT: Sigma, MO, USA; 2 mg/mL)를 첨가하여 4 시간 동안 반응시킨 다음 상층액은 제거하고 DMSO 200 µL를 가하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였음. 각 시료군의 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식정도를 조사하였음
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제가 모유두 세포 증식 효과가 있는지 rat vibrissa immortalized dermal papilla cells을 사용하여 조사하였음
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1), (1:3) 및 (3:1)을 0.4, 1, 2, 4, 10 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 처리군 모두에서 rat vibrissa immortalized dermal papilla cells의 증식이 유의성 있게 증가하였음(그림6-8). 특히, 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1) 1 µg/mL, (1:3) 2 µg/mL 및 (3:1) 4 µg/mL 처리군에서 가장 높은 rat vibrissa immortalized dermal papilla cells 증식 효능을 나타내었음(그림

6-8). 한편, 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 중 (1:1) 및 (1:3)은 가장 높은 rat vibrissa immortalized dermal papilla cells 증식 효능을 나타내었던 농도에서 AK와 CA의 단독 처리군 및 양성대조군인 10 μ M MXD (116.7%)와 비교하여 비슷하거나 다소 높은 rat vibrissa immortalized dermal papilla cells 증식 효능을 나타내었음 (그림6-11)

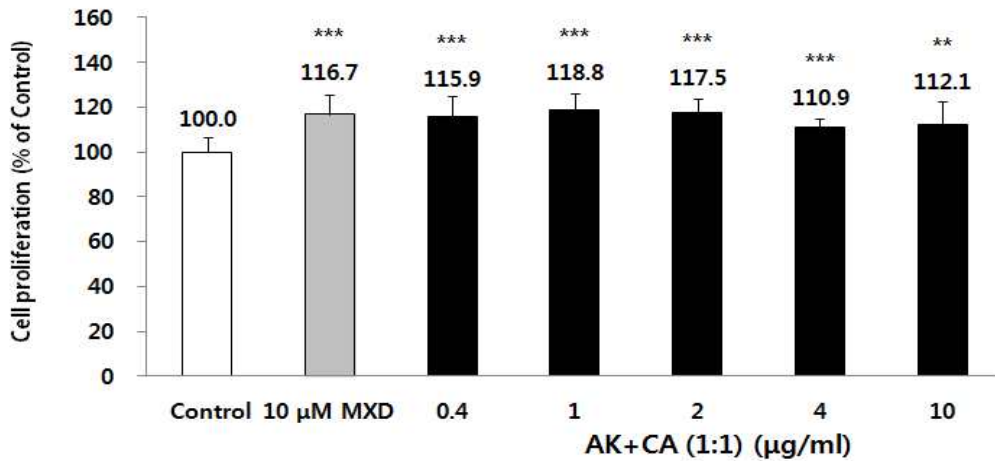


그림 6. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제(1:1)의 dermal papilla cells 증식 효능

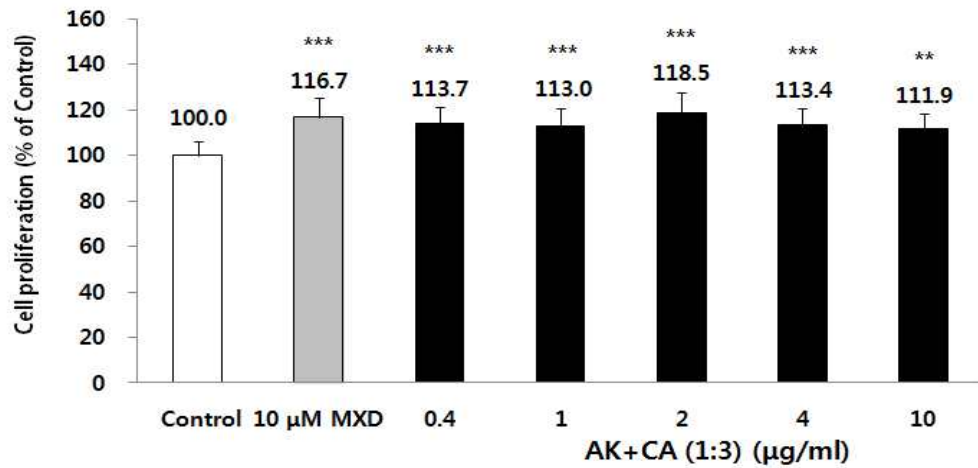


그림 7. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제(1:3)의 dermal papilla cells 증식 효능

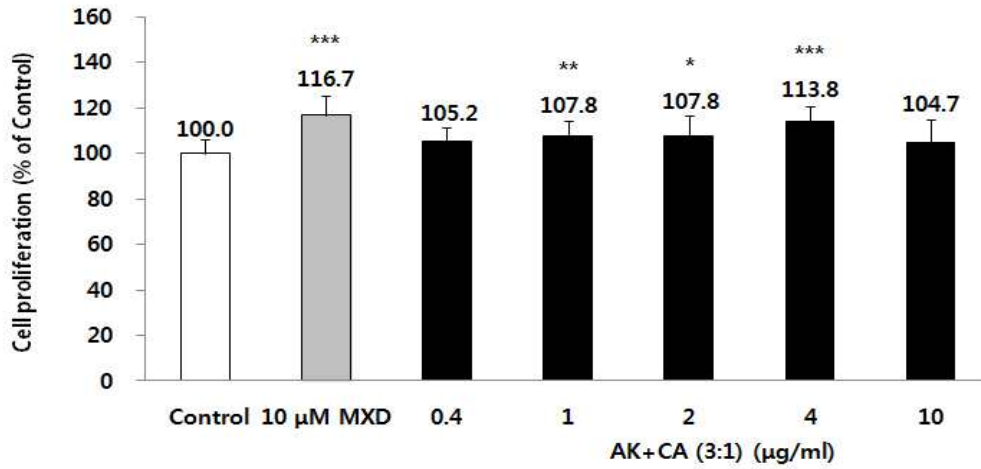


그림 8. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제(3:1)의 dermal papilla cells 증식 효능

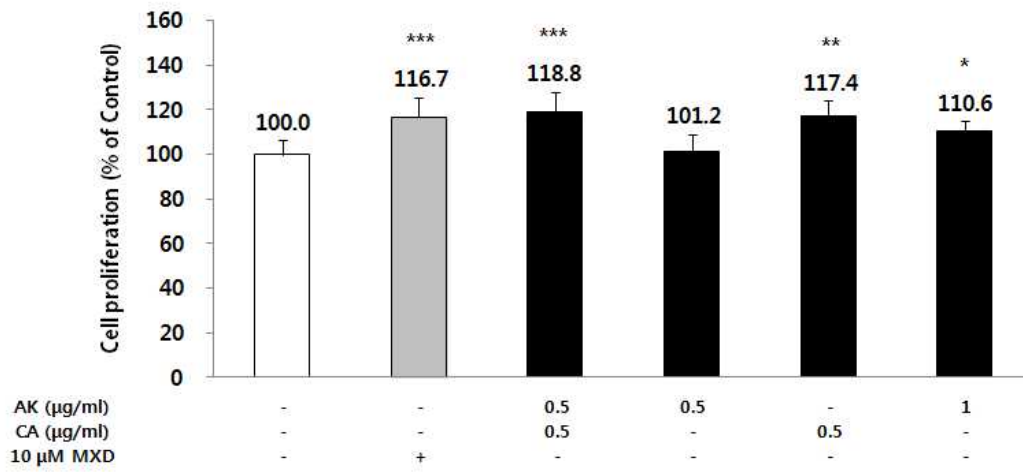


그림 9. 오가피(AK)와 문주란(CA) 복합제(1:1)과 개별추출물의 dermal papilla cells 증식 효능

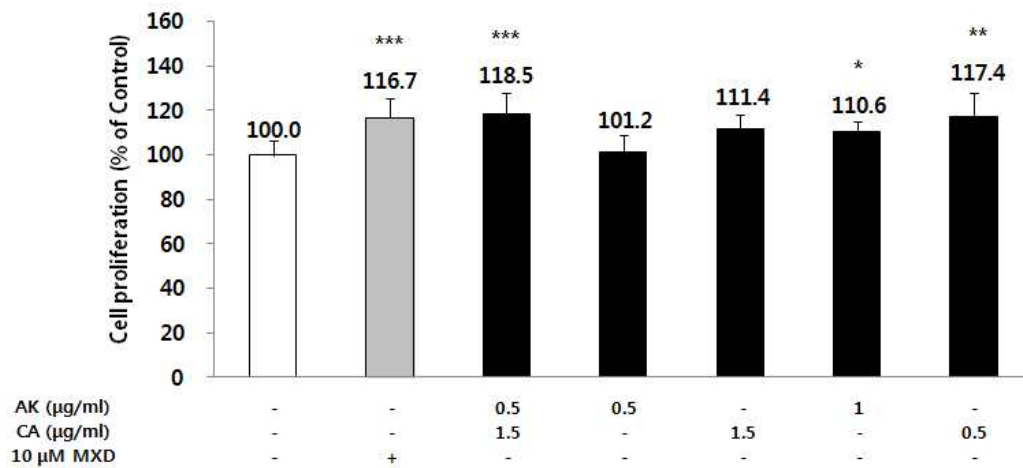


그림 10. 오가피(AK)와 문주란(CA) 복합제(1:3)과 개별추출물의 dermal papilla cells 증식 효능

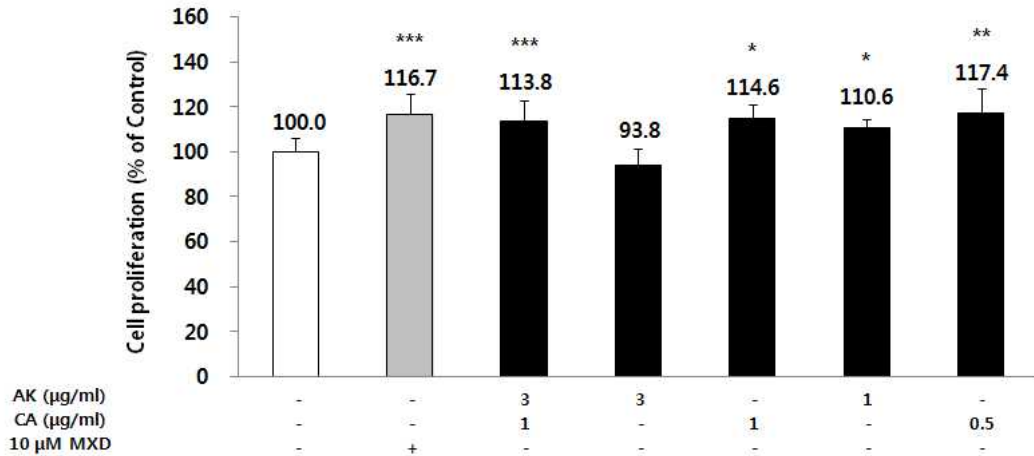


그림 11. 오가피(AK)와 문주란(CA) 복합제(3:1)과 개별추출물의 dermal papilla cells 증식 효능

- 오가피(AK)와 문주란(CA)의 추출물 복합제가 모두두 세포 증식 효과가 있는지 rat vibrissa immortalized dermal papilla cells를 사용하여 조사하였음
- 오가피(AK)와 문주란(CA)의 추출물 복합제 (1:1)을 0.4, 1, 2, 4 및 10 μg/mL의 농도로 처리하였을 때, 1 μg/mL 처리군에서 rat vibrissa immortalized dermal papilla cells의 증식이 유의성 있게 증가하였으며, 양성대조군인 10 μM MXD (107.0%)와 비슷한 정도의 rat vibrissa immortalized dermal papilla cells 증식 효능을 나타내었음 (그림12)

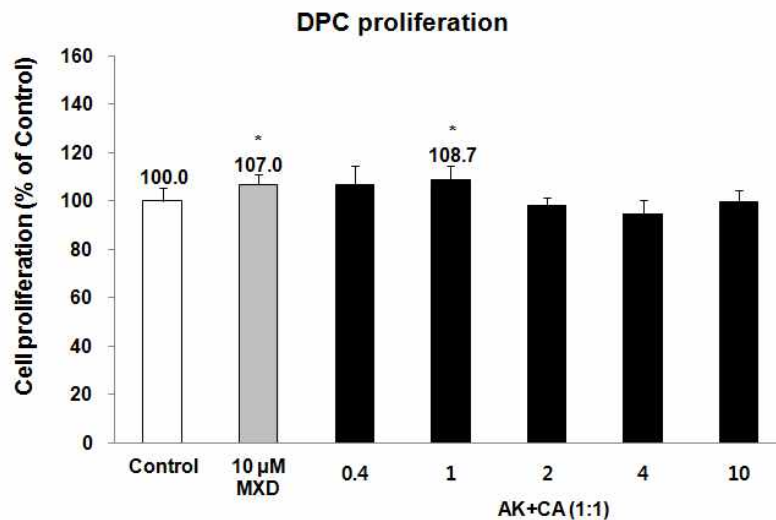


그림 12. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제의 dermal papilla cells 증식 효능

2. 5α-Reductase 억제 활성 평가분석

- 안드로젠성 탈모에서 중요한 작용을 하는 dihydrotestosterone (DHT)의 생성을 억제 하는 효능이 있는지 5α-reductase 활성을 조사함. 5α-Reductase 활성은 rat prostate 5 α-reductase를 이용하여 첨가한 [³H]testosterone (T)이 [³H]DHT로 전환되는 양으로 평가하였음

- 연구방법: 7-8주령 된 SD 수컷을 ethyl ether로 마취시킨 후 경추도살 하여 전립선을 적출하고, 곧바로 액체질소에 넣어서 보관하였음. 실험마다 필요한 양의 전립선을 꺼내어 사용하였음. 전립선을 4°C의 homogenizer buffer [20 mM potassium phosphate (pH6.6), 0.32 M sucrose, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.2 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)]를 넣은 glass homogenizer에 넣고 뿌엿게 될 때까지 분쇄하였음. 원심분리 (100,000 g, 90분, 4°C) 후 얻은 pellet은 두 번 세척하였고, homogenizer buffer를 넣어서 suspension하여 crude enzyme으로 사용하였음. 5 α -Reductase assay는 다음과 같이 수행하였음. Microtube에 crude enzyme과 시료 및 reaction buffer (40 mM potassium phosphate (pH6.6), 200 μ M NADPH, 1 mM DTT, 120 nCi [1,2,6,7-³H]T)를 넣어 최종 반응액을 500 μ L로 맞춘 후, 37°C에서 60분간 반응시켰음. 1 mL의 ethyl acetate를 넣고 vortex 후, 원심분리(1000 g, 5분)하여 상층액을 취해서 새로운 microtube로 옮긴 후, heating plate (60°C)를 이용하여 완전히 건조하였음. Microtube에 50 μ L의 ethyl acetate를 넣고, TLC plate에 spotting하고 전개용매(50% cyclohexane, 50% ethyl acetate) 하에서 3회 전개하였음. UV spectrometer로 254 nm에서 T를 확인하고 10% 황산을 뿌려서 DHT를 확인하였음. T와 DHT 부위를 가위로 오려내서 각각의 scintillation vial에 넣고 cocktail 10 mL 넣어 β - counter로 측정하였음. 5 α -Reductase 활성화에 의한 T의 전환율을 DHT/(T+DHT)의 비로 계산하였음. Type2 5 α -reductase 억제 효능을 갖는 finasteride (Propecia®: Merck Sharp & Dohme (Australia) Pty. Ltd., Australia)를 양성 대조군으로 사용하였음
- 문주란(CA) 추출물이 5 α -reductase 활성화 억제 효능이 있는지 rat prostate 5 α -reductase를 이용하여 첨가한 [3H]testosterone (T)이 [³H]dihydrotestosterone (DHT)로 전환되는 양으로 평가하였음
- 그 결과, 문주란(CA) 추출물을 처리하였을 때, 1 μ g/mL의 농도에서 문주란(CA) 추출물에 의하여 5 α -reductase 활성이 16.2% 정도 억제됨이 관찰되었음. 양성 대조물질로 사용한 finasteride에 의하여 5 α -reductase 활성이 93% (P<0.001) 정도 유의성 있게 억제됨이 관찰되었음(그림13)

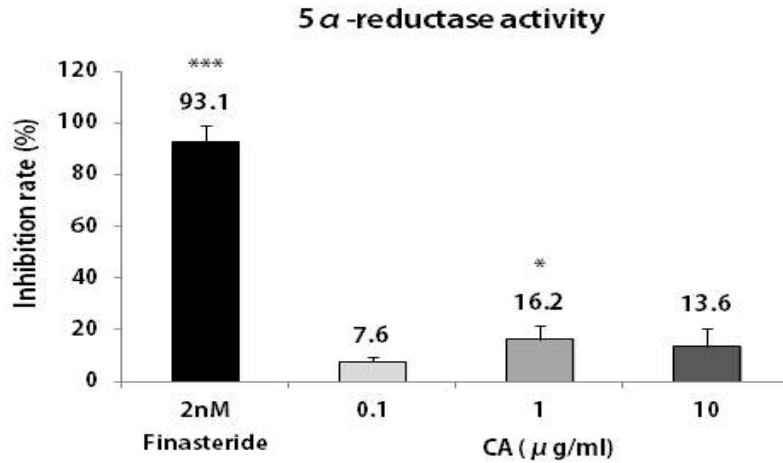


그림 13. 문주란(CA) 추출물의 5α-reductase 억제 활성

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 및 오가피(AK) 추출물이 5α-reductase 활성 억제 효능이 있는지 rat prostate 5α-reductase를 이용하여 첨가한 [³H]testosterone (T)이 [³H]dihydrotestosterone (DHT)로 전환되는 양으로 평가하였음
- 그 결과, 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1) 및 오가피(AK) 추출물을 0.1, 1 및 10 μg/mL의 농도로 처리하였을 때, 1 μg/mL의 농도에서 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1)에 의하여 5α-reductase 활성이 12.9% 정도 억제됨이 관찰되었음. 반면, 오가피 (CA) 추출물은 5α-reductase 활성에 영향을 미치지 않음이 확인되었음. 양성 대조 물질로 사용한 finasteride에 의하여 5α-reductase 활성이 유의성 있게 억제됨이 관찰되었음(그림14)

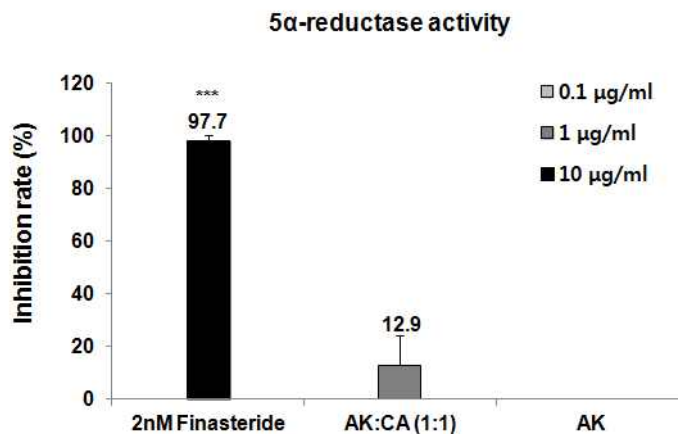


그림 14. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 및 오가피 추출물의 5α-reductase 억제 활성

3. NIH3T3 fibroblast cells의 증식 효능 평가

- 옥모효능을 갖는 minoxidil은 ATP-sensitive K^+ -channel opening에 의해 모발성장을 촉진함이 알려짐. Minoxidil은 NIH3T3 fibroblast cells에서 ATP-sensitive K^+ -channel opener로 작용하여 mitogenic 효과를 나타내며, 그 효과는 ATP-sensitive K^+ -channel blocker에 의하여 차단됨. 따라서 본 연구에서는 NIH3T3 fibroblast cell을 이용하여 오가피(AK)와 문주란(CA)의 개별추출물 및 복합제가 ATP-sensitive K^+ -channel opener로 작용하여 모발성장을 촉진할 수 있는지 알아보려고 하였음
- 연구방법: NIH3T3 fibroblast cells를 100 units/mL penicillin G (Gibco Inc, NY, USA)와 10% heat-inactivated bovine calf serum (BCS; Gibco Inc, NY, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: ATCC, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 3 일마다 계대배양 하였음. NIH3T3 fibroblast cells의 증식은 다음과 같이 MTT assay를 이용하여 측정하였음. NIH3T3 fibroblast cells (1.0×10^4 cells/mL)을 10% 또는 2% BCS를 포함한 DMEM 배지에 혼합하여 96 well plate에 넣고 24시간 배양 후 시료들을 여러 농도로 처리하였음. 양성 대조군인 minoxidil (MXD: Sigma, MO, USA)는 75 μ M의 농도가 되게 처리하였음. 4 일 동안 배양한 후 50 μ L의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT: Sigma, MO, USA; 2 mg/mL)을 첨가하여 4 시간 동안 반응시킨 다음 상층액은 제거하고 DMSO 200 μ L를 가하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였음. 각 시료군의 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식정도를 조사하였음
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 개별추출물 및 복합제가 ATP-sensitive K^+ -channel opening 효과가 있는지 NIH3T3 fibroblast cells을 사용하여 조사하였음
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 개별추출물을 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때, 오가피(AK) 및 문주란(CA) 추출물에 의한 NIH3T3 fibroblast cells의 증식은 관찰되지 않았음(그림 15-16)
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1), (1:3) 및 (3:1)을 0.4, 1, 2, 4, 10 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때, 오가피(AK) 및 문주란(CA) 추출물 복합제에 의한 NIH3T3 fibroblast cells의 증식은 관찰되지 않았음(그림 13-15). 그에 비해 양성대조군인 75 μ M MXD를 처리하였을 때, MXD에 의한 NIH3T3 fibroblast cells의 증식은 유의성 있게 증가하였음(그림 15-19)

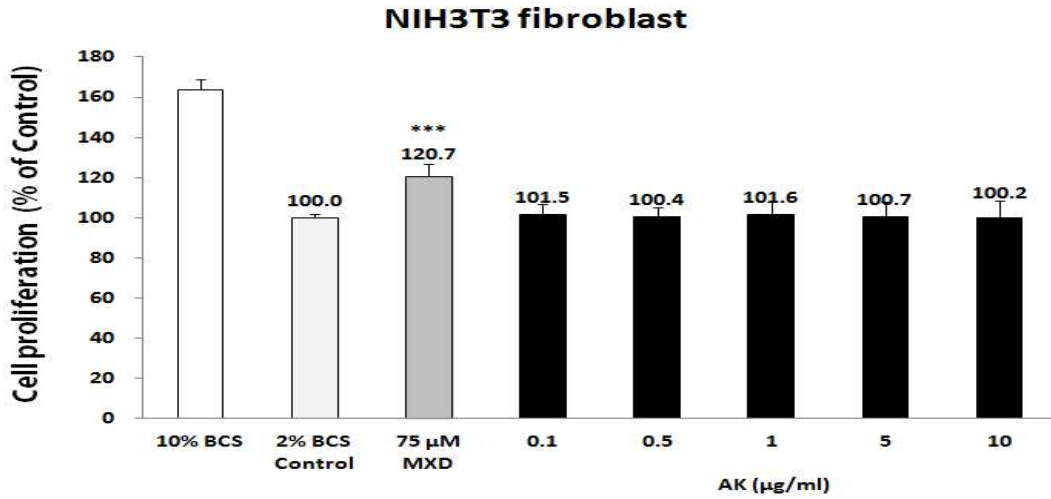


그림 15. 오가피(AK) 추출물의 NIH3T3 fibroblast cells 증식 효능

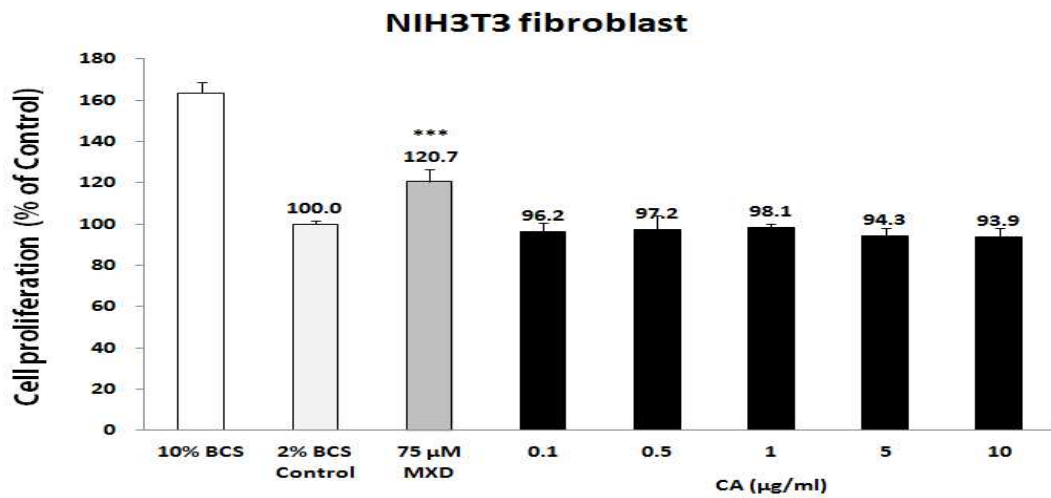


그림 16. 문주란(CA) 추출물의 NIH3T3 fibroblast cells 증식 효능

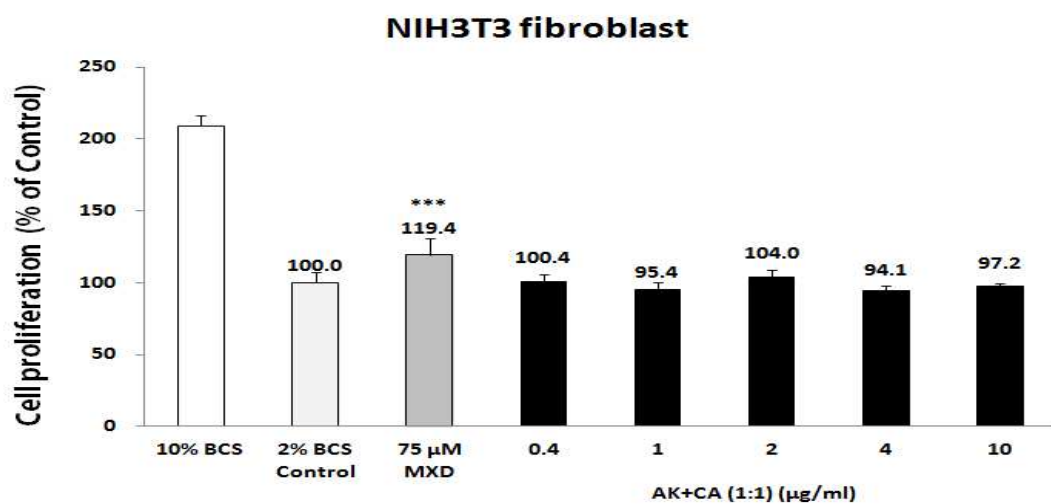


그림 17. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합체 (1:1)의 NIH3T3 fibroblast cells 증식 효능

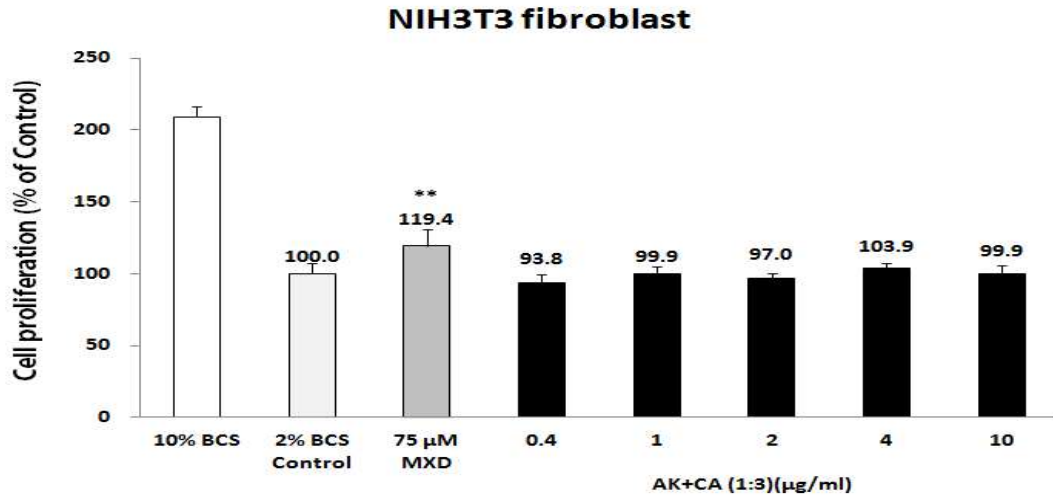


그림 18. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제(1:3)의 NIH3T3 fibroblast cells 증식 효능

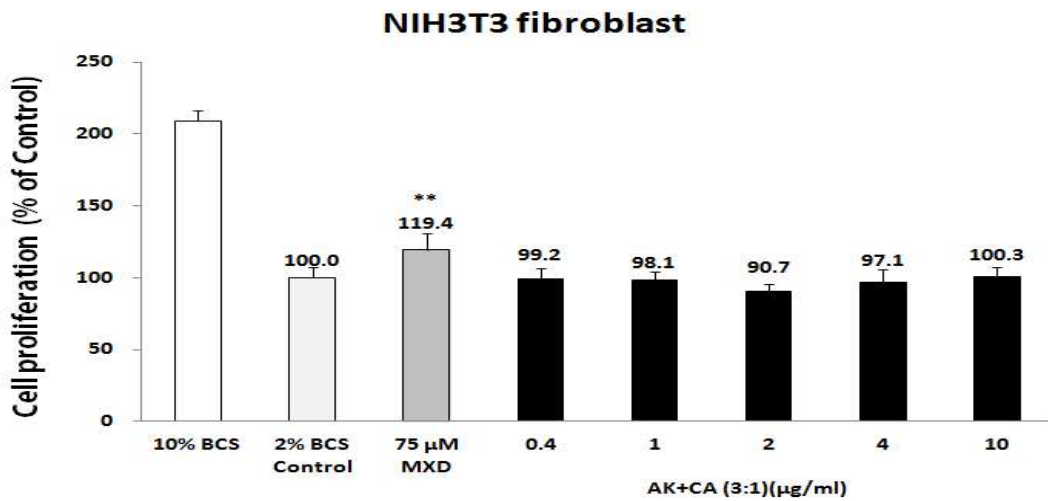


그림 19. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제(3:1)의 NIH3T3 fibroblast cell 증식 효능

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제가 ATP-sensitive K^+ -channel opening 효과가 있는지 NIH3T3 fibroblast cells를 사용하여 조사하였음
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1)을 0.4, 1, 2 및 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 오가피(AK)와 문주란(CA)의 혼합 추출물 (1:1)에 의한 NIH3T3 fibroblast cells의 증식은 관찰되지 않았음(그림20)

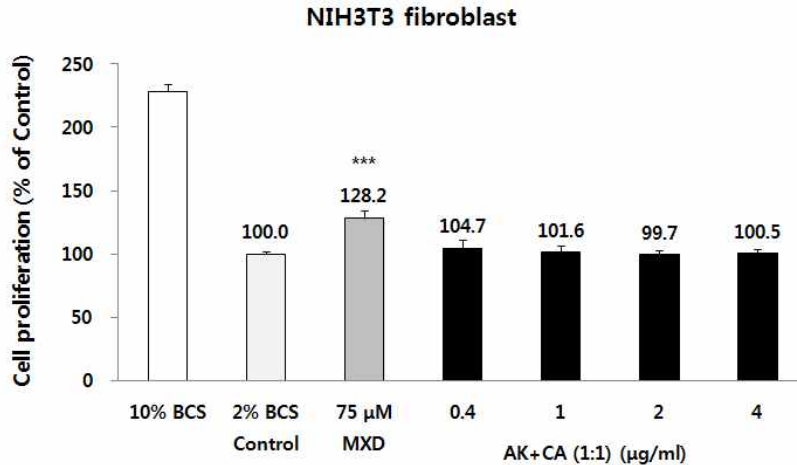


그림 20. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1)의 NIH3T3 fibroblast cell 증식 효능

4. 모발주기 조절 인자들의 발현 변화 분석

- 모낭의 형성, 재생, 모발의 성장주기 조절에 있어, Wnt ligand에 의해 활성화되는 Wnt/ β -catenin signaling pathway가 중요한 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있음. Wnt/ β -catenin signaling pathway는 모발에 존재하는 줄기세포의 기능 조절뿐만 아니라 dermal papilla cells의 성장증식에 관여함. 모발성장 촉진제인 minoxidil은 dermal papilla cells에서 Wnt/ β -catenin signaling pathway의 활성화를 통해 모발의 성장기를 유지함
- 연구방법: Rat vibrissa immortalized dermal papilla cells (1.0×10^5 cells/mL)을 1% FBS를 포함한 DMEM 배지에 혼탁하여 dish에 넣고 24시간 배양 후 시료들을 처리한 다음 24 시간동안 배양하였음. 세포는 phosphate-buffered saline (PBS)로 2~3회 세척한 다음 200 μ L의 lysis buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었음. 단백질의 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준 물질로 사용하여 Protein Assay Kit (BIO-RAD, HC, USA)로 정량하였음. 그 후 20~30 μ g lysate를 10% mini gel Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 변성 분리하여 polyvinylidene difluoride membrane (BIO-RAD, NC, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer 하였음. 그리고 5% skin milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20+TBS) 용액에서 membrane의 blocking을 상온에서 2시간 실시하였음. 단백질 발현을 확인하기 위한 1차 항체로는 Rabbit-polyclonal anti- β -catenin (1:2000), anti-phospho(ser552)- β -catenin (1:1000), anti-phospho(ser675)- β -catenin (1:1000), anti-phospho-GSK-3 β (1:1000), anti-GSK-3 β (1:1000), anti-Cyclin D1 (1:1000), anti-phospho-CDK2 (1:1000), anti-CDK2 (1:1000), anti-phospho-Erk (1:1000), anti-Erk (1:1000), anti-phospho(ser780)-pRB (1:1000), anti-Cyclin E (1:1000) 및 Mouse-monoclonal anti- β -Actin (1:5000)을 사용하였음. 각각의 항체들은 1% BSA를 포함한 TTBS 용액에 희석하여 사용하였으며, antibody 반응은 4°C에서 overnight 실시하였음. 2차 항체

로는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-rabbit IgG 또는 anti-mouse IgG를 TTBS 용액에 희석(1:5000)하여 상온에서 1시간 실시하였음. 단백질 발현은 WEST-ZOL® plus Western Blot Detection System (iNtRON, Gyeonggi-do, Korea)을 이용하여 X-ray 필름에 감광하여 확인하였음

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 개별추출물 및 복합제가 dermal papilla cells에서 Wnt/ β -catenin signaling pathway 및 세포주기 조절인자들의 발현을 조절하여 모발이 성장기를 유지하는 효과를 나타내는지 알아보기 위하여, rat vibrissa follicles로부터 유래된 immortalized dermal papilla cells에서 단백질을 분리하여 발현변화를 확인하였음. Wnt/ β -catenin signaling pathway의 활성화, 즉 β -catenin의 인산화는 상위조절자인 GSK3 β 인산화에 의해서 조절됨이 알려져 있으며, Akt 및 protein kinase A (PKA) 역시 β -catenin의 인산화 (ser552 및 ser775)를 유도함이 알려져 있음. 세포의 증식은 세포주기 조절인자들에 의해 조절되며, 세포주기 조절인자들은 Erk의 인산화에 의해서 조절됨이 알려져 있음. 한편 세포주기 조절인자들은 Wnt/ β -catenin signaling pathway의 target으로도 알려져 있음
- immortalized dermal papilla cells에 오가피(AK)와 문주란(CA) 개별추출물을 24 시간 동안 처리하였을 때, β -catenin의 인산화 및 GSK-3 β 의 인산화는 증가하였음. 반면 Erk의 인산화 및 Cyclin D1 발현, CDK2의 인산화는 영향을 받지 않음을 확인할 수 있었음(그림21-22)

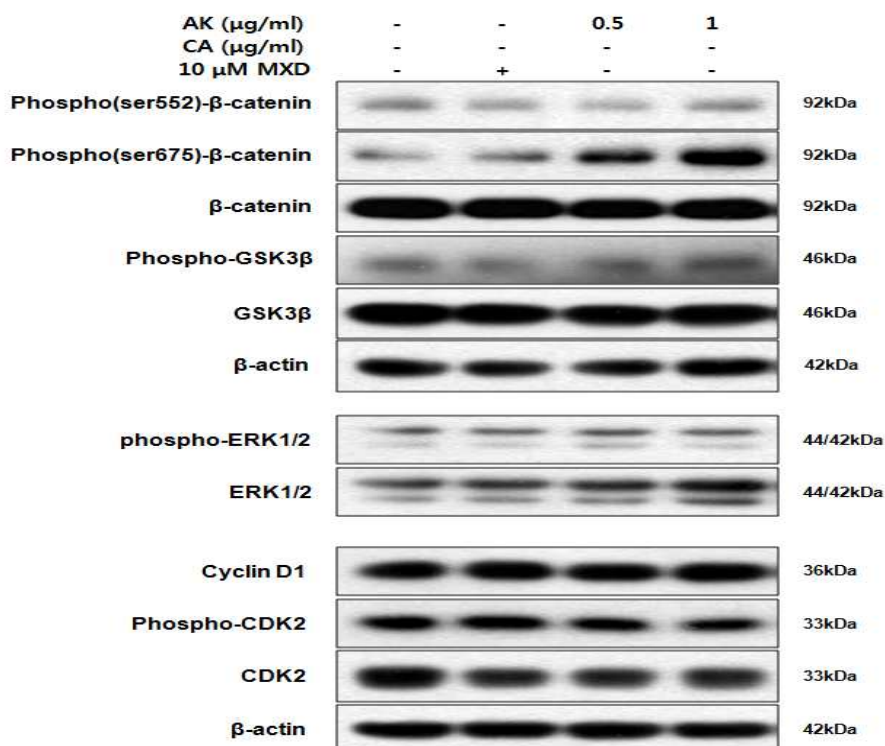


그림 21. 오가피(AK)의 모발주기 조절 인자에서 효능

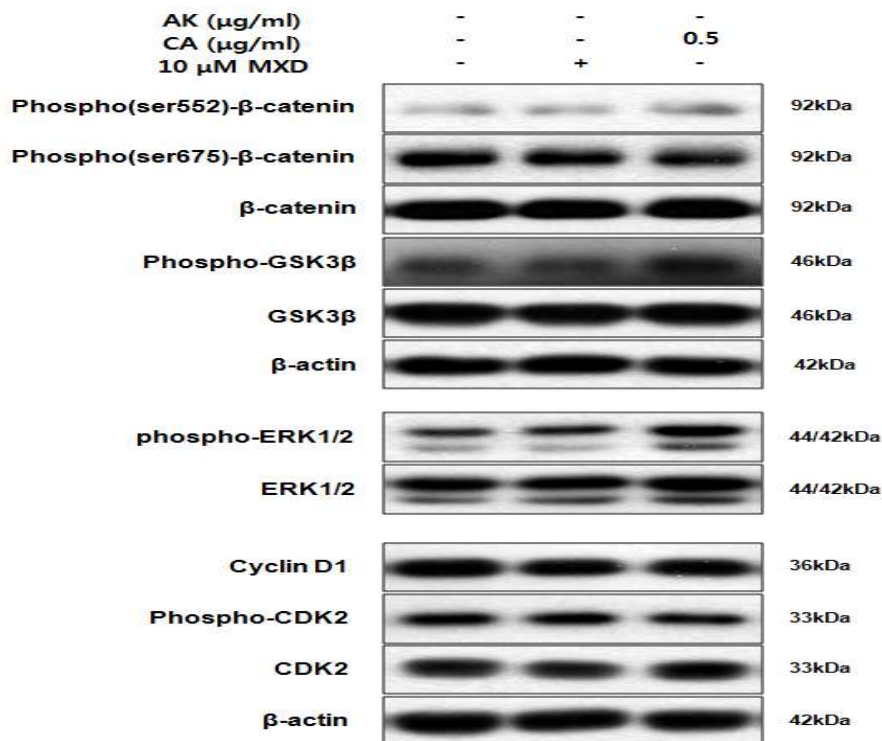


그림 22. 문주란(CA)의 모발주기 조절 인자에서 효능

- Immortalized dermal papilla cells에 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제를 24 시간 동안 처리하였을 때, β-catenin의 인산화 및 GSK-3β 인산화는 증가하였음. Erk의 인산화는 영향을 받지 않았으나, 세포주기 조절인자들 중 세포주기의 G1기에서 S기로의 이동에 중요한 pRB의 인산화를 확인하였음(그림23)

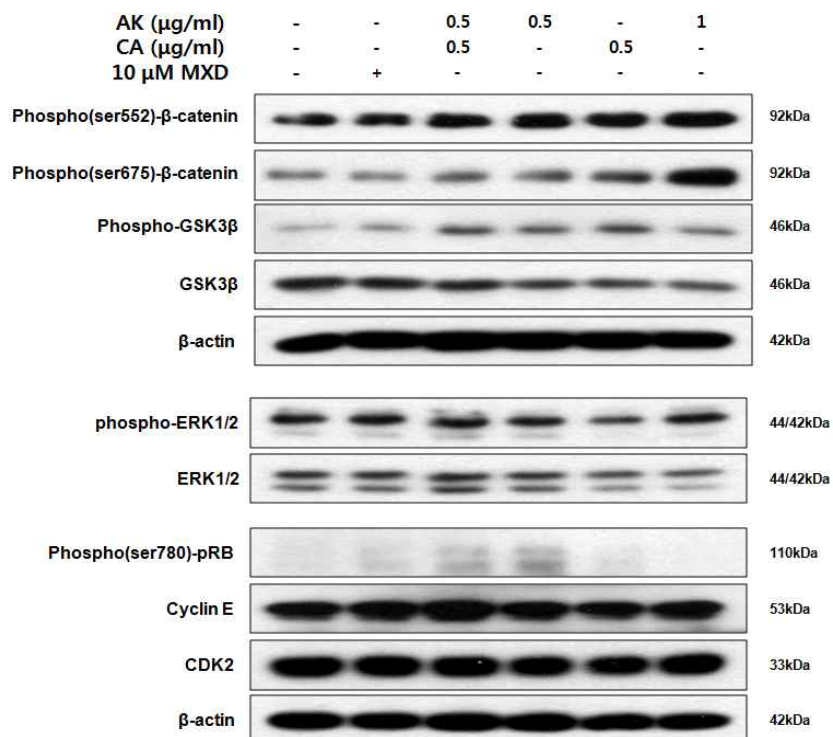


그림 23. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제의 모발주기 조절 인자에서 효능

5. 모발주기 조절 인자들의 발현 변화 분석

- 모낭의 발달 및 모발의 성장주기 조절에 있어 TGF- β signaling pathway가 중요한 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있음. TGF- β 수용체들이 모낭의 epithelial cells에서 발현되며, TGF- β 를 처리하여 배양한 모낭은 퇴행기 형태로의 변화를 나타낸다는 연구 결과로, TGF-signaling pathway의 활성화가 모발주기의 성장기에서 퇴행기로의 이행에 관여하는 것으로 알려짐. 한편 TGF- β signaling pathway의 활성화는 세포의 성장에 관여하는 세포주기의 진행을 저해하는 것으로 알려짐
- 연구방법: Immortalized human keratinocyte (HaCaT) (1.5×10^5 cells/mL)을 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 혼탁하여 dish에 넣고 24시간 배양 후, 세포는 FBS-free DMEM 배지에서 24시간 배양하였음. 그 이후 시료들을 처리한 다음 24 시간동안 배양하였음. 세포는 phosphate-buffered saline (PBS)로 2~3회 세척한 다음 200 μ L의 lysis buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었음. 단백질의 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준물질로 사용하여 Protein Assay Kit (BIO-RAD, HC, USA)로 정량하였음. 그 후 20~30 μ g lysate를 10% mini gel Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 변성 분리하여 polyvinylidene difluoride membrane (BIO-RAD, NC, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer 하였음. 그리고 5% skin milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20+TBS) 용액에서 membrane의 blocking을 상온에서 2시간 실시하였음. 단백질 발현을 확인하기 위한 1차 항체로는 Rabbit-polyclonal anti-phospho(ser780)-RB(1:1000), anti-phospho(thr160)-CDK2 (1:1000), anti-phospho(ser465/467)-Smad2 (1:1000), anti-phospho(ser423/425)-Smad3 (1:1000) 및 Mouse-monoclonal anti-p21 (1:1000) 및 anti- β -Actin (1:5000)을 사용하였음. 각각의 항체들은 1% BSA를 포함한 TTBS 용액에 희석하여 사용하였으며, antibody 반응은 4°C에서 overnight 실시하였음. 2차 항체로는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-rabbit IgG 또는 anti-mouse IgG를 TTBS 용액에 희석(1:5000)하여 상온에서 1시간 실시하였음. 단백질 발현은 WEST-ZOL® plus Western Blot Detection System (iNtRON, Gyeonggi-do, Korea)을 이용하여 X-ray 필름에 감광하여 확인하였음
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1), 오가피 (AK) 유래 단일물질인 acankoreoside J 및 문주란 (CA) 유래 단일물질인 norgalantamine이 immortalized human keratinocyte (HaCaT)에서 TGF- β signaling pathway 및 세포주기 조절인자들의 발현을 조절하여 모발이 성장기를 유지하거나 퇴행기로의 진행을 차단하는 효과를 나타내는지 알아보기 위하여, immortalized human keratinocyte (HaCaT)에서 단백질을 분리하여 발현변화를 확인하였음. TGF- β signaling pathway의 활성화는 세포의 TGF- β 수용체에 TGF- β 의 결합에 의해 일어나며 그 결과 세포주기 진행이 저해될 때 발현되는 p21의 증가를 유도함이 알려져 있음. 한편 수용체에 TGF- β 의 결합은 하위 신

호전달 인자인 Smad2 및 3의 인산화를 유도하여 세포주기 조절인자 중 p21의 발현을 조절함이 알려져 있음

- Immortalized human keratinocyte (HaCaT)에 TGF-β1를 농도별로 24 시간 처리하였을 때, 세포주기 조절인자들 중 세포주기의 G1기에서 S기로의 이동에 필요한 RB의 인산화 및 CDK2의 인산화는 감소하였고 세포주기의 진행을 저해하는 p21의 발현은 증가하였음. 한편 TGF-β1를 시간별로 처리하였을 때, Smad2 및 3의 인산화는 증가함을 확인할 수 있었음(그림 24)

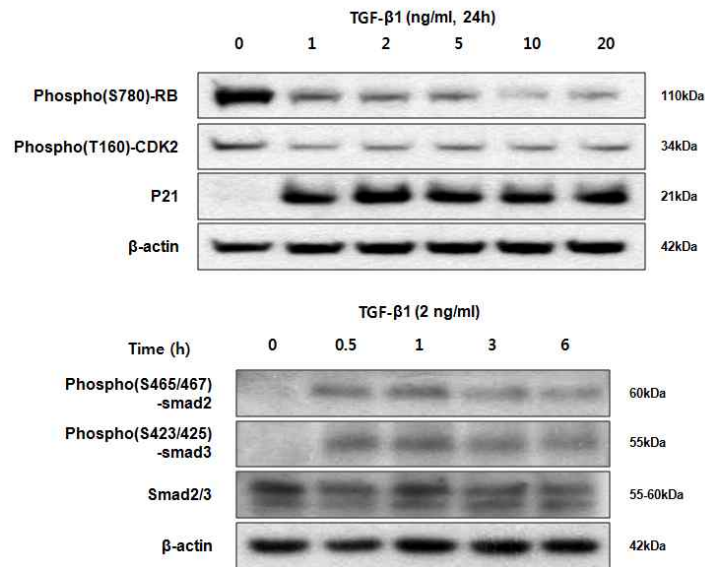


그림 24. TGF-β1의 모발주기 조절 인자에서 효능

- Immortalized human keratinocyte (HaCaT)에 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1)을 24 시간 동안 처리하였을 때, TGF-β1에 의해 유도되는 CDK2의 인산화 감소 및 p21의 발현 증가를 다소 억제하였음. 반면, RB의 인산화는 영향을 받지 않음을 확인하였음. 또한 Smad2 및 3의 인산화 역시 영향을 받지 않음을 확인하였음(그림 25)

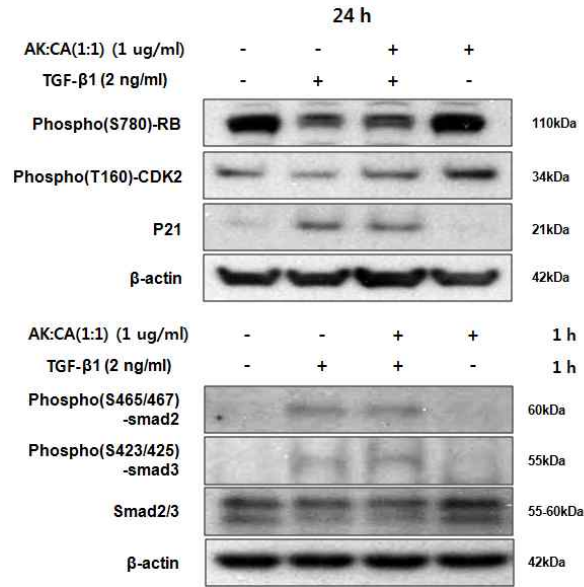


그림 25. 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1)의 모발주기 조절 인자에서 효능

- Immortalized human keratinocyte (HaCaT)에 오가피 (AK) 유래 단일물질인 acankoreoside J를 24 시간 동안 처리하였을 때, TGF-β1에 의해 유도되는 RB의 인산화 감소 및 p21의 발현 증가를 억제하였음. 반면, CDK2의 인산화 감소는 영향을 받지 않음을 확인하였음. 한편 TGF-β1에 의해 유도되는 Smad2의 인산화 증가는 영향을 받지 않았으나, Smad3의 인산화 증가를 억제함을 확인하였음(그림26)

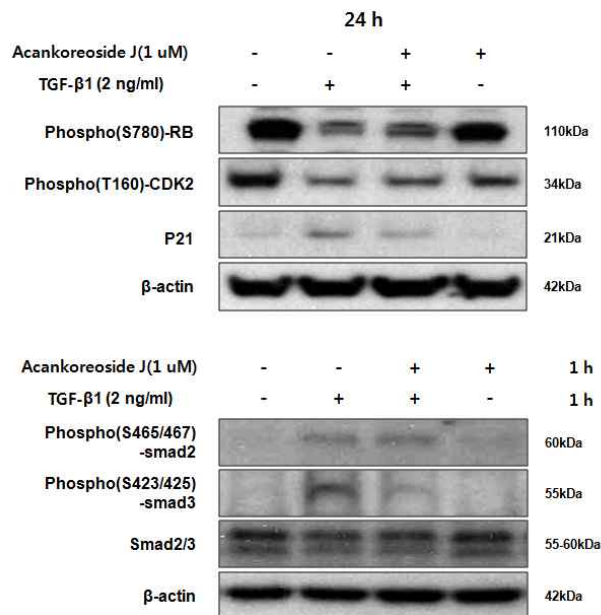


그림 26. Acankoreoside J의 모발주기 조절 인자에서 효능

- immortalized human keratinocyte (HaCaT)에 문주란 (CA) 유래 단일물질인 norgalantamine를 24 시간 동안 처리하였을 때, TGF-β1에 의해 유도되는 RB의 인산화

감소, CDK2의 인산화 감소 및 p21의 발현 증가는 영향을 받지 않았음. 또한, TGF-β1에 의해 유도되는 Smad2 및 3의 인산화 증가는 영향을 받지 않음을 확인하였음(그림27)

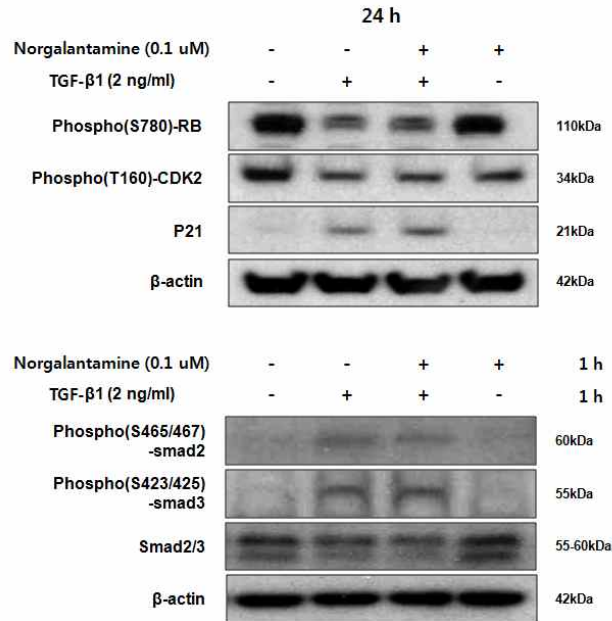


그림 27. Norgalanthamine의 모발주기 조절 인자에서 효능

6. Vibrissa follicle의 hair fiber 길이 성장 평가

- 육모 효능을 in vitro에서 비교적 간편하게 평가할 수 있는 방법으로는 모낭 배양법이 잘 알려져 있음. 분리된 rat vibrissa 모낭은 3주 정도 배양 가능하며, 천연물 또는 천연물 유래 물질의 육모 효능을 평가하는데 이용될 수 있음이 잘 알려짐
- 연구방법: 생후 3주령인 Wistar rat 수컷을 (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) (주)중앙 실험동물로부터 구입하여 ethyl ether로 마취 후 경추도살 하였음. Rat 왼쪽과 오른쪽 mystacial pads를 분리하여 100 units/ml penicillin-100 µg/ml streptomycin (Gibco Inc, NY, USA)이 함유된 E/P buffer [Earle's balanced salts solution (EBSS, Sigma MO, USA) + phosphate-buffered saline (PBS, Sigma MO, USA)]에 넣었음. 해부 현미경으로 관찰하며 vibrissa follicles을 조심스럽게 분리하였음. 모낭이 모두 분리될 때까지 E/P buffer를 넣은 Petri dish에 분리된 모낭을 넣고 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 1시간 정도 배양하였음. 24 well plate의 각 well에 2 mM L-glutamine (Gibco Inc, NY, USA), 10 µg/ml insulin (Sigma MO, USA), 50 nM hydrocortisone (Sigma MO, USA)과 100 units/ml penicillin-100 µg/ml streptomycin을 포함하는 500 µl의 William E medium (Gibco Inc, NY, USA)을 넣고, 하나의 well에 하나씩의 모낭을 넣어서 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였음. 배양 중에 배지는 3 일마다 교환하였고 시료를 처리하였음. 양성 대조물질인 minoxidil을 10 µM의 농도로 처리하였음. 배양중인 vibrissa follicle 형태는 현미경 (Olympus, Japan)을 사용하여 촬영하였음. 모낭 길이는 image analyzer (eXcope; DIXI Optics, Korea)를 사용하여 측정하였음. 모낭 길이 변화의 평균값을 구하고 대조군의 평균길이와 비교하여 성장 정도를 측정하였음

- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제이 모낭의 hair fiber 길이를 성장시키는지 생후 3 주령 rat의 성장기 vibrissa follicles을 분리하여 3주간 배양하면서 모낭의 길이를 측정하여 육모 효능을 조사하였음
- 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제 (1:1)을 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 그룹에서 모낭의 길이가 시간 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 21일째 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AK:CA (1:1) 처리군과 대조군 ($100 \pm 25.9\%$)과의 모낭의 길이 차이 (%)를 비교한 결과, $170.8 \pm 28.0\%$ 로 대조군에 비해 높은 hair fiber의 길이성장 효과를 나타내었음. 양성 대조 물질인 minoxidil은 $133.8 \pm 23.8\%$ 의 hair fiber 길이 성장을 나타내었음. 따라서 AK:CA (1:1) 추출물 복합제가 양성 대조 물질인 minoxidil 보다 우수한 육모 효능을 나타냄을 확인할 수 있었음(그림28)

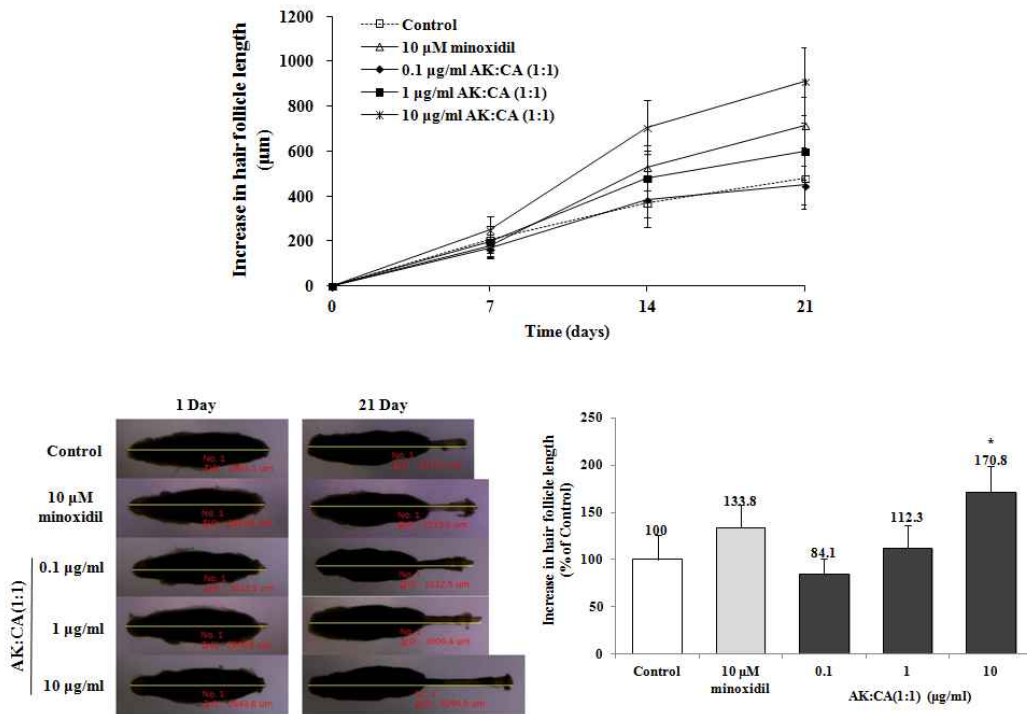


그림 28. AK:CA (1:1) 추출물 복합제의 hair fiber 길이 성장 효과

- 결과적으로 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제는 dermal papilla cells에서 모발의 성장에 관여하는 wnt/ β -catenin pathway의 활성화 및 세포주기의 진행에 관여하는 단백질의 발현을 조절하여 세포의 성장을 유도하였음. 한편, 오가피(AK)와 문주란(CA)의 복합제는 immortalized human keratinocyte (HaCaT)에서 TGF- β 에 의한 세포주기의 진행 억제와 관련된 단백질의 변화를 저해하였음. 반면, 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제는 5 α -Reductase 활성화 및 NIH3T3 세포 증식에는 효과를 나타내지 않았음. 따라서 오가피(AK)와 문주란(CA) 추출물 복합제는 wnt/ β -catenin 및 세포주기진행 조절을 통한 세포성장에 의해 발모 효능을 나타낼 것이라 여겨짐

[제1위탁]

□ 활성분획 제조 및 분석법 확립

1. 문주란의 지표성분인 crinamine 과 lycorine의 분리정제

가. 문주란에 함유된 지표성분인 crinamine 과 lycorine의 분리정제를 수행하였으며, 추가적으로 tyrosol, kaempferol-3-O-rhamnoside, quercetin, isoquercitrin, O-demethylcrinamine, butyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate, butyl-fructofuranoside 등의 성분도 분리 및 구조동정(그림29-30)

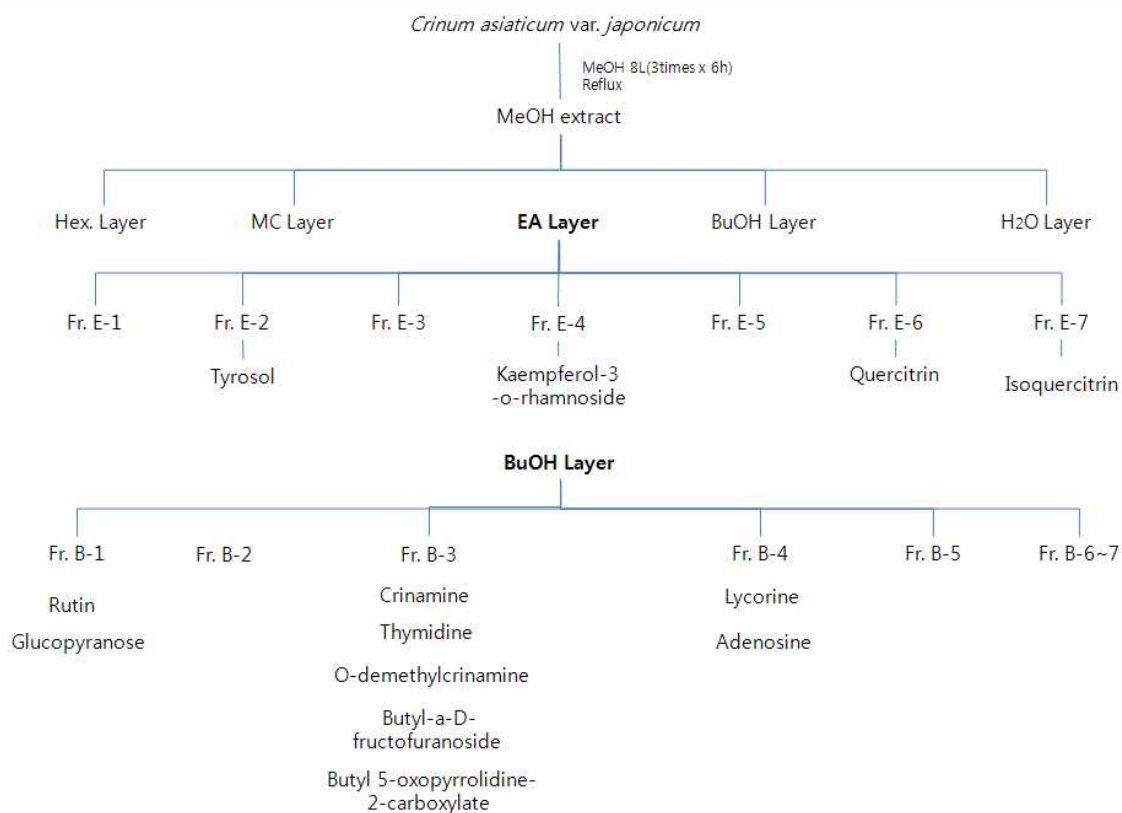


그림 29. 문주란의 지표성분인 Crinamine과 Lycorine의 분리정제 모식도

<Crinamine >

¹H-NMR (400MHz, CD₃OD) : δ 2.03 (2H, m, H-4), 3.34 (3H, s, OMe), 3.40 (H, m, H-4a), 3.69 (H, d, J =18.0 Hz, H-6), 3.95 (H, m, H-11), 4.23 (H, d, J =18.0 Hz, H-6), 5.82 (2H, s, OCH₂O), 6.02(H, d, J =11.0 Hz, H-2), 6.23 (H, d, J =11.0 Hz, H-1), 6.48(H, s, H-7), 6.80 (H, s, H-10)

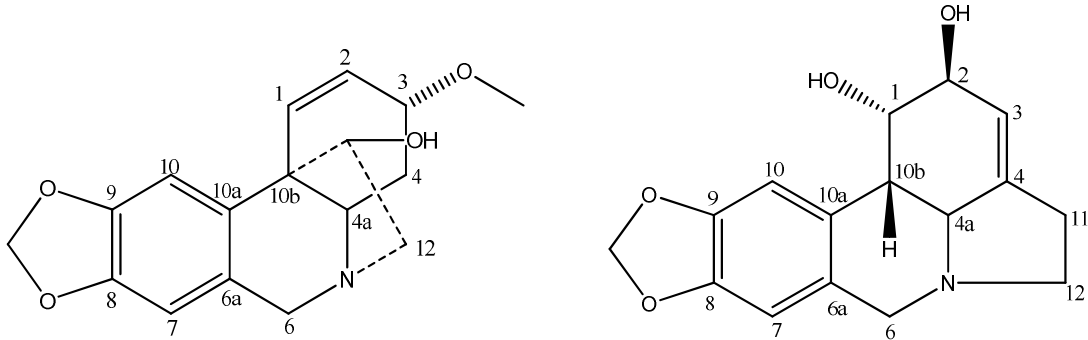
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) : δ 30.79 (C-4), 63.76 (C-6), 67.50 (C-4a), 77.82 (C-3), 104.46 (C-10), 108.05 (C-7), 126.13 (C-1), 126.98 (C-6a), 134.39 (C-2), 137.48 (C-10a), 148.00 (C-8), 148.44 (C-9)

<Lycorine>

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*6) : δ 2.20 (H, m, H-11), 2.39 (H, m, H-10b), 2.50 (2H, m, H-11), 2.57 (H, d, J = 10.3Hz, H-4a), 3.29 (H, m, H-12), 3.36 (H, d, J = 14.4 Hz, H-6), 4.01 (H, s, H-2),

4.01 (H, d, $J = 14.4$ Hz, H-6), 4.27 (H, s, H-1), 5.36 (H, s, H-3), 5.94 (H, d, $J = 4.2$ Hz, OCH₂O), 6.67 (H, s, H-10), 6.8 (H, s, H -7)

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*6) : δ 28.11 (C-11), 40.18 (C-10b), 53.30 (C-12), 56.72 (C-6), 60.81 (C-4a), 70.21 (C-1), 71.72 (C-2), 100.56 (OCH₂O), 105.05 (C-10), 108.21 (C-7), 118.47 (C-3), 129.58 (C-6a), 129.75 (C-10a), 141.68 (C-4), 145.20 (C-9), 145.65 (C-8)



crinamine

lycorine

그림 30. 문주란의 지표성분 crinamine과 lycorine의 구조

2. 분석법 확립

가. 문주란의 지표성분 분석법 확립

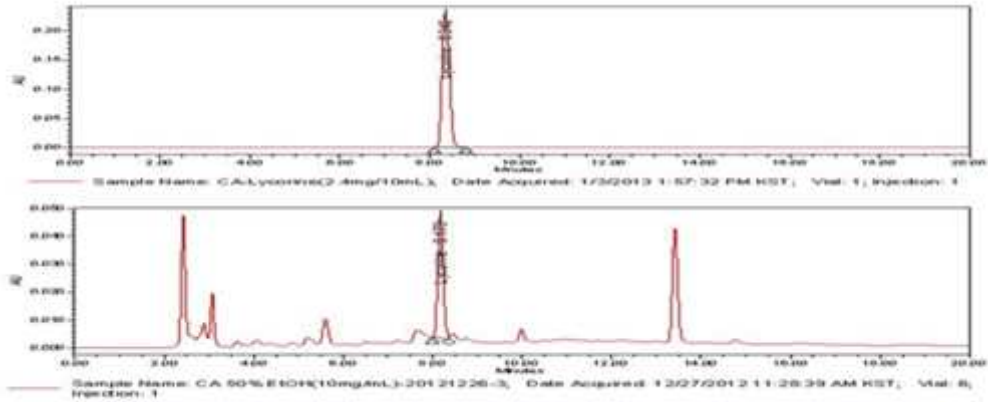
문주란의 지표성분인 lycorine과 crinamine의 분석조건을 아래와 같이 확립함. 확립된 조건으로 지표성분을 분석한 결과 lycorine은 0.42%, crinamine은 0.20% 함유되어 있음을 알 수 있었음(그림31-32)

◆ 분석방법

- Column : CAPCELL PAK C18 UG120(4.6mm X 250mm)
- Column temp. : 40°C
- Solvent : 10% ACN → 50% ACN + 20mM CH₃COONH₄
- Flow : 1mL/min
- Detector : UV 290nm

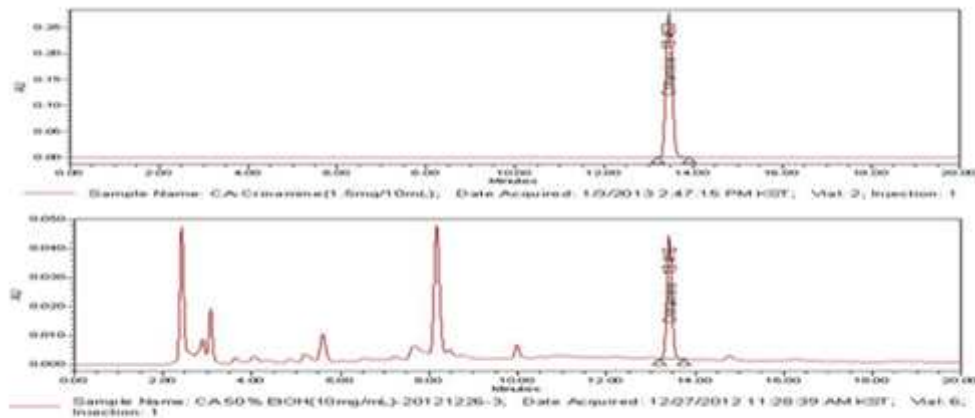
◆ Sample 제조

- Lycorine standard solution
: 2.4mg을 10mL의 메탄올에 녹여 표준용액을 제조한다(농도 : 0.24mg/mL)
- Crinamine standard solution
: 1.5mg을 10mL의 메탄올에 녹여 표준용액을 제조한다(농도 : 0.15mg/mL)
- Test solution : 문주란 추출물 1000mg을 100mL의 50% 에탄올에 녹여 제조



문주란(지표성분: Lycorine)의 함량			
Sample No.	농도(mg/mL)	Peak area	함량(mg/g)
STD	0.24	2642212	
TEST	10.0	457722	4.16
문주란 추출물 1g에 지표성분인 Lycorine이 4.16mg 함유됨			

그림 31. 문주란의 지표성분인 lycorine의 분석법



문주란(지표성분: Crinamine)의 함량			
Sample No.	농도(mg/mL)	Peak area	함량(mg/g)
STD	0.15	2724675	
TEST	10.0	367138	2.02
문주란 추출물 1g에 지표성분인 Crinamine이 2.02mg 함유됨			

그림 32. 문주란의 지표성분인 crinamine의 분석법

나. 오가피의 지표성분 분석법 확립

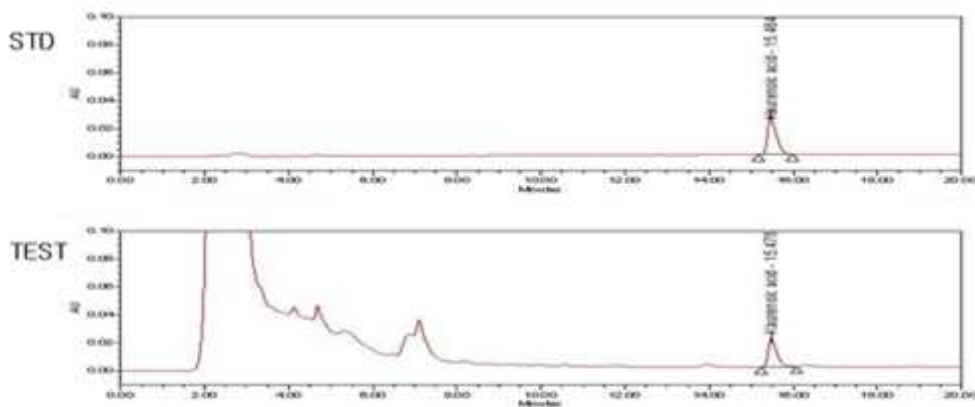
오가피의 지표성분인 kaurenoic acid의 분석조건을 아래와 같이 확립하였음. 확립된 조건으로 지표성분을 분석한 결과 kaurenoic acid는 0.28% 함유되어 있음을 알 수 있었음 (그림33)

◆ 분석방법

- Column : CAPCELL PAK C18 UG120(4.6mm X 250mm)
- Column temp. : 40°C
- Solvent : 60% ACN → 100% ACN
- Flow : 1mL/min
- Detector : UV 210nm

◆ Sample 제조

- Kaurenoic acid standard solution
 - : 2.8mg을 10mL의 메탄올에 녹여 표준용액을 제조한 후 이 표준용액 2.8mL를 분취 후 메탄올을 가하여 20mL로 fill up(표준액 농도 0.0392mg/mL)
- Test solution
 - : 섬오가피 추출물 1000mg을 100mL의 50% 에탄올에 녹여 제조



섬오가피(지표성분: Kaurenoic acid)의 함량			
Sample No.	농도(mg/mL)	Peak area	함량(mg/g)
STD	0.0392	382945	
TEST	10.0	276112	2.83
섬오가피 추출물 1g에 지표성분인 Kaurenoic acid가 2.83mg 함유됨			

그림 33. 오가피의 지표성분인 kaurenoic acid의 분석법

다. 오가피와 문주란 추출물 복합제 중 lycorine과 crinamine의 분석

문주란 단일 추출물에서는 lycorine의 피크가 타 성분과 분리되었으나 오가피와 문주란의 추출물 복합제에서는 오가피 성분과 피크가 겹쳐서 나타나므로, 복합제 중에서 lycorine 및 crinamine을 정량할 수 있는 분석 방법을 개발하고자 하였음

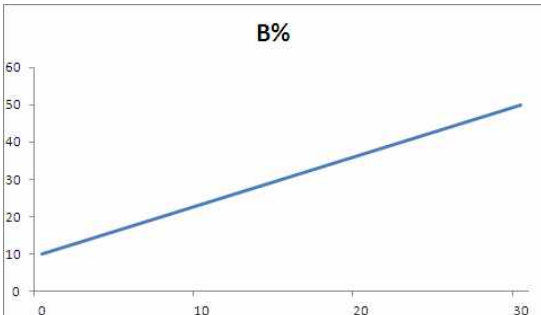
(1) 분석조건의 확립

표준액 제조- 0.24 mg/mL lycorine 표준품 메탄올 용액, 0.15 mg/mL crinamine 표준품 메탄올 용액, 검액 제조: 50% ethanol로 10.0 mg/mL 시료 용액을 제조하고, 0.45 μm PVDF로 여과하여 검액으로 함. 표준액 및 검액 각각을 10 μl injection하여 HPLC로 분석함

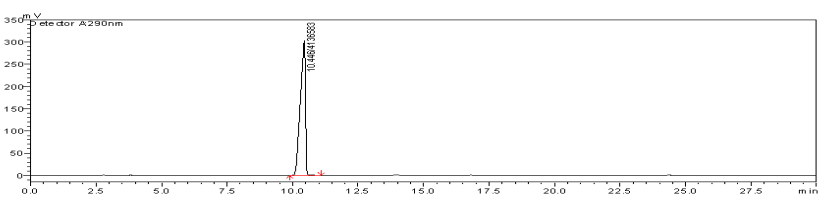
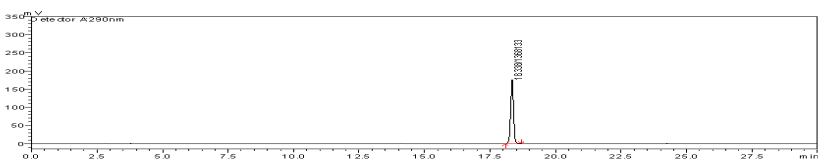
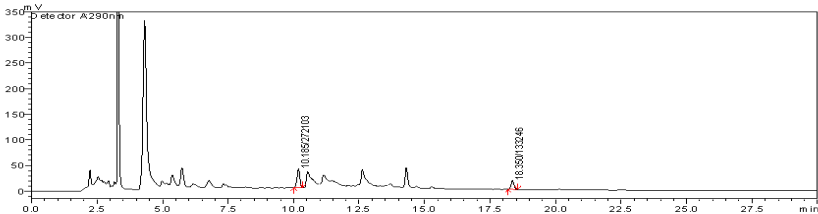
(2) HPLC 분석조건

HPLC 시스템	Shimadzu 20AD model
검출과장	290 nm (UV detector)
컬럼	Hector C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m)
컬럼온도	40 $^{\circ}$ C
이동상	A : Water 100 % + 20mM ammonium acetate B : ACN 100 %
유속	1 mL/min
주입량	10 μ l
시간	30 min

(3) Gradient 조건

Time	B%	Gradient
0.01	10	
30	50	

(4) 실험 chromatogram

Lycorine standard	
Crinamine standard	
Sample (섬오가피 + 문주란)	

(5) 실험결과

컬럼을 제외한 조건을 기존의 분석조건과 같도록 하였을 때, standard의 피크와 비교하여 복합 추출물에서의 lycorine의 피크를 확인할 수 있었음. 문제가 되었던 8~10 분 사이에서 겹쳐진 피크들은 나타나지 않았고, RT값이 거의 비슷하게 단일피크로 lycorine이 검출되었음. 하나의 피크로 뭉쳐져서 나타났을 수도 있다고 생각하여 gradient를 조정하여 5% → 30% 와 5% → 35%로 실험을 하였으나, RT값만 늦춰질 뿐 기존의 조건인 10% → 50%의 피크양상과는 큰 차이가 나타나지 않았음. 기존의 분석조건으로 실험하였을 때 완전성의 문제로 인해 lycorine의 피크가 겹쳐 나왔을 것이라고 생각됨. 따라서 column을 교체 하면 기존의 분석방법으로도 분석이 원활하게 가능할 것이라고 판단되며, 이러한 방법으로 문주란의 함량을 분석한 결과 lycorine은 1.58 mg/g, crinamine은 1.46 mg/g 포함되어 있음을 알 수 있었음

Lycorine	농도(mg/mL)	R.T	AREA	함량(mg/g)
Standard	0.24	10.4	4137000	
Sample	10	10.2	272000	1.58
Crinamine	농도(mg/mL)	R.T	AREA	함량(mg/g)
Standard	0.15	18.3	1368000	
Sample	10	18.4	133000	1.46

□ 후보생약의 안전성시험

- 오가피와 문주란 추출물 복합제의 안전성을 확인하기 위하여 다음과 같이 독성시험을 실시하였다.

1. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

가. 시험방법

- (1) 본 시험은 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 단회 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위하여 수행하였다.
- (2) 시험물질을 1250, 2500, 5000 mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였고, 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 경구투여 하였다. 2 주간 사망률, 일반증상 관찰, 체중변화 및 육안적 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였다.

나. 시험결과

(1) 사망동물

사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 일반증상

2500 mg/kg 이상 투여군 암컷 및 5000 mg/kg 투여군 수컷에서 Day 1에 연변(Soft stool) 및 시험물질색변(Compound-colored stool)이 전례에서 관찰되었다.

(3) 체중변화

모든 시험물질 투여군에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(4) 부검소견

이상소견은 관찰되지 않았다.

(5) 고찰 및 결론

- 본 시험은 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.
- 본 시험에서는 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중변화 및 육안적 부검소견에서도 시험물질과 관련된 특이한 변화는 관찰되지 않았다.

- 2500 mg/kg 이상 투여군 암컷 및 5000 mg/kg 투여군 수컷에서 관찰된 시험물질색변은 시험물질 또는 그 대사체가 변으로 배설되어 관찰된 변화로 추정하고, 연변은 공복의 상태에서 과량의 물질적용에 따른 영향으로 발생한 증상으로 판단한다.
- 이상의 결과로 보아, 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여 하였을 때 본 시험조건 하에서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5000 mg/kg를 상회하는 것으로 판단한다.

2. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경피투여 독성시험

가. 시험방법

- (1) 본 시험은 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 단회 경피투여 하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위하여 수행하였다.
- (2) 시험물질을 1250, 2500, 5000 mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였고, 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 경피투여 하였다. 2 주간 사망률, 일반증상 관찰, 체중변화 및 육안적 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였다.

나. 시험결과

- (1) 사망동물
사망동물은 관찰되지 않았다.
- (2) 일반증상
시험물질에 의한 변화가 관찰되지 않았다.
5000 mg/kg 투여군 암수에서 Day 2에 첩포제거 후 약 1 시간까지 투여 부위에 발적(Reddening)이 관찰되었으나, 투여시험물질이 매우 끈적끈적한 액상으로 점도가 높아 이로 인한 첩포제거 시 자극에 의한 일시적인 증상으로 시험물질과 무관한 변화로 판단한다.
- (3) 체중변화
모든 시험물질 투여군에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- (4) 부검소견
육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.
- (5) 고찰 및 결론
○ 본 시험은 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여 하였을 때 나타나는 독

성을 알아보기 위하여 수행하였다.

- 본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상, 체중변화 및 육안적 부검조건에서도 시험물질과 관련된 특이한 변화는 관찰되지 않았다.
- 이상의 결과로 보아, 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경피투여 하였을 때 본 시험조건 하에서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

3. Hartley계 기니픽을 이용한 피부감작성 시험(Buehler 법)

가. 시험방법

- (1) 본 시험은 시험물질의 피부감작성을 평가하기 위하여 Hartley계 기니픽을 이용하여 시험하였다.
- (2) 시험물질을 500 mg/site의 용량으로 적용하여 감작 및 야기한 후, 야기처치 제거 후 24, 48 및 72 시간의 피부반응을 평가하여, 이를 기초로 피부감작성을 평가하였다. 피부반응 및 피부감작성을 비교 평가하기 위해 음성대조군 및 양성대조군을 두었다.

나. 시험결과

- (1) 일반증상
시험물질에 의한 일반증상은 관찰되지 않았다.
- (2) 체중변화
시험물질에 의한 체중변화는 관찰되지 않았다.
- (3) 피부반응 및 감작성의 평가
음성대조군 및 시험물질투여군에서는 아무런 반응도 나타나지 않아서 0 % 감작율로 '매우약함'(I 등급)으로 평가하였다. 반면, 양성대조군의 경우 야기부위에서 야기처치 제거 후 24 시간, 48 시간 및 72 시간째에 모든 동물에서 grade 1의 아주 가벼운 홍반(very slight erythema), grade 2의 분명한 홍반(well-defined erythema) 또는 grade 3의 약간 심한 홍반(Moderate to severe erythema)이 관찰되어 100 % 감작율로 '매우 강함'(V 등급)으로 평가하였다.
- (4) 고찰 및 결론
 - 본 시험은 시험물질의 피부감작성을 평가하기 위하여 Hartley계 기니픽을 이용하여 시험하였다.
 - 음성대조군 및 시험물질투여군의 경우 시험물질 투여에 따른 일반증상 및 체중변화의

이상은 관찰되지 않았고, 야기부위에서도 아무런 반응이 관찰되지 않았다. 반면, 양성 대조군의 경우 야기부위에서 야기처지 제거 후 24, 48 및 72 시간째에 모든 동물에서 흥반이 관찰되어 100 % 감작율로 '매우 강함'(V 등급)으로 평가하였다.

- 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 시험 조건하에서 사망동물은 관찰되지 않았고, 반증상 및 체중변화에서도 시험물질 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 피부감작성 평가 결과, 시험물질투여군에서는 0 %의 감작율을 보여 '매우약함'(I 등급)으로 평가하였다. 따라서 본 시험 조건하에서 시험물질의 피부감작율은 '매우약함'(I 등급)으로 판정하였다.

4. New Zealand White 계 토끼를 이용한 안점막자극시험

가. 시험방법

- (1) 본 시험은 시험물질에 대한 안점막자극성을 조사하기 위하여 New Zealand White계 수컷 토끼의 안점막에 시험물질을 적용한 후 무처치한 안점막과 비교 평가하였다.
- (2) 시험물질을 Draize 방법에 따라 적용부위당 0.1 g씩 적용하였다. 세안군 3마리, 미세안군 6마리로 2개의 군으로 나누어 각 동물마다 좌안에는 시험물질을, 우안에는 무처치를 적용하였다. 시험물질을 1회 적용한 후, 3 레의 동물(세안군)은 20-30 초 후 생리식염 주사액 20 ml 정도로 양안 모두를 세안하고, 6 레의 동물(미세안군)은 그대로 두었다. 모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상관찰을 실시하였고, 적용일을 day 0 으로 설정하여 시험물질 적용 후 1, 2, 3, 4 및 7 일에 토끼의 눈주위, 안구 및 행동을 관찰하였다.
- (3) 시험물질의 안점막자극 평가는 각막의 혼탁, 혼탁 된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등의 변화를 육안적으로 관찰하였다. 안구 병변의 등급에 따라 판정일 각 마리 총점 [I.O.I , The individual Index of Ocular Irritation (0-110 점)]의 합을 마리 수로 나눈 평균 값인 M.I.O.I(Mean Index of Ocular Irritation), 관찰기간 중 M.I.O.I 의 최대값인 I.A.O.I(The Index of Acute Ocular Irritation) 및 7일째 I.O.I.I(Individual Ocular Irritation Index : 7일째의 각각 동물의 득점)등의 값으로 안점막자극성 강도를 평가하였다.

나. 시험결과

- (1) 일반증상
전 시험기간 동안 시험물질 적용과 관련된 일반증상의 변화는 관찰되지 않았다.
- (2) 체중변화
Day 1 에 미세안군 및 세안군의 각각 1 레에서 경미한 체중감소가 관찰되었다.
- (3) 안구반응의 관찰

세안군은 시험물질 적용 후 전 시험기간 동안 아무런 변화도 관찰되지 않았다. 미세안군은 Day 1에 grade 1 과 2 인 결막발적(conjunctiva redness)이 각각 3 과 1 레에서 관찰되었다.

이중 1 레에서는 grade 1인 결막발적이 Day 2까지 관찰되었다.

(4) 자극성의 판정

- 세안군의 평균 안자극지수(M.I.O.I)는 전 관찰 기간 동안 모두 0 으로 전 시험기간 동안 아무런 변화도 관찰되지 않았다.
- 미세안군의 6 레중 4 레에서 Day 1에 결막의 발적이 관찰되었으며, 이중 1 레는 Day 2 까지 관찰되었다. 평균 안자극지수는 Day 1 및 2까지 각각 1.7 및 0.3 이었으며, 이후에는 모두 0.0 이었다.

(5) 고찰 및 결론

- 본 시험은 시험물질의 안점막자극성을 조사하기 위하여 New Zealand White계 토끼의 왼쪽 안구에 시험물질을 적용한 후 적용하지 않은 오른쪽 안구와 비교 평가하였다.
- 시험결과, 전 시험기간 동안 시험물질 적용과 관련한 일반증상의 이상변화는 관찰되지 않았다. Day 1에서 관찰된 체중감소는 연관된 일반증상이나 다른 요인이 관찰되지 않았으며, 그 감소의 정도가 경미하여 독성학적 의미는 없는 것으로 판단하였다.
- 시험물질 적용 후 미세안군에서 나타난 결막의 발적은 시험물질에 의한 것으로 판단하였다. 시험물질 적용 후 안반응 관찰 결과, 급성안자극지수 I.A.O.I(The Index of Acute Ocular Irritation)는 세안군 0.0, 미세안군 1.7 이었다.
- 이상의 결과에서 본 시험조건에 의한 시험물질의 New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막자극시험 결과, 무자극물로 평가하였다.

5. New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험

가. 시험방법

- (1) 본 시험은 시험물질의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극 반응을 알아보고자 수행하였다.
- (2) 시험물질 적용 24 시간 전에 전기 제모기를 이용하여 토끼의 배부 피부에 상처가 나지 않도록 제모된 건강한 피부를 만들었다. 제모된 피부는 좌우로 나누어 좌를 시험물질 적용구획으로 우를 대조구획으로 하고, 적용구획과 대조구획의 건강피부(비찰과) 또는 찰과피부가 서로 대각선으로 분포하도록 구분하여, 건강피부(비찰과) 2 개소와 찰과피부 2 개소를 유성펜으로 표시하였다. 찰과피부는 표피는 손상되나 진피는 손상되지 않도록 피

가 나지 않는 정도로 찰과상을 입혀서 만들었다. 적용방법으로는 표시한 적용구획 위에 2.5 cm × 2.5 cm의 거어즈 위에 시험물질 적용하여 피부와 접촉시켰다. 시험물질의 위에는 침투성이 없고 자극성이 낮은 의료용 테이프로 감아주었다.

- (3) 시험물질은 Draize 방법에 따라 2.5 cm × 2.5 cm 크기로 0.5 g/site 씩 1회 적용하여 24 시간 유지시켰다.

나. 시험결과

(1) 일반증상

연변(soft stool)과 하복부 오염(soiled perineal region)이 Day 1에 2 레에서 관찰되었다.

(2) 체중변화

모든 동물에서 시험물질 적용에 따른 체중변화는 관찰되지 않았다. 다만, 적용 후 Day 1에 모든 동물에서 경미한 체중감소가 관찰되었으나, Day 3에는 모두 회복되는 경향이 관찰되었다.

(3) 피부반응

○ 홍반 및 가피의 형성

시험물질 적용 후 24 시간째 시험물질 적용부위의 비찰과피부에서 grade 1 인 아주 가벼운 홍반(very slight erythema)과 grade 2 인 분명한 홍반(well-defined erythema)이 각각 3 레와 1 레에서 관찰되었으며, 찰과피부에서도 grade 1 인 아주 가벼운 홍반, grade 2 인 분명한 홍반과 grade 3 인 약간 심한 홍반(moderate to severe erythema)이 각각 2, 3, 1 레에서 관찰되었다.

72 시간째는 모든 시험물질 적용부위에서 홍반은 관찰되지 않았으나, 5 레의 시험물질 적용부위 찰과 및 비찰과피부에서 가피형성이 관찰되었다.

○ 부종

시험물질 적용 후 24 시간째 시험물질 적용부위의 비찰과피부에서 grade 1 인 아주 가벼운 부종(very slight edema)이 2 레에서 관찰되었으며, 찰과피부에서는 grade 1 인 아주 가벼운 부종, grade 2 인 가벼운 부종(slight edema)과 grade 3인 보통의 부종(moderate edema)이 각각 4, 1, 1 레에서 관찰되었다.

(4) 고찰 및 결론

○ 본 시험은 시험물질의 피부자극성을 조사하기 위하여 New Zealand White계 백색 토끼의 건강피부(비찰과피부) 및 찰과피부에 시험물질을 적용한 후 무처리 적용한 건강피부(비찰과피부) 및 찰과피부와 비교 평가하였다.

○ Day 1에서 관찰된 일반증상의 연변, 하복부오염 및 체중감소는 시험물질 폐쇄적용에 따른 스트레스로 인한 것으로 판단하였다.

- 피부반응 평가에서 나타난 시험물질 적용부위의 홍반, 부종, 및 가피형성은 시험물질에 의한 것으로 판단하였으며, 이를 근거로 한 자극성의 판정 결과, 1차 피부자극지수(P.I.I)는 1.1 이었다.
- 이상의 결과에서 본 시험조건에 의한 시험물질의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부자극시험 결과, 약한 자극성 물질로 판단하였다.

6. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경피투여 DRF 독성시험

가. 시험방법

- (1) 본 시험은 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경피투여 하였을 때 나타나는 독성을 확인하여 추후 실시할 반복 경피투여 독성시험에서의 용량설정 근거로 활용하기 위하여 수행하였다.
- (2) 시험물질을 1000, 2000, 4000 mg/kg/day (이하 mkd)로 투여하는 시험물질 투여군, 멸균 주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하여 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 4 주간 반복 경피투여하였다.
- (3) 첫 투여 전 전기제모기를 이용하여 흉복배부를 중심으로 체표 면적의 10 % 이상(약 7 x 9 cm)을 전모하였고, 첩포용 거즈(약 5 x 7 cm)에 투여액량을 5 mL/kg/day로 산출한 투여시험물질을 골고루 도포하여 제모된 부위에 밀착시켜 첩포용 거즈위에 테가덤(Tegaderm™, 3 M Health Care, St. Paul, MN)을 덮어주고, 그 위에 코반(Coban)으로 몸통 전체를 감아주었다. 약 6 시간 경과후에 부착물을 제거하였고 멸균주사용수를 적신 거즈를 이용하여 닦아주었다. 제모는 주 1 회 이상 실시하였다.

나. 시험결과

- (1) 일반증상
일반증상 관찰결과 시험물질 투여군에서 창상(wound) 및 가피형성(crust formation)이 산발적으로 관찰되었다. 육안적 부검조건관찰 결과, 투여부위에서 가피형성이 4000mg/kg/day 수컷에서 1례, 1000, 2000, 4000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 각 2, 2, 4례 관찰되었다.
- (2) 체중변화
시험물질에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- (3) 사료섭취량
시험물질에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(4) 물섭취량

시험물질에 의한 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(5) 안과학적 검사

시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(6) 요검사

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

다만, 1000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 KET가 유의하게 높았으나($p < 0.05$), 용량-반응 상관성이 없고 관련 지표 변화가 동반되지 않아 시험물질과 무관한 변화로 판단한다.

(7) 혈액학적 검사

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

다만, 2000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 NEU 수가 유의하게 높았으나($p < 0.01$), 용량-반응 상관성이 없어 시험물질과 무관한 변화로 판단한다.

(8) 장기중량

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.

다만, 1000 및 2000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 우측 부고환의 절대중량이 유의하게 높았으나($p < 0.05$), 용량-반응 상관성이 없어 시험물질과 무관한 우발적인 변화로 판단한다.

1000 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 우측 부신의 절대 및 상대중량이 유의하게 높았으나 ($p < 0.05$, $p < 0.01$), 관련 지표의 변화를 동반하지 않았고, 썸은 reference data 이내의 변화로 시험물질과 무관한 우발적인 변화로 판단한다.

(9) 부검소견

그 밖에, 수컷에서는 1000 mg/kg/day 투여군에서 우측 신장의 연노랑색조로 변색(light yellow discoloration, kidney) 및 방광의 확대 및 단단한 소견(hardness and expansion, urinary bladder)이 1례 관찰되었다. 암컷에서는 1000 및 2000 mg/kg/day 투여군에서 비장의 왜소(decrease size, spleen)가 각 1례씩 관찰되었고, 4000 mg/kg/day 투여군에서 신장의 연한 갈색조로 변색(light brown discoloration, kidney)이 1례 관찰되었고, 모든 투여군에서 자궁내 맑은액체저류(retention of clear fluid)가 산발적으로 관찰되었다. 상기의 변화는 용량-반응 상관성이 없거나, 발생 레가 적어 시험물질과 무관한 우발적인 변화로 판단한다.

(10) 조직병리학적 검사

투여부위를 관찰한 결과, 시험물질투여군에서 관찰된 주요한 병변은 궤양(ulceration)과 모낭주위 복합세포 침윤(Infiltration, mixed cell, perifollicular)이었고, 그 외 염증 관련 반응들이 동반 관찰되었다.

본문Table 2. Incidence of major histopathological changes in the administration site

Sex	Male				Female			
Groups	1	2	3	4	1	2	3	4
Dose (mkd)	0	1000	2000	4000	0	1000	2000	4000
No. Animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Epidermis								
Ulceration	0	0	0	0	0	0	0	4
Minimal								3
Mild								1
Dermis								
Infiltration, mixed cell, perifollicular	1	1	4	5	0	1	0	0
Minimal								
Mild	1	1	4	4		1		
				1				

본문Table 3. Incidence of inflammatory reaction in the administration site

Sex	Male				Female			
Groups	1	2	3	4	1	2	3	4
Dose (mkd)	0	1000	2000	4000	0	1000	2000	4000
No. Animals examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Epidermis								
Crust	0	0	0	1	0	2	2	4
Pustule	0	0	0	0	0	1	0	1
Hyperplasia	0	0	3	2	0	2	1	3
Minimal			2	1		1	1	3
Mild			1	1		1		
Dermis								
Infiltration, mixed cell, superficial	0	0	0	0	0	1	0	0
Mild						2		
Fibrosis, superficial	0	0	1	0	0	2	1	0
Minimal			1			2	1	
Infiltration, eosinophil	0	0	0	0	0	0	0	2
Mild								2
Hyperplasia, sebaceous gland	0	0	3	3	0	2	2	5
Minimal			3	3		2	2	5

(11) 고찰 및 결론

- 시험 결과, 사망 동물은 관찰되지 않았으며, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 검사 및 장기중량에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 일반증상에서 관찰된 창상 및 가피형성은 모든 시험물질 투여군에서 관찰되어 시험물질에 의한 변화로 추정된다.
- 투여부위에 대한 조직병리학적인 검사 결과, 4000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 표피의 궤양은 시험물질에 의한 변화로 추정되며, 상피를 단절시키고 관련된 염증 반응들이 동반 관찰되어 독성학적으로 의미 있는 변화로 판단한다.
- 또한 모든 시험물질 투여군 수컷과 1000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 모낭주위 복합세포 침윤은 비록 부형제대조군 수컷 1 레에서 관찰되었지만, 동반 관찰된 염증 관련 반응들을 고려하였을 때, 시험물질에 의한 변화로 추정한다. 다만, 해당 변화

는 그 정도가 미약하고 모낭에 큰 영향을 미치지 않았으며, 실질조직의 기능이상을 초래하지 않아, 독성학적인 의미는 미약하다고 판단한다.

- 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질을 Sparague-Dawley 랫드에 1000, 2000, 4000 mg/kg/day로 4 주간 반복 경피투여하였을 때, 시험물질에 의한 변화로 일반증상에서 창상 및 가피형성이 관찰되었고, 조직병리학적인 검사에서 표피의 궤양, 모낭주위 복합세포 침윤 및 염증 관련 반응들이 관찰되었으며, 표피의 궤양의 경우 독성학적으로 의미 있는 변화였다.

- 따라서, 상기 시험결과를 토대로 추후 실시할 반복투여 독성시험에서는 독성이 관찰될 것으로 예측되는 용량인 4000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고, 그 아래로 공비 3으로 두 개 군을 설정하는 것을 추천한다.

□ 추후 연차별 계획 (2019년 제품 출시 목표)

구분	추진일정																			
	3년차				4년차				5년차				6년차				7년차			
	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4
독성시험	■	■	■	■	■	■	■	■												
임상시험									■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
허가취득																				■

□ 경쟁력 있는 효능 분석

기존 제품 대비 부작용이 개선되어 특히 여성 환자들이 안심하고 사용할 수 있는 제품을 개발하고자 함

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 목표달성도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1세부 (삼천당제약)	후보생약 표준화	100	<ul style="list-style-type: none"> 후보생약의 표준화 연구 <ul style="list-style-type: none"> 성상, 기원의 명확화 다양한 재배조건 및 채취시기에 따른 원료의 차이를 계량화함으로써 표준원료 개발 안정적 원료공급 위한 재배지 확보
	<i>in vivo</i> 효능확립	94	<ul style="list-style-type: none"> 약효검증시험(마우스 100마리/회 소요) <ul style="list-style-type: none"> 투여경로: 경피(외용제)/임상예정경로 마우스 등 부위 털 완전 제모하여 휴지기 유도 군 분리 후 약물도포 약 4주간 발모효과 관찰 대조약과 발모효과 비교
	안전성 시험	100	<ul style="list-style-type: none"> 랫드를 이용한 단회투여독성시험 <ul style="list-style-type: none"> 투여경로 : 경피, 경구 선택이유 : 임상예정경로 및 추가경로 1종 선택 랫드를 이용한 4주 DRF시험 <ul style="list-style-type: none"> 투여경로 : 경피 선택이유 : 임상예정경로를 기준으로 선택 항원성시험 : 피부감작성시험 국소독성시험 : 피부자극시험, 안점막자극시험
협동 (제주대학교)	<i>in vitro</i> 효능 평가 기전 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> Dermal papilla cells의 성장 증식 평가 5α-Reductase 억제 평가 3T3 세포의 증식 평가 모발주기 조절 인자들의 발현 변화 분석: Wnt/β-catenin 신호전달 기전 관련 단백질의 발현 변화 조사
위탁 (충남대학교)	활성분획 제조방법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> 활성분획의 최적 추출조건 설정 <ul style="list-style-type: none"> 발모효능을 나타내는 활성분획물이 대체로 극성이 높은 용매분획에서 추출되므로 다양한 조성의 물과 에탄올의 조합으로 수율 및 활성분획의 함량 비교 후 추출조건 설정 추출용매, 추출방법, 온도, 시간 및 추출횟수 추출 재현성 확보 활성성분의 분리 정제법 확립
	분석시험	100	<ul style="list-style-type: none"> 지표성분의 함량기준 설정 <ul style="list-style-type: none"> HPLC 이용 분석방법 확립 지표성분 설정 및 함량 분석

○ 평가의 착안점 및 기준 달성도

평가항목 (주요성능 spec)	단위	전체항목 에서 차지하는 비중(%)	세계최고 수준	연구개발 전 국내 수준	목표치	결 과 치	달 성 도 (%)	평가방법	
			성능수준	성능수준					
1. 잔류농약 분석시험	총 BHC	ppm	10	-	-	≤0.2	불검출	100	식약청고시 외부의뢰
	총 DDT	ppm		-	-	≤0.1	불검출		
	Aldrin 외	ppm		-	-	≤0.01	불검출		
2. 중금속 함량분석 시험	납	ppm	10	≤5	≤5	≤5	0.32	100	식약청고시 외부의뢰
	비소	ppm		≤3	≤3	≤3	0.25		
	수은	ppm		≤0.2	≤0.2	≤0.2	0.01		
	카드뮴	ppm		≤0.3	≤0.3	≤0.3	0.08		
3. 잔류이산화황 분석시험	ppm	10	≤30	≤30	≤30	0.7	100	식약청고시 외부의뢰	
4. 지표성분 설정	건	10	-	-	2	2	100	KP	
5. 대조약물(미녹시딜) 대비 효력	%	10	-	-	≥100	94	100	양모제 효력평가시험 가이드라인	
6. 제제의 안정성시험 (장기보존, 가속시험)	건	10	적합 여부	적합 여부	1	1	100	식약청고시	
7. 단회투여독성시험 (설치류)	건	10	ICH 가이드라인에 의거	GLP 규정에 의거	1	1	100	의약품등의 독성시험기준 (2009-116호)	
8. 4주 DRF시험	건	10	ICH 가이드라인에 의거	GLP 규정에 의거	1	1	100	의약품등의 독성시험기준 (2009-116호)	
9. 항원성시험	건	10	ICH 가이드라인에 의거	GLP 규정에 의거	1	1	100	의약품등의 독성시험기준 (2009-116호)	
10. 국소독성시험	건	10	ICH 가이드라인에 의거	GLP 규정에 의거	1	1	100	의약품등의 독성시험기준 (2009-116호)	

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 탈모치료에 대한 유효성분을 함유하는 국내자생식물을 의약품 원료로 가공함으로써 고부가가치의 창출
- 탈모치료 관련 *in vitro* 기전연구 및 동물모델을 이용한 기능성 검증 원천기술 확보
- 천연물신약의 제제화 기술 확보에 따른 연구개발의 모델화
- 천연물신약 외용제 안전성시험 축적에 따른 천연물신약 개발에 응용 계획
- 제제의 독자성 확보로 기존 화학물질을 함유한 발모제품 대비 효능이 동등하면서 부작용을 개선할 수 있는 탈모방지 및 발모촉진제의 개발이 가능할 것으로 판단

제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

1. 연구개발결과의 성과

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신제품				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표										
	달성										
2차년도	목표	1	1					1			
	달성	1						1			
3차년도	목표										
	달성										
4차년도	목표										
	달성										
5차년도	목표										
	달성										
계	목표	1	1					1			
	달성	1						1			

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구계획에 따라 도출된 것으로 예시와 같이 작성

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1				
	달성						

2. 논문게재 성과

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
	Effects of dihydrotestosterone on rat dermal papilla cells in vitro	Jung-Il Kang	Hee-Kyung Kang	Sang-Cheol Kim, Min-Kyoung Kim, Hye-JinBoo, Eun-Jl Kim, Jin-Won Hyun, Ji-Hoon Kang, Young-Sang Koh, Deok-Bae Park, Eun-Sook Yoo	Pharmacol Res.		국외	SCI

* 2014. 8. 25 submission 완료

3. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호
2013. 9. 12	섬오가피 및 문주란의 혼합 생약 추출물의 탈모 방지 및 발모 촉진 효과를 갖는 외용조성물	삼천당 제약	대한민국	제 2013-109715호					

4. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계

5. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

6. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

7. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계

제 2 절 개발 기술 활용 계획

1. 신뢰성(Reliability) 인증 확보계획

- GAP 관련 규정에 따른 원료물질의 관리 및 확보
 - 농산물우수관리제(GAP)에 적합한 원료가 될 수 있도록 재배 의뢰하여 원료의 품질을 유지 계획
- 경기의약센터에서 원료의 순도시험을 진행하여 원료의 신뢰성 확보
 - 중금속시험
 - 잔류농약시험
 - 잔류이산화황시험

- 식품의약품 안전청에서 고시한 안정성시험을 수행하여 제품의 신뢰성을 확보
 - 안정성시험(장기보존시험, 가속시험)

2. 제품 양산계획

- 원료의 확보
 - 원료 재배 초기부터 계약재배를 시행하여 안정적인 원료공급 체계를 확립하고, 원료 재배지 확대를 통해 원료공급량 증대시킬 계획임
- 추출 및 분획제조 공정
 - 신규 설비 투자로 추출공정에 적합한 시설설비를 갖추어 생산할 계획임
- 제품 생산
 - 제품의 대량생산은 삼천당제약의 기존 생산시설 이용
 - 추후 생산라인 증설로 제품의 대량 생산 체제 완비

3) 판로확보 및 마케팅 계획

- 삼천당제약의 병원 및 약국 유통망을 이용하여 제품을 유통, 판매 계획
- 1차 목표는 자체 생산 및 판매이지만 발모제에 관심이 많은 태평양제약, CJ제일제당, 현대약품 등과 공동판매 또는 기술이전 고려
- 또한 천연물 의약품을 취급하고 있는 현지 에이전트들을 통해 중국 및 일본 시장에도 진출 계획
- 단순하게 샴푸나 의약외품으로 탈모 문제를 해결하려는 환자들이 대다수를 차지하고 있어 현재 판매되고 있는 발모제 의약품의 비중이 전체 발모제 시장에서 5% 이내에 머무르고 있는 실정이므로 환자들에게 탈모는 단순한 생리현상이 아닌 질병이며 탈모는 의약품으로 치료하여야 한다는 인식을 심어주는 마케팅 전략을 수립 계획
- 기존 발모제는 심혈관계 질환 환자(관상동맥 질환, 부정맥, 울혈성심부전 또는 심장판막 질환, 치료받거나 혹은 치료받지 않은 고혈압, 저혈압환자)가 사용하기에는 적합하지 않고, 여성 탈모환자 사용에 문제가 있으므로 본 개발 제품의 장점을 부각시켜 판매 계획

제 3 절 기술적·경제적 성과

1. 기술적 성과

- 탈모치료에 대한 유효성분을 함유하는 국내자생식물을 의약품 원료로 가공함으로써 고부가가치의 창출
- 탈모치료 관련 *in vitro* 기전연구 및 동물모델을 이용한 기능성 검증 원천기술 확보
- 천연물신약의 제제화 기술 확보에 따른 연구개발의 모델화
- 본 과제 연구결과, 오가피와 문주란 추출물 복합제가 기존 제품인 5% minoxidil과 동등한 효능을 발휘하는 천연물 발모제 개발 기술 확보
- 오가피와 문주란 추출물 복합제의 비임상시험 중 단회투여독성시험, 4주 DRF 시험, 항원성시험, 피부자극시험, 안점막자극시험을 완료하였으며, 이후 장기독성시험을 진행하여 확보된 안전성시험 자료들을 토대로 IND 허가 신청 예정
- 본 연구 성과를 바탕으로 오가피와 문주란 추출물 복합제를 이용한 발모제 조성물 특허출원을 완료하였으며, PCT 출원 중에 있어 획득한 기술 및 정보를 활용하여 향후 천연물신약 개발에 응용 계획

2. 경제적 성과

- 발모촉진에 효능을 나타내는 국내자생식물의 활용으로 재배농가의 소득 증대 기여
- 산업재산권인 국내·외 특허 출원 및 학교·기업과의 공동연구를 통한 제품화 추진
- 폭발적 증가세에 있는 우리나라 탈모환자 발생을 치료 및 방지할 수 있는 약효가 우수한 천연물 신약의 개발을 추진하여 국외에서 개발된 발모제로 독점되어 있는 600억원 이상의 국내 발모제 시장 수입대체 기대
- 발모치료제 의약품 분야에서 선도약제가 전무한 우리나라에 새로운 발모제 의약품을 개발함으로써 국제경쟁력을 강화 기대

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.