



- (51) 국제특허분류:  
G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/001915
- (22) 국제출원일: 2016년 2월 26일 (26.02.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2015-0028474 2015년 2월 27일 (27.02.2015) KR
- (71) 출원인: (주)아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 140-777 서울시 용산구 한강대로 106, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이창석 (LEE, Chang Seok); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 백홍수 (BAEK, Heung Soo); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 주영협 (JOO, Yung Hyup); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 김정환 (KIM, Jeong Hwan); 17074 경기도 용인시 기흥구 용

구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 신흥주 (SHIN, Hong-Ju); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 박미영 (PARK, Mi Young); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 신송석 (SHIN, Song Seok); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR).

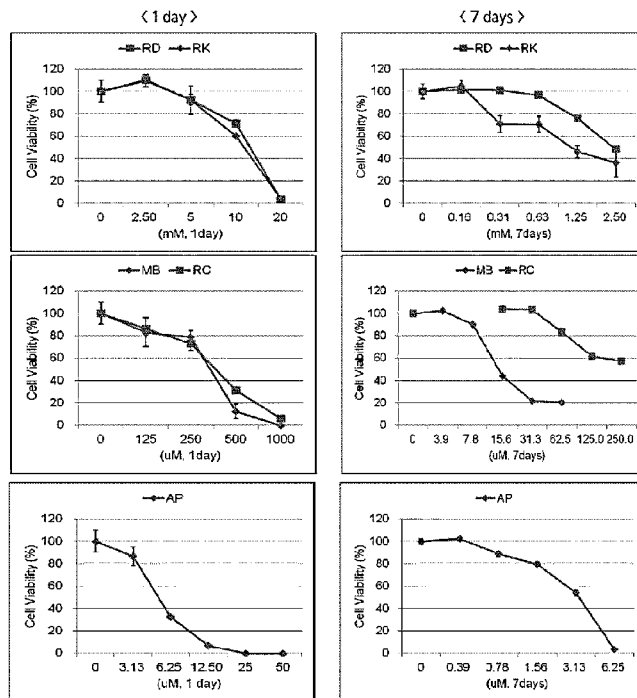
(74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 110-727 서울시 종로구 종로 5길 58 석탄회관빌딩 10층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING SIDE EFFECT OF WHITENING INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 미백성분의 부작용을 예측하는 방법



(57) Abstract: In one aspect of the present specification, provided is a method for predicting a side effect of a whitening ingredient, the method comprising measuring at least one of i) the increase in toxicity according to long-term use of a whitening ingredient, ii) the difference between a concentration having whitening effect and a concentration having cell toxicity, and iii) the increase in sensitivity to the whitening ingredient according to ultra-violet pretreatment. In addition, the method has an effect of effectively predicting whether a side effect will occur if the whitening ingredient is used for a long time.

(57) 요약서: 본 명세서의 일측면에서는 미백성분의 부작용을 예측하는 방법으로서, 상기 방법은, i) 미백성분의 장시간 사용에 따른 독성 증가폭 ii) 미백효능 농도와 세포독성농도의 차이 iii) 자외선 전처리에 따른 미백성분에 대한 민감도 증가폭 중 하나 이상을 측정하는 것을 포함하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 미백성분을 장시간 사용할 경우의 부작용 발생 여부를 효과적으로 예측하는 효과가 있다.



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

## 명세서

### 발명의 명칭: 미백성분의 부작용을 예측하는 방법

#### 기술분야

- [1] 본 명세서에는 미백성분의 부작용을 예측하는 방법이 개시된다.

#### 배경기술

- [2] 얼굴 색을 하얗게 만드는 피부 미백(Skin Whitening) 화장품에 대한 관심이 크다. 특히 동양인 그 가운데서도 여성들이 지대한 관심을 보인다. 세계 유수의 화장품 회사들이 동양인 여성을 타겟으로 삼는 데는 그만한 이유가 있는 셈이다. 동양인들의 인구도 많지만, 백인이나 흑인에 비해 하얀 피부에 유난히 집착을 하는 경향이 있다. 운동에 관심이 있음에도 불구하고 야외 운동을 극구 꺼리는 여성도 사실 적지 않다. 특히 골프장에 가보면, 아예 얼굴은 복면을 하고 팔과 종아리 부위는 옷으로 가려 도대체 신분 확인 안될 정도인 경우도 있다.
- [3] 자외선 차단제가 멜라닌을 만드는 자외선을 차단한다면, 미백 화장품은 자외선을 받은 뒤 멜라닌이 만들어지지 않게 한다. 식약청은 미백물질 농도가 일정 기준 이상 되어야 기능성 화장품으로 인정하고 있다. 미백 물질은 일정량 이상이 되어야만 실제로 효능을 발휘하기 때문이다. 미백물질은 다양한 기전으로 멜라닌 생성을 막는데, 멜라닌을 만드는데 관련된 효소인 티로시나아제가 활성화되는 것을 막거나, 티로시나아제 효소에 자극받은 티로신이 산화되는 것을 막아주거나, 이미 생성된 멜라닌이 멜라노사이트에서 각질형성세포로 넘어가는 단계를 억제한다.
- [4] 그러나 상기의 기전으로 작용하는 미백 물질은 부작용을 유발하기도 한다. 한 예로, 가네보사의 기능성 미백원료인 '로도데놀(Rhododenol 또는 Rhododendrol)'을 주성분으로 한 미백라인 구매 사용 고객 약 16,000 여명에게서 백반증 유사 증상이 나타나, 막대한 보상 금액 지불 및 브랜드 폐지라는 초유의 사태가 발생하였다. 멜라닌 생성 억제 효능 소재로 개발되어 미백 화장품으로 판매되었던 가네보사의 Rhododenol과 그 유사체인 Raspberryketone, 그리고 백반증 환자의 얼룩덜룩한 색소를 백색화시키는 Monobenzone 은 모두 멜라닌 세포 독성이라는 공통적인 현상을 수반하는 것으로 밝혀 졌다. 하지만, 유사한 기전(Tyrosinase activity 억제) 으로 멜라닌 생성 억제 효능을 나타내는 Rucinol(4-n-Butylresorcinol)의 경우에는 상업화된 미백제품 사용 고객들로부터 아직 임상적인 문제가 보고된 바 없다.
- [5] 이에 미백성분의 장기간 반복적 사용으로 인해 나타날 수 있는 임상 부작용을 미리 예측할 수 있는 검증시스템 등을 통해 소재의 안전성을 스크리닝 할 필요성이 대두되고 있다. 또한, 미백성분의 안정성 규명을 위해 수 년간의 오랜 시간과 막대한 비용을 소비하기가 쉽지 않다는 점에서 간편하면서도, 빠르고 정확한 미백성분의 부작용 측정시스템의 필요성이 대두되고 있다.

- [6] 선행기술문헌
- [7] (특허문헌 1) 대한민국 등록공보 제 10-1206200호
- [8]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [9] 본 명세서의 일 측면에서는, 미백성분의 부작용을 예측하는 방법을 제공하고자 한다.
- [10] 또한 본 명세서의 다른 일 측면에서는, 미백성분의 부작용을 예측하여 부작용이 현저히 감소된 미백성분을 판단하는 방법을 제공하고자 한다.

### 과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 일 측면은 미백성분의 부작용을 예측하는 방법으로서, 미백성분의 장시간 사용에 따른 세포독성 증가폭을 측정하는 방법을 제공한다.
- [12] 본 발명의 일 측면은 미백성분의 부작용을 예측하는 방법으로서, 미백 효능농도와 세포독성 유발 농도간의 상관배수를 측정하는 방법을 제공한다.
- [13] 본 발명의 일 측면은 미백성분의 부작용을 예측하는 방법으로서, 자외선 전처리에 따른 미백성분에 대한 민감도 증가폭을 측정하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [14] 본 발명의 일 측면에 따른 미백성분의 부작용 측정방법은 미백성분을 장시간 사용할 경우의 부작용 발생 여부를 효과적으로 예측하는 효과가 있다.
- [15] 본 발명의 일 측면에 따른 미백성분의 부작용 측정방법은 미백효능 농도와 세포 독성유발 농도간의 상관관계를 간편하게 규명하는 효과가 있다.
- [16] 본 발명의 일 측면에 따른 미백성분의 부작용 측정방법은 자외선 유무에 따른 부작용 증가폭을 효과적으로 예측하는 효과가 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 실험예에 사용된 미백성분인 시험물질의 구조이다.
- [18] 도 2는 실험예 1-1에서 각 시료별 1일 및 7일 에서 농도에 따른 세포독성을 나타낸 것이며, RD는 Rhododenol, RK는 Raspberryketone, MB는 Monobenzone, RC는 Rucinol, AP는 5-아다만탄-1-일-N-(2,4-디히드록시벤질)-2,4-디메톡시-벤조산아미드이다.
- [19] 도 3은 실험예 1-2에서 각 시료별로 24시간 동안 시료 처리 후 세포독성, 24 시간 동안 시료 처리하고 새로운 배지로 교환 한 뒤 48 시간 후 세포독성, 72시간 동안 시료 처리 후 세포독성을 나타낸 것이다.
- [20] 도 4는 실험예 2에서 각 시료별 7 days 에서 Melanin 합성 저해 농도를 비교한 것이다.
- [21] 도 5는 실험예 3에서 각 소재별 UVB 조사를 하거나 안한 후에 7 days 에서 세포 독성 변화값을 비교한 것이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 본 발명의 일 관점에서, 미백성분의 장시간 사용에 따른 독성 증가폭을 측정하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다.
- [23] 본 발명의 일 관점에서, 미백성분의 부작용을 예측하는 방법으로서, 상기 방법은, 하기 중 하나 이상을 측정하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [24] i) 미백성분의 장시간 사용에 따른 독성 증가폭;
- [25] ii) 미백효능농도와 세포독성농도의 차이; 및
- [26] iii) 자외선 전처리에 따른 미백성분에 대한 민감도 증가폭
- [27] 본 발명의 일 관점에서, 상기 i)의 독성 증가폭은, 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 후 3 내지 36시간이 되는 시점에 측정된 제 1 세포독성에 대한, 48 시간 이상이 되는 시점에 측정된 제 2 세포독성의 비율인 미백성분의 부작용을 예측하는 방법을 제공한다.
- [28] 본 발명의 일 관점에서, 상기 ii)의 미백효능농도와 세포독성농도의 차이는, 멜라닌 세포의 멜라닌 생성을 유효하게 억제하는 미백성분의 멜라닌 생성 억제 효능 농도에 대한, 멜라닌 세포의 독성을 야기하는 미백성분의 세포독성 농도의 상관배수인 미백성분의 부작용을 예측하는 방법을 제공한다.
- [29] 본 발명의 일 관점에서, 상기 iii)의 민감도 증가폭은, 자외선이 조사되지 않은 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 한 대조군의 세포독성에 대한, 자외선이 조사된 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 한 실험군의 세포독성의 비율인 미백성분의 부작용을 예측하는 방법을 제공한다.
- [30] 본 발명의 일 관점에서, 미백성분의 부작용을 측정하는 방법으로서, 멜라닌 세포에 미백성분을 첨가하는 단계; 미백성분이 첨가된 멜라닌 세포의 처리 시간은 3 내지 36 시간으로 한 제 1 세포독성을 측정하는 단계; 미백성분이 첨가된 멜라닌 세포의 처리 시간은 48시간 이상이 되는 시점에 제 2 세포독성을 측정하는 단계; 및 상기 제 1 세포독성 대비 상기 제 2 세포독성의 비율을 측정하는 단계;를 포함하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다.
- [31] 본 발명의 일 관점에서 상기 제 1 세포독성을 측정하는 단계의 처리 시간은 예컨대 3시간 이상, 4시간 이상, 6시간 이상, 8시간 이상, 10시간 이상, 12시간 이상, 14 시간 이상, 16 시간 이상, 18 시간 이상, 20시간 이상 또는 22 시간 이상일 수 있다.
- [32] 한편 상기 제 1 세포독성을 측정하는 단계의 처리 시간은 예컨대 36시간 이하, 34 시간 이하, 32 시간 이하, 30 시간 이하, 28 시간 이하, 26 시간 이하 또는 24 시간 이하일 수 있다.
- [33] 본 발명의 일 관점에서 상기 제 2 세포독성을 측정하는 단계의 처리 시간은 예컨대 48 시간 이상, 60 시간 이상, 72 시간 이상, 84 시간 이상, 96 시간 이상, 108 시간 이상, 120 시간 이상, 132 시간 이상, 144 시간 이상, 156 시간 이상, 168 시간 이상 또는 180 시간 이상일 수 있다.
- [34] 한편 상기 제 2 세포독성을 측정하는 단계의 처리 시간은 예컨대 480 시간 이하, 456 시간 이하, 432 시간 이하, 408 시간 이하, 384 시간 이하, 360 시간 이하, 336

시간 이하, 312 시간 이하, 288 시간 이하, 264 시간 이하, 240 시간 이하, 216 시간 이하 또는 192 시간 이하일 수 있다.

- [35] 처리 시간이 상기 범위내일 때 시간에 따른 세포독성의 비율을 효과적으로 측정할 수 있다.
- [36] 본 발명의 일 관점에서 상기 세포독성은 미백성분을 처리하지 않은 대조군 대비 미백성분을 처리한 세포의 흡광도로 표시되는 세포 생존률(%)일 수 있다. 예컨대, 하기 수학적 식 1에 따른 세포 생존률(%)인 것을 특징으로 하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법일 수 있다.
- [37] [수학적 식 1]
- [38] 세포 생존률(%) =  $\{(A_{\text{sample}} - A_b)/(A_c - A_b)\} \times 100$
- [39]  $A_{\text{sample}}$  : 각 미백성분을 처리한 시료의 450nm에서의 흡광도 값
- [40]  $A_b$  : Blank
- [41]  $A_c$  : Vehicle Control (0.5% DMSO)
- [42]
- [43] 본 발명의 일 관점에서 상기 세포독성은 대조군 대비 세포의 20%가 사멸하는 농도인  $CC_{20}$ (20% Cytotoxicity Concentration)인 것을 특징으로 하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다. 상기  $CC_{20}$ 은 통상적으로 세포독성이 나타나기 시작하는 농도로 간주된다.
- [44] 본 발명의 일 관점에서 상기 세포독성은 대조군 대비 세포의 절반이 사멸하는 농도인  $CC_{50}$ (50% Cytotoxicity Concentration)인 것을 특징으로 하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다. 상기  $CC_{50}$ 은 Vehicle Control군(대조군) 대비 세포의 절반이 사멸하는 농도를 나타낸다.
- [45] 본 발명의 일 관점에서 상기 제 1 세포독성 대비 상기 제 2 세포독성의 비율은 배수값(Fold)으로 환산하여 측정할 수 있다.
- [46]
- [47] 본 발명의 다른 관점에서 미백성분의 부작용을 측정하는 방법으로서, 미백효능농도와 세포독성농도의 차이 측정하는 방법을 포함하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다. 예컨대, 상기 미백효능농도와 세포독성농도의 차이 측정은 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 후 세포독성농도를 측정하고, 상기 처리후의 멜라닌 세포의 멜라닌 생성억제 효능농도를 측정하며, 상기 멜라닌 생성억제효능농도 대비 상기 세포독성농도의 상관배수를 측정하는 것을 특징으로 하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법일 수 있다.
- [48] 본 발명의 다른 관점에서, 미백성분이 첨가된 멜라닌 세포의 처리 시간은 3 내지 480 시간으로 한 세포독성을 측정하는 단계; 미백성분이 첨가된 멜라닌 세포의 처리 시간은 3 내지 480 시간으로 하여 멜라닌 생성을 50% 억제하는 효능농도인  $EC_{50}$ 을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 세포독성을  $EC_{50}$ 으로 나누어 세포독성 농도와 멜라닌 저해효능농도( $EC_{50}$ )의 상관배수를 측정하는 단계;를

포함하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다.

- [49] 본 발명의 다른 관점에서 상기 세포독성은 대조군 대비 세포의 절반이 사멸하는 농도인  $CC_{50}$ (50% Cytotoxicity Concentration)이거나, 대조군 대비 세포의 20%가 사멸하는 농도인  $CC_{20}$ (20% Cytotoxicity Concentration)인 것을 특징으로 하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다.
- [50] 본 발명의 다른 관점에서 상기 세포독성을 측정하는 단계의 처리 시간은 예컨대 3 시간 이상, 6 시간 이상, 12 시간 이상, 24 시간 이상, 48 시간 이상, 60 시간 이상, 72 시간 이상, 84 시간 이상, 96 시간 이상, 108 시간 이상, 120 시간 이상, 132 시간 이상, 144 시간 이상, 156 시간 이상, 168 시간 이상 또는 180 시간 이상일 수 있다.
- [51] 한편 상기 세포독성을 측정하는 단계의 처리 시간은 예컨대 480 시간 이하, 456 시간 이하, 432 시간 이하, 408 시간 이하, 384 시간 이하, 360 시간 이하, 336 시간 이하, 312 시간 이하, 288 시간 이하, 264 시간 이하, 240 시간 이하, 216 시간 이하 또는 192 시간 이하일 수 있다.
- [52] 본 발명의 다른 관점에서 상기 효능농도인  $EC_{50}$ 을 측정하는 단계에서 처리 시간은 예컨대 3 시간 이상, 6 시간 이상, 12 시간 이상, 24 시간 이상, 48 시간 이상, 60 시간 이상, 72 시간 이상, 84 시간 이상, 96 시간 이상, 108 시간 이상, 120 시간 이상, 132 시간 이상, 144 시간 이상, 156 시간 이상, 168 시간 이상 또는 180 시간 이상일 수 있다.
- [53] 한편 상기 효능농도인  $EC_{50}$ 을 측정하는 단계에서 처리 시간은 예컨대 480 시간 이하, 456 시간 이하, 432 시간 이하, 408 시간 이하, 384 시간 이하, 360 시간 이하, 336 시간 이하, 312 시간 이하, 288 시간 이하, 264 시간 이하, 240 시간 이하, 216 시간 이하 또는 192 시간 이하일 수 있다.
- [54] 처리 시간이 상기 범위내일 때 미백 효능(멜라닌 세포의 멜라닌 생성억제효능농도)과 세포독성농도간의 상관배수를 효과적으로 측정할 수 있다.
- [55]
- [56] 본 발명의 또 다른 관점에서, 자외선 전처리에 따른 미백성분에 대한 민감도 증가폭을 측정하는 것을 특징으로 하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다.
- [57] 예컨대, 상기 민감도 증가폭 측정은 자외선이 조사된 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 한 실험군의 세포독성을 측정하고, 자외선이 조사되지 않은 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 한 대조군의 세포독성을 측정하며, 상기 실험군과 대조군의 세포독성의 비율을 측정하는 것을 특징으로 하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법일 수 있다.
- [58] 본 발명의 또 다른 관점에서 자외선이 조사된 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 후 3 내지 480 시간이 되는 시점에 실험군의 세포독성을 측정하고, 자외선이 조사되지 않은 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 후 3 내지 480 시간이 되는

시점에 대조군의 세포독성을 측정하는 단계; 및 상기 실험군과 대조군의 세포독성의 비율을 측정하는 단계;를 포함하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다.

[59] 본 발명의 또 다른 관점에서 상기 실험군과 대조군의 세포독성은 상기 수학적 1에 따른 세포 생존률(%)인 것을 특징으로 하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다.

[60] 본 발명의 또 다른 관점에서 상기 실험군과 대조군의 세포독성을 측정하는 단계의 처리 시간은 예컨대 3 시간 이상, 6 시간 이상, 12 시간 이상, 24 시간 이상, 48 시간 이상, 60 시간 이상, 72 시간 이상, 84 시간 이상, 96 시간 이상, 108 시간 이상, 120 시간 이상, 132 시간 이상, 144 시간 이상, 156 시간 이상, 168 시간 이상 또는 180 시간 이상일 수 있다.

[61] 한편 상기 실험군과 대조군의 세포독성을 측정하는 단계의 처리 시간은 예컨대 480 시간 이하, 456 시간 이하, 432 시간 이하, 408 시간 이하, 384 시간 이하, 360 시간 이하, 336 시간 이하, 312 시간 이하, 288 시간 이하, 264 시간 이하, 240 시간 이하, 216 시간 이하 또는 192 시간 이하일 수 있다.

[62] 처리 시간이 상기 범위내일 때 자외선 전처리에 따른 미백성분에 대한 민감도 증가폭을 효과적으로 측정할 수 있다.

[63] 본 발명의 또 다른 관점에서 상기 자외선은 0.1 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 0.5 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 1 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 2 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 3 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 4 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 5 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 6 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 7 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 8 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 9 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 10 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 11 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 12 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 13 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 14 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 15 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 16 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 17 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 18 mJ/cm<sup>3</sup> 이상, 19 mJ/cm<sup>3</sup> 이상 또는 20 mJ/cm<sup>3</sup> 이상일 수 있다.

[64] 한편, 상기 자외선은 500 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 480 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 460 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 44 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 420 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 400 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 380 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 360 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 340 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 320 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 300 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 280 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 260 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 240 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 220 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 200 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 180 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 160 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 140 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 120 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 100 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 80 mJ/cm<sup>3</sup> 이하, 60 mJ/cm<sup>3</sup> 이하 또는 40 mJ/cm<sup>3</sup> 이하일 수 있다.

[65] 자외선 조사량이 상기 범위내일 때 자외선 전처리에 따른 미백성분에 대한 민감도 증가폭을 효과적으로 측정할 수 있다.

[66] 또한 본 발명의 일 관점에서 상기 미백성분의 부작용을 측정하는 방법 중 어느 하나 이상을 측정하는 것을 포함하는 미백성분의 부작용을 측정하는 방법을 제공한다.

[67] 미백성분의 부작용은 다양하며, 대표적인 부작용으로는 피부노화, 암발생, 반여드름 발생, 튜살발생 및 백반증등의 부작용이 있다. 이 중 가장 대표적인 부작용은 백반증이며, 백반증 유사 부작용 증상을 유발하는 것으로 알려진 미백성분은 Rhododenol, Raspberryketone, Monobenzone이다. 본 발명에 있어 상기 미백성분을 멜라닌 세포독성의 Positive compounds로 사용하였다.

한편, 1998년 POLA Chemical Industries 의 Dr. Okubo가 전나무로부터 분리한 4-butylresorcinol 을 미백 효능물질로 개발한 뒤, Rucinol 이란 이름으로 1999년부터 시장에 제품 출시하였는데, 이 미백성분은 현재까지 15여년간 많은 미백제품 원료로 사용되고 있다. 특히, 이 제품 사용자들의 임상 부작용 사례는 아직까지 보고되지 않은 바, 본 연구에서는 오랜 기간 사용에 의해 안전성이 입증된 Rucinol 을 멜라닌 세포독성의 Negative compound 로 사용하였다.

[68]

### 발명의 실시를 위한 형태

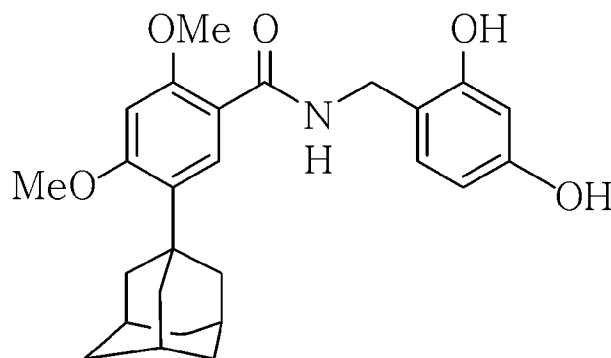
[69] 이하, 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[70]

### 미백성분(시험 물질)의 준비

[72] 시험물질은 Rhododenol(>98%), Raspberryketone(>98%), Monobenzene(>98%), Rucinol(>98%), 5-아다만탄-1-일-N-(2,4-디히드록시벤질)-2,4-디메톡시-벤조산아미드(>98%)이다. Rhododenol, Raspberryketone, 5-아다만탄-1-일-N-(2,4-디히드록시벤질)-2,4-디메톡시-벤조산아미드는 합성하여 제공되었다(도 1). 특히, 5-아다만탄-1-일-N-(2,4-디히드록시벤질)-2,4-디메톡시-벤조산아미드(이하 'AP'라함)은 본 발명의 일측면에서, 발명자들에 의해 합성된 물질로 하기 화학식 1의 구조를 가지며, 하기 실험예 2에 의할 때 멜라닌 세포의 멜라닌 생성억제효능이 뛰어난 것으로 측정되었다.

[73] [화학식1]



### 5-아다만탄-1-일-N-(2,4-디히드록시벤질)- 2,4-디메톡시-벤조산아미드

[74] Monobenzene (4-benzyloxy-phenol)은 Santacruz Biotechnology (USA, Cat. No. sc-232257)에서, Rucinol (4-butylresorcinol)은 Tokyo Chemical Industry (Japan, Cat. No. B3773)에서 각각 구입하였다. 모든 시험물질은 DMSO에 녹였으며, 세포에

처리된 최종 DMSO 농도는 0.5%이다.

[75]

[76] 멜라닌 세포주의 준비

[77] 실험에 사용된 세포는 HEMn-MP와 A375이다.

[78] HEMn-MP (Human Epidermal Melanocytes, neonatal, moderately pigmented donor, Cat. No. C-102-5C) 이며, 구입처는 Life technologies (USA) 이다. 세포배양액은 Medium 254 (Cat. No. M-254-500)에 HMGS (Cat. No. S-002-5)를 넣은 배지를 사용하였다. 세포 배양 과정은 제조업체의 매뉴얼대로 진행하였으며, 모든 세포는 passage 3~8 사이를 이용하였다. 요약하면, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 175T 플라스크에 세포를 배양하였으며, 계대배양 시 0.05% Trypsin-EDTA 를 이용하여 세포를 분리한 뒤, 원심분리기(1200RPM, 5분)를 이용하여 세포를 모아 5 X 10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> 로 seeding하여 배양 하였다. 세포 독성 시험을 위해서는, 96well plate에 세포를 2 x 10<sup>4</sup> cells/well 로 seeding 하여 하루 동안 배양 시키고, 각 약물을 특정 농도로 200ul/well 배지에 처리한 다음 일정시간이 지난 후 세포독성을 검증하였다.

[79] 또 다른 세포주, A375(Human melanoma cell line)은 ATCC(Cat. No. CRL-1619, USA)에서 구입하였다. 세포배양액은 DMEM(Cat. No. 12-604, Lonza, USA)에 FBS(Cat. No. 16000-044, Gibco, USA)를 10% 넣은 배지를 사용하였으며, 계대 배양 및 세포 독성 시험법은 HEM 과 동일하다.

[80]

[81] 세포 독성 측정

[82] 세포 독성은 Cell Counting Kit-8(CCK-8)으로 측정하였으며, 제조사는 Dojindo Molecular Technologies (USA)이다. 측정 방법은 96well 에서 배양이 끝난 세포의 배지를 제거하고, 동일 배지로 10% CCK-8을 제조 후 각 well 에 200ul씩 첨가하여, 37°C에서 약 2시간 정도 반응시킨다. 그 후, 반응이 끝난 배지 100ul를 ELISA reader 기기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포의 사멸이 진행될수록 CCK-8이 colorless에서 orange color로 변하게 되어 장파장으로 변한다.

[83] 세포 생존률은 아래 수학적 식 1에 따라 구하였다.

[84] [수학적 식 1]

[85]  $\text{Cell survival rate (\%)} = \{(A_{\text{sample}} - A_b)/(A_c - A_b)\} \times 100$

[86]  $A_{\text{sample}}$  : 각 미백 성분을 처리한 멜라닌 세포의 450nm에서의 흡광도 값

[87]  $A_b$  : Blank

[88]  $A_c$  : Vehicle Control (0.5% DMSO)

[89]

[90] 통계처리

[91] 데이터 결과 통계는 Student's t-test 를 사용하였으며, 독립된 3회 이상의 시험을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 평균값 및 표준편차 (SD)로 나타내었다.

[92]

[93] 실험예1-1 : HEMn-MP 세포에서 각 미백성분별/처리시간별 세포 독성 농도 비교

[94] HEMn-MP(Human Epidermal Melanocytes, neonatal, moderately pigmented donor, Cat. No. C-102-5C)에서 각 미백 성분별 세포 독성 농도를 구하고자, 각각의 미백 성분을 하기 표 1의 농도로 각각 처리 한 후 1일 및 7일 뒤 Control군(0.5% DMSO) 대비 세포 생존률(% Cell Survival Rate) 을 측정하여 그래프로 나타내었다 (도 2). 또한, 측정 결과를 통해 각 미백 성분별/처리시간별로  $CC_{20}$  과  $CC_{50}$  농도를 구하고, 이를 이용하여 1일차 대비 7일차 세포 독성 농도의 비율을 계산한 값을 표 2에 나타내었다.

[95]

[96] [표1]

|                                                            | 농도(1일)                                                            | 농도(7일)                                                                                  |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| RD (Rhododenol) 및<br>RK (Raspberryketone)                  | 2.5mM5 mM10<br>mM20 mM                                            | 0.16 mM0.31 mM0.63 mM1.25 mM2.50<br>mM                                                  |
| MB (Monobenzonol) /<br>RC (Rucinol)                        | 125 $\mu$ M250 $\mu$ M5<br>00 $\mu$ M1000 $\mu$ M                 | 3.9 $\mu$ M7.8 $\mu$ M15.6 $\mu$ M31.3 $\mu$ M62.5 $\mu$ M125.0 $\mu$<br>M250.0 $\mu$ M |
| AP(5-아다만탄-1-일-<br>N-(2,4-디히드록시벤<br>질)-2,4-디메톡시-<br>벤조산아미드) | 3.13 $\mu$ M6.25 $\mu$ M<br>12.50 $\mu$ M25 $\mu$ M<br>50 $\mu$ M | 0.39 $\mu$ M0.78 $\mu$ M1.56 $\mu$ M3.13 $\mu$ M6.25 $\mu$ M                            |

[97] [표2]

| 미백 성분명                                   |                                | RD (mM)  | RK (mM)  | MB (uM)    | RC (uM)    | AP (uM) |
|------------------------------------------|--------------------------------|----------|----------|------------|------------|---------|
| 1일                                       | CC <sub>20</sub>               | 7.1±0.8  | 6.5±0.2  | 178.2±21.6 | 170.2±15.9 | 3.3±0.4 |
|                                          | CC <sub>50</sub>               | 10.8±0.7 | 10.4±0.2 | 284.3±28.2 | 346.7±12.7 | 5.4±0.3 |
| 7일                                       | CC <sub>20</sub>               | 1.0±0.0  | 0.4±0.1  | 8.9±0.4    | 69.7±6.1   | 1.3±0.0 |
|                                          | CC <sub>50</sub>               | 2.4±0.1  | 1.4±0.4  | 19.0±0.7   | 283.8±20.4 | 2.5±0.0 |
| 1일차 대비<br>7일차<br>세포 독성<br>비율(배,<br>Fold) | CC <sub>20</sub><br>기준상대<br>비교 | 7.1      | 16.3     | 20         | 2.4        | 2.5     |
|                                          | CC <sub>50</sub><br>기준상대<br>비교 | 4.5      | 7.4      | 14.9       | 1.2        | 2.2     |

[98] HEMn-MP 세포를 이용한 독성시험에서 각 미백 성분에 대한 세포독성반응은 약물 노출 시간에 따라 현저히 달랐다. 미백성분 중 부작용이 있는 물질로 공지된 RD, RK, MB 를 처리한 세포에서 1일 기준 세포독성에 비해 7일 기준 세포독성이 최소 4.5배에서 최대 14.9배 가량 독성이 증가(CC<sub>50</sub> 기준)한 반면 아직까지 부작용에 대한 임상보고가 없는 RC(1.2배)와 AP(2.2배)는 비교적 세포독성 증가 폭이 좁았다(표 2). 이는, 시료에 따라 약물처리(노출)기간이 증가할수록 그 독성 증가폭도 다양하게 나타난다는 것을 보여주고 있으며, 흥미롭게도 백반증 유발(멜라닌세포 독성)소재로 알려진 RD, RK, MB에서 그 현상은 특별히 높게 나타났다. 따라서, 1일 기준 세포독성에 비해 7일 기준 세포독성이 2.7배 이상, 2.8배 이상, 2.9배 이상, 3.0배 이상, 3.1 배 이상, 3.2배 이상, 3.3배 이상, 3.4배 이상, 3.5배 이상, 3.6배 이상, 3.7 배 이상, 3.8 배 이상, 3.9 배 이상, 4.0 배 이상, 4.1 배 이상, 4.2 배 이상, 4.3 배 이상 또는 4.4 배 이상인 경우 미백성분의 부작용이 있는 것으로 판단 할 수 있다.

[99]

[100] 실험예1-2 : A375 세포에서 각 미백성분별/처리시간별 세포 독성 농도 비교

[101] Human melanoma cell line, A375 (Cat. No. CRL-1619) 세포주에서 각 미백성분별, 처리 시간별 세포 독성을 확인하였는데, 이번 시험에는 시료 처리 조건을 3가지로 구분하여 독성을 측정 하였다. 먼저, 각각의 미백성분을 처리한 후 24h 이 지난 뒤 세포 독성 측정, 또는 24h 이 지난 뒤 소재가 처리된 배지를 버린 후, 새로운 배지로 교환하여 48h 을 추가 배양한 뒤 세포 독성 측정,

마지막으로 시료가 처리된 후 배지 교환 없이 72h 이 지난 뒤 세포 독성을 측정하여 그래프로 나타내었다(도 3). 또한, 측정 결과를 통해 각 미백성분별/처리시간별로  $CC_{20}$  과  $CC_{50}$  농도를 구하고, 이를 이용하여 1일차 대비 3일차 세포 독성 농도의 비율을 계산하였다(표 3).

[102] [표3]

| 미백성분명                        |                   | RD (mM)   | RK (mM)   | MB (uM)   | RC (uM)     | AP (uM)    |
|------------------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|------------|
| 1일                           | $CC_{20}$         | 4.2±0.2   | 6.7±0.1   | 119.8±4.7 | 313.9±10.6  | 25.5±0.8   |
|                              | $CC_{50}$         | 8.4±0.2   | 10.7±0.1  | 294.8±7.2 | 508.4±11.3  | 33.8±0.7   |
| 3일                           | $CC_{20}$         | 0.19±0.01 | 0.24±0.02 | 2.31±0.07 | 52.73±4.67  | 17.2±0.09  |
|                              | $CC_{50}$         | 0.50±0.02 | 0.79±0.04 | 7.19±0.14 | 122.13±10.9 | 19.99±0.06 |
| 1일차 대비 3일차 세포 독성 비율(배, Fold) | $CC_{20}$ 기준상대 비교 | 22.1      | 27.9      | 51.8      | 6.0         | 1.5        |
|                              | $CC_{50}$ 기준상대 비교 | 16.8      | 13.5      | 41        | 4.2         | 1.7        |

[103] A375 세포실험결과에서도 RD, RK, MB 처리시 1일 기준 세포독성에 비해 3일 기준 세포독성이 16.8~41배 가량 증가( $CC_{50}$ 기준)하는 반면 RC(4.2배), AP(1.7배)는 비교적 독성 증가 폭이 적은 것으로 나타났다(표 3). 이를 통해, RD, RK, MB는 상대적으로 시간에 따른 독성 증가가 두드러지게 큰 폭으로 증가함으로써 이들 시료에 접촉된 멜라닌세포의 독성은 시간에 비례하여 세포 사멸 가능성이 큰 것으로 생각되며, 이는 백반증을 유발하는 시료들의 in vitro melano-cytotoxicity 특징적인 현상 중 하나로 생각된다. 따라서, 1일 기준 세포독성에 비해 3일 기준 세포독성이 7배 이상, 7.5 배 이상, 8 배 이상, 8.5 배 이상, 9 배 이상, 9.5 배 이상, 10 배 이상, 10.5 배 이상, 11 배 이상, 11.5 배 이상 또는 12배 이상인 경우 미백성분의 부작용이 있는 것으로 판단 할 수 있다.

[104] 특히, A375 세포에서 1일 동안 시료처리 시 약물을 제거하고 2일간 추가 배양하였을 경우 RD, RK, MB 시료처리군은 독성이 계속 증가한 반면 RC, AP 처리군은 더 이상 세포 독성이 증가하지 않은 점으로 보아, 약물 노출 후 제거에 따른 세포 독성 회복력(Recovery)도 약물에 따라 다르며, 이것 역시 백반증 증상 유발 미백성분과 RC, AP 미백성분의 차별점 중 하나이다(도 2).

[105]

[106] 실험예 2 : HEMn-MP 세포에서 각 미백성분별 세포 독성 농도와 효능 농도의 상관 관계 비교

[107] HEMn-MP세포에서 미백성분별 멜라닌 생성 억제효능을 규명하였다. 각 시료별 표 4의 농도로 처리 후 7일 동안 배양하여 Control 군(0.5% DMSO) 대비 멜라닌 양을 측정하여 그래프로 나타내었다 (도 4). 또한, 각 미백성분별 멜라닌 억제 효능을 정량화시킨  $EC_{50}$ (멜라닌 생성 50% 억제 효능농도)를 계산하여 표시하였다 (표 5). 그리고, 세포독성과 멜라닌 생성 억제 효능 농도간의 상관 배수(농도 차이)를 알아보기 위하여 각각의 정량 값  $CC_{20}$  또는  $CC_{50}$  에  $EC_{50}$ 를 나누어 표시하였다 (표 6).

[108] [표4]

|         | 농도(7일)                                                                                     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| RD 및 RK | 10 $\mu$ M 20 $\mu$ M 39 $\mu$ M 78 $\mu$ M 156 $\mu$ M 313 $\mu$ M 625 $\mu$ M            |
| MB      | 0.2 $\mu$ M 0.5 $\mu$ M 1.0 $\mu$ M 2.0 $\mu$ M 3.9 $\mu$ M 7.8 $\mu$ M 15.6 $\mu$ M       |
| RC      | 2.0 $\mu$ M 3.9 $\mu$ M 7.8 $\mu$ M 15.6 $\mu$ M 31.3 $\mu$ M 62.5 $\mu$ M 125.0 $\mu$ M   |
| AP      | 0.02 $\mu$ M 0.05 $\mu$ M 0.10 $\mu$ M 0.20 $\mu$ M 0.39 $\mu$ M 0.78 $\mu$ M 1.56 $\mu$ M |

[109] [표5]

\*  $EC_{50}$  (50% Inhibitory Concentration of Melanin synthesis)

| 농도        | RD (mM)         | RK (mM)         | MB ( $\mu$ M) | RC ( $\mu$ M) | AP ( $\mu$ M)   |
|-----------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|-----------------|
| $EC_{50}$ | 1.13 $\pm$ 0.16 | 0.97 $\pm$ 0.09 | 6.8 $\pm$ 2.5 | 2.7 $\pm$ 0.6 | 0.11 $\pm$ 0.01 |

[110] [표6]

| Fold              | RD  | RK  | MB  | RC  | AP   |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|------|
| $CC_{20}/EC_{50}$ | 0.8 | 0.4 | 1.3 | >20 | 11.8 |
| $CC_{50}/EC_{50}$ | 2.1 | 1.4 | 2.8 | >20 | >20  |

[111] 표 6은 각 미백성분별 7 days 에서 세포 독성 ( $CC_{50}$ ) 농도와 멜라닌 저해 효능 ( $EC_{50}$ ) 농도간 상관 배수를 비교한 것으로,  $CC_{20}/EC_{50}$ 은 20% 세포 독성 농도를 50% 멜라닌 저해 효능 농도로 나눈 값으로 효능 농도로부터 20% 독성이 나타나는 농도의 상관 배수를 나타낸 것이다.  $CC_{50}/EC_{50}$ 은 50% 세포 독성 농도를 50% 멜라닌 저해 효능 농도로 나눈 값으로, 효능 농도로부터 50% 독성이 나타나는 농도의 상관 배수를 나타낸 것이다.

[112]

[113] RD, RK, MB 는 멜라닌 억제 효능 농도( $EC_{50}$ )에서 1.4~2.8배 높게 처리하게 되면 50% 세포독성을 나타나게 되지만, RC와 AP는 20배 이상 높게 처리할 경우에만 50% 세포 독성을 나타내었다(표 6). 즉, RD, RK, MB 는 효능 농도와 세포독성 농도 차, 즉 in vitro Safety margin이 매우 좁은 반면 RC와 AP는 효능과 독성 농도간에 20배 이상의 충분한 Safety margin을 유지됨으로써 넓은 안전영역이 확보되어 있음을 확인 하였다. 따라서,  $CC_{50}/EC_{50}$  이 5배 이상, 6 배 이상, 7 배

이상, 8 배 이상, 9 배 이상, 10 배 이상, 11 배 이상, 12 배 이상, 13 배 이상, 14 배 이상, 15 배 이상, 16 배 이상, 17 배 이상, 18 배 이상, 19 배 이상 또는 20 배 이상인 경우 미백성분의 안전성이 확보된 것으로 판단 할 수 있다.

[114] 또한, 이와 같은 현상은 시료 종류에 따라서 멜라닌 생성 억제 효능이 멜라닌 세포 사멸을 동시 수반할 수도 있다는 문제점을 제기한다. 이는 화장품 소재 개발에 있어서 효능 이상으로 안전성을 확보해야 한다는 점에서 중요한 인자이다.

[115]

[116] 실험예 3: HEMn-MP 세포에서 각 미백성분별 세포 UVB 조사 유무에 따른 독성 농도 변화(미백성분에 대한 민감도 증가폭) 비교

[117] UVB 조사에 따른 미백성분별 세포 독성에 미치는 영향을 확인하고자, UVB 조사 없이 각 소재만 처리한 그룹과 UVB 20mJ/cm<sup>3</sup>을 조사한 후, 각 소재를 처리한 그룹으로 나누어 7일 후 상호 세포독성을 비교하였다(도 5). 이는 UVB 자극에 의해 민감해진 세포에 다양한 미백 소재를 처리 하였을 때 어떤 반응성을 나타내는지 확인하고자 하였다. 세포에 UVB를 조사 한 후 소재 처리된 세포에서 증가된 세포독성을 산출하고, UVB 단독에 의해 나타난 세포독성 비율을 뺀 값으로 보정 후 평균 내어 표기하였다 (표 7).

[118] [표7]

|    |          |       |      |      |     |
|----|----------|-------|------|------|-----|
| RD | 농도(mM)   | 1.25  | 2.5  | 5    | 평균  |
|    | 세포 독성 비율 | 24%   | 27%  | 15%  | 22% |
| RK | 농도(mM)   | 0.625 | 1.25 | 2.5  | 평균  |
|    | 세포 독성 비율 | 19%   | 8%   | 26%  | 18% |
| RC | 농도(uM)   | 31.25 | 62.5 | 125  | 평균  |
|    | 세포 독성 비율 | 0%    | 0%   | 0%   | 0%  |
| AP | 농도(uM)   | 0.39  | 0.78 | 1.56 | 평균  |
|    | 세포 독성 비율 | 2%    | 14%  | 0%   | 5%  |

[119] 표 7은 각 소재별 UVB 조사 유무 후 7일 후 세포 독성 변화율을 측정한 값으로, 각 소재별로 대표농도 (3 points)에서 UVB 자극 없는 세포 대비 UVB 자극을 받은 세포에서의 독성 비율 (%)을 나타내었다. 단, 상기 값은 Control 군에서 나타난 UVB 에 의한 세포 독성 비율(15~20%)을 보정한 수치이다.

[120] 자외선(UVB)를 멜라닌 세포에 조사한 뒤 각각의 소재를 처리하였을 경우, 시험 농도에서 RD와 RK는 평균 20%내외의 세포 독성이 증가한 반면 RC와 AP는 5% 미만으로 유의할 만한 세포독성 증가는 보이지 않았다. 이는 자외선에 노출되어 이미 민감해진 멜라닌 세포의 경우 RD와 RK에 반응 시 독성이 더욱 심화됨을 알 수 있다. 이러한 현상 역시 RC와 AP에서는 나타나지 않는 것으로,

이는 백반증을 유발하는 소재의 좁은 Safety Margin 으로 나타날 수 있는 특징 중 하나일 것으로 사료된다. 따라서, 상기 비율이 평균 15% 미만, 평균 14% 미만, 평균 13% 미만, 평균 12% 미만, 평균 11% 미만, 평균 10% 미만, 평균 9% 미만, 평균 8% 미만 또는 평균 7% 미만인 경우 미백성분의 안전성이 확보된 것으로 판단할 수 있다.

[121]

[122] 이상의 결과를 종합해 볼 때 RD, RK, MB는 멜라닌 세포와의 반응 시간이 증가할수록, 세포가 자외선(UVB)에 노출이 되어 민감할 수록 세포독성을 심화시킨다는 것을 알 수 있다. 이는 Rhododenol 함량 화장품 사용 고객들 중 백반증 부작용을 나타낸 사람들이 오랜 기간 동안 제품을 사용해 왔으며 특히 자외선이 노출된 부위에서 부작용이 심했다는 결과와 일치한다.

[123]

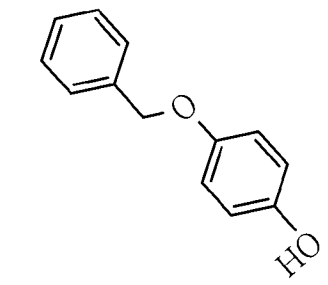
따라서, 본 발명의 일측면인 상기 실험예 1 내지 3에 의해 미백성분을 측정할 경우 장시간 사용에 따른 미백성분의 부작용을 예측가능하며, 미백효능 농도와 세포 독성유발 농도간의 상관관계를 간편하게 규명할 수 있으며, 자외선 유무에 따른 부작용 증가폭을 효과적으로 예측하는 효과가 있어 미백성분의 부작용을 측정하는 방법으로서 적합하다.

## 청구범위

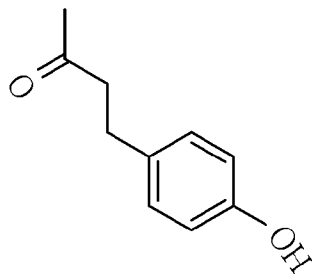
- [청구항 1] 미백성분의 부작용을 예측하는 방법으로서,  
상기 방법은, 하기 중 하나 이상을 측정하는 것을 포함하는 방법:  
i) 미백성분의 장시간 사용에 따른 독성 증가폭;  
ii) 미백효능농도와 세포독성농도의 차이; 및  
iii) 자외선 전처리에 따른 미백성분에 대한 민감도 증가폭.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,  
상기 i)의 독성 증가폭은,  
멜라닌 세포에 미백성분을 처리 후 3 내지 36시간이 되는 시점에 측정된 제 1 세포독성에 대한, 48 시간 이상이 되는 시점에 측정된 제 2 세포독성의 비율인 미백성분의 부작용을 예측하는 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,  
상기 ii)의 미백효능농도와 세포독성농도의 차이는,  
멜라닌 세포의 멜라닌 생성을 유효하게 억제하는 미백성분의 멜라닌 생성 억제 효능 농도에 대한, 멜라닌 세포의 독성을 야기하는 미백성분의 세포독성 농도의 상관배수인 미백성분의 부작용을 예측하는 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,  
상기 iii)의 민감도 증가폭은,  
자외선이 조사되지 않은 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 한 대조군의 세포독성에 대한, 자외선이 조사된 멜라닌 세포에 미백성분을 처리 한 실험군의 세포독성의 비율인 미백성분의 부작용을 예측하는 방법.
- [청구항 5] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 측정은 미백성분을 처리하지 않은 대조군 대비 미백성분을 처리한 세포의 흡광도로 표시되는 세포 생존률(%)측정을 포함하는 미백성분의 부작용을 예측하는 방법.
- [청구항 6] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 측정은 미백성분을 처리하지 않은 대조군 대비 세포의 20%가 사멸하는 농도인  $CC_{20}$ (20% Cytotoxicity Concentration)을 측정하는 것을 포함하는 미백성분의 부작용을 예측하는 방법.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 측정은 미백성분을 처리하지 않은 대조군 대비 세포의 절반이 사멸하는 농도인  $CC_{50}$ (50% Cytotoxicity Concentration)을 측정하는 것을 포함하는 미백성분의 부작용을 예측하는 방법.
- [청구항 8] 제 3항에 있어서,  
상기 멜라닌 세포의 멜라닌 생성억제효능 농도는 미백성분을 처리하지 않은 대조군 대비 멜라닌 생성을 50% 억제하는 효능농도인  $EC_{50}$ (50% Inhibitory Concentration of Melanin synthesis)인 미백성분의 부작용을

- 예측하는 방법.
- [청구항 9] 제 4항에 있어서,  
상기 자외선은 0.1 내지 500mJ/cm<sup>3</sup>의 양으로 조사되는 것을 특징으로  
하는 미백성분의 부작용을 예측하는 방법.
- [청구항 10] 제 2항에 있어서,  
상기 i)의 제 1 세포독성 대비 제 2 세포독성의 비율이 3배 이상인 경우  
미백성분의 부작용 있는 것으로 판단하는 판단단계를 더 포함하는  
미백성분의 부작용을 예측하는 방법.
- [청구항 11] 제 3항에 있어서,  
상기 ii)의 상관배수가 10배 이상인 경우 미백성분의 안전성이 확보된  
것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 미백성분의 부작용을 예측하는  
방법.
- [청구항 12] 제 4항에 있어서,  
상기 iii)의 비율이 평균 15%미만인 경우 미백성분의 안전성이 확보된  
것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 미백성분의 부작용을 예측하는  
방법.

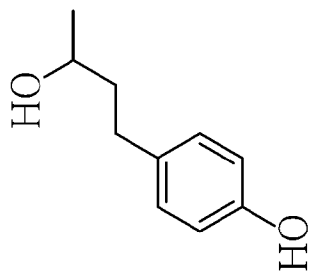
[도1]



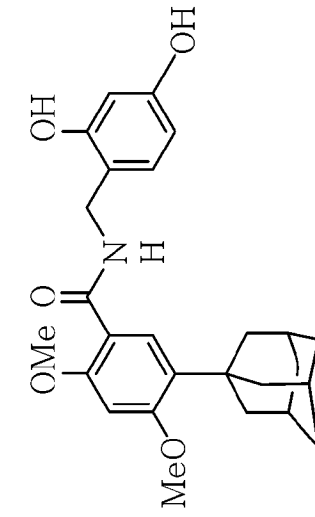
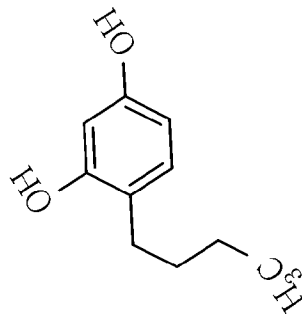
Monobenzene (MB)



Raspberry Ketone (RK)

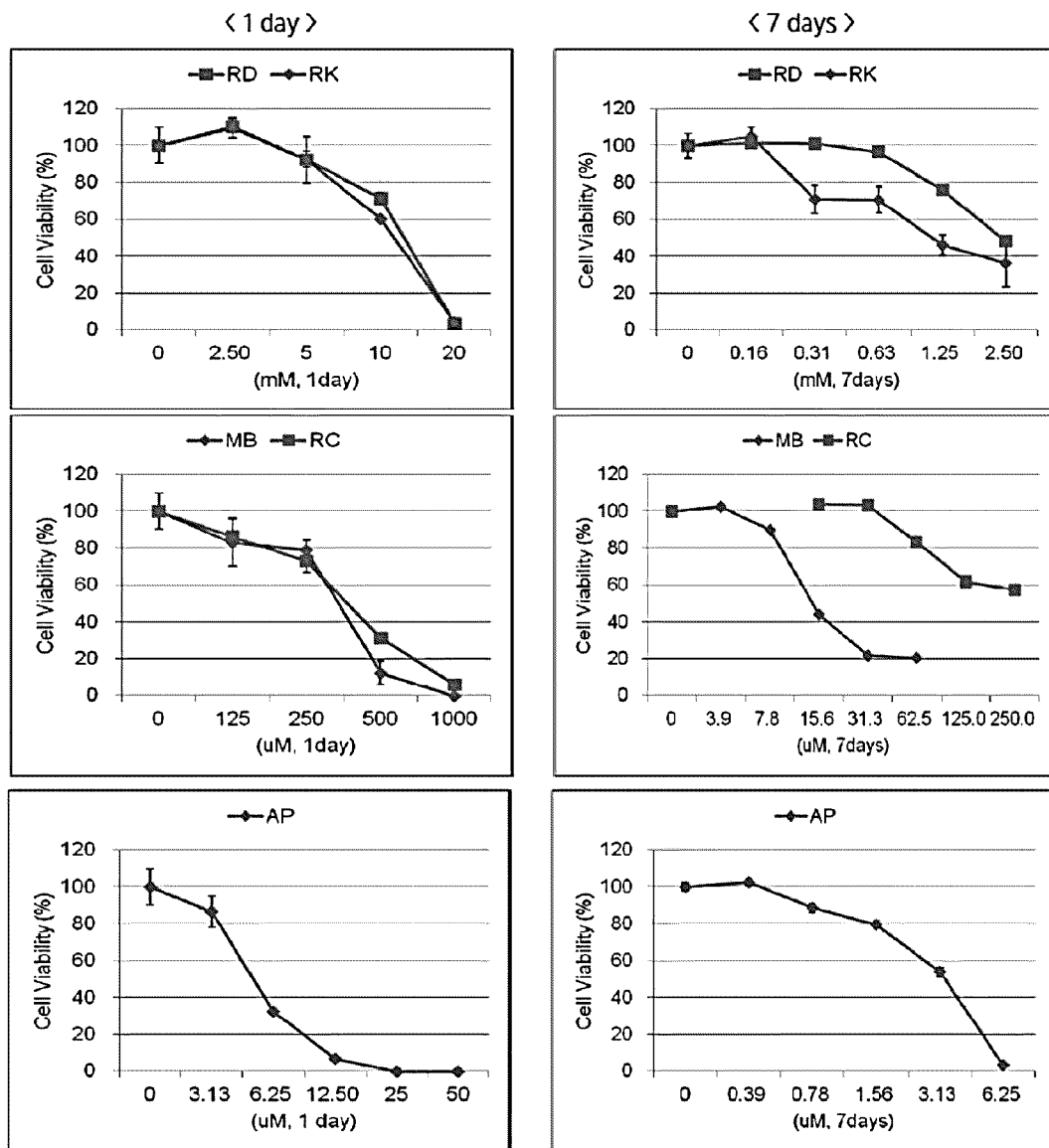


Rhododendrol (RD)

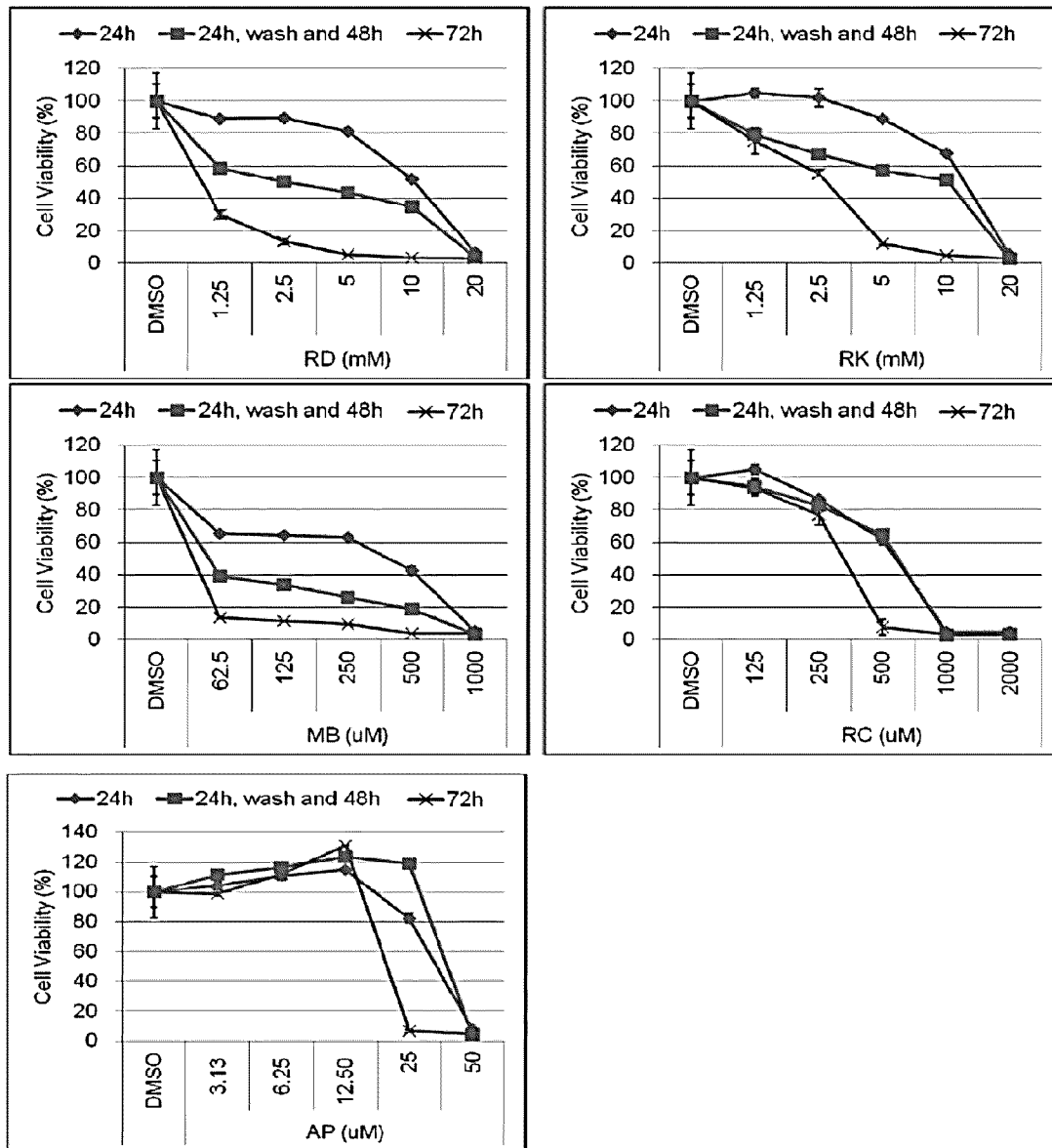
5-adamantane-1-yl-N-(2,4-dihydroxybenzyl)-  
2,4-dimethoxybenzoic acid amide (AP)

Rucinol (RC)

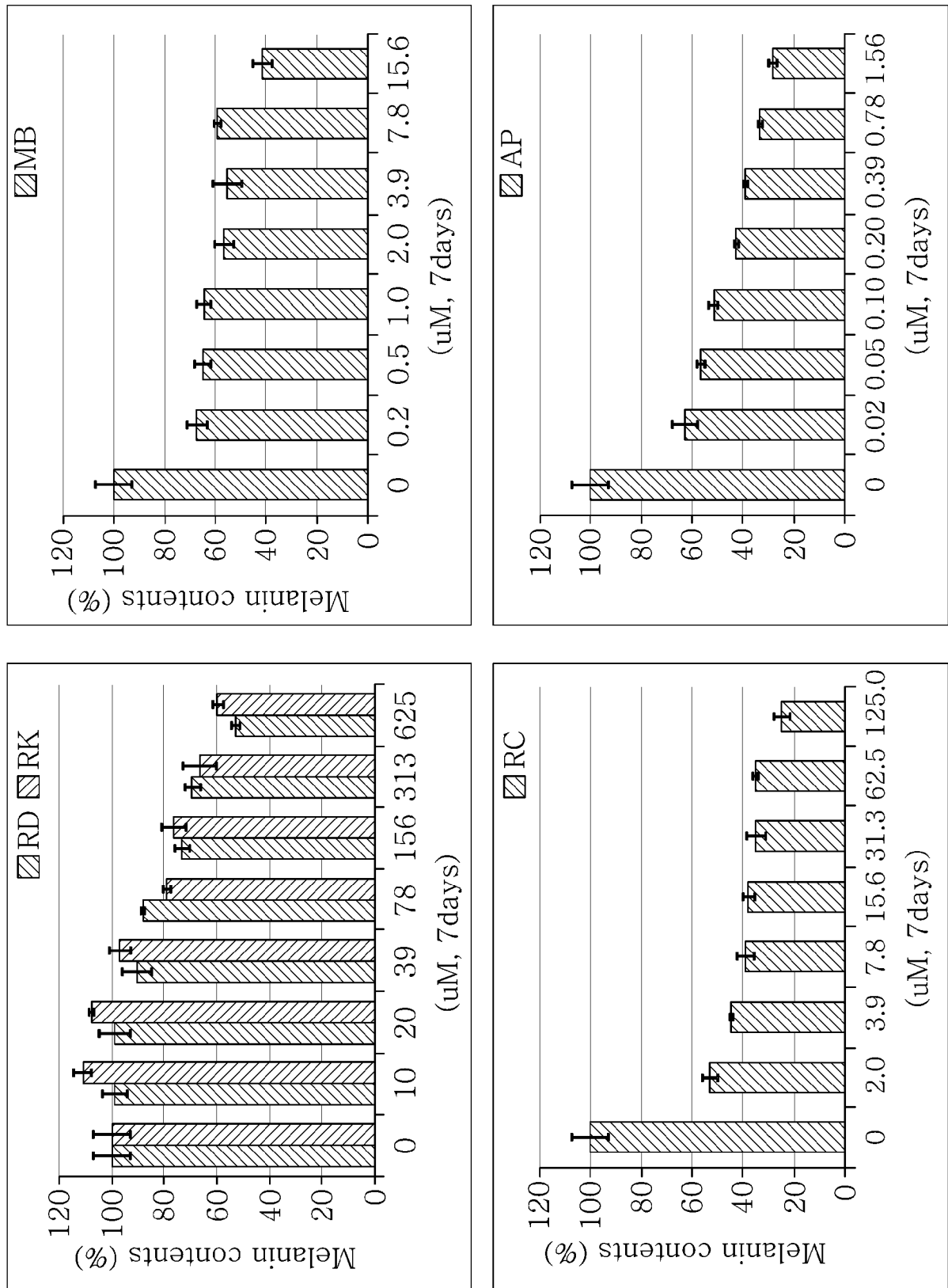
[도2]



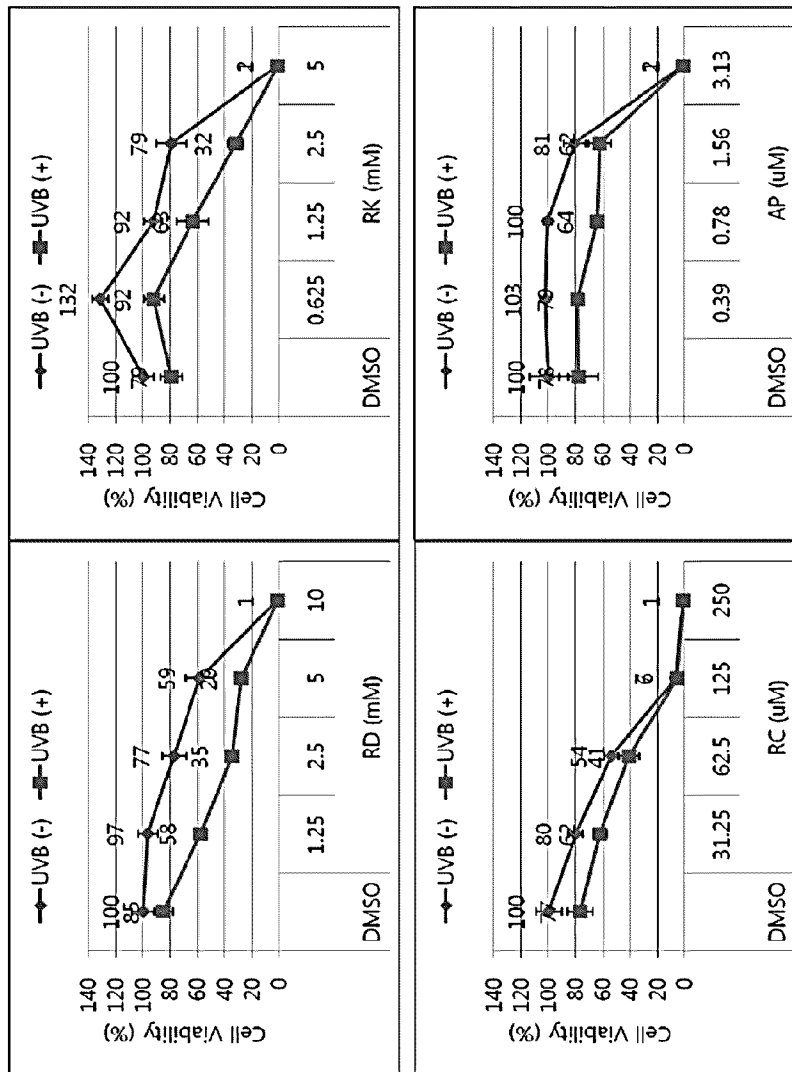
[도3]



[도4]



[도5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/001915

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*G01N 33/50(2006.01);*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/50; C12Q 1/18; A61K 8/49; G01N 21/31; A61Q 19/02; A61K 8/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: whitening component side-effect prediction, cytotoxicity, effect concentration, ultraviolet rays preprocessing, melanocyte

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | PARK, Yumi et al., "Effects of Kojic Acid, Arbutin and Vitamin C on Cell Viability and Melanin Synthesis in B16BL6 Cells", Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 2003, vol. 29, no. 1, pages 151-167<br>See page 155, lines 1-19; page 156, line 14-page 157, line 24;<br>page 159, line 11-page 160, line 9; page 162, lines 10-13; figures 2-3. | 1-12                  |
| A         | KR 10-2002-0073624 A (KOREA CHUNGANG EDUCATIONAL FOUNDATION)<br>28 September 2002<br>See examples 3-4; figures 3-4.                                                                                                                                                                                                                                                 | 1-12                  |
| A         | CN 101532950 A (CHENG, Shujun) 16 September 2009<br>See abstract; page 12, line 13-page 14, line 13.                                                                                                                                                                                                                                                                | 1-12                  |
| A         | HEO, Soo - Jin et al., "Inhibitory Effect of Diphlorethohydroxycarmalol on Melanogenesis and its Protective Effect against UV-B Radiation-induced Cell Damage", Food and Chemical Toxicology, 2010, vol. 48, no. 5, pages 1355-1361<br>See abstract; page 1358, left column, line 7-page 1359, left column, line 15; figures 3, 6.                                  | 1-12                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 JUNE 2016 (10.06.2016)

Date of mailing of the international search report

10 JUNE 2016 (10.06.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/001915

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                       |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
| A                                                     | KR 10-2011-0018091 A (KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE) 23 February 2011<br>See paragraphs [0034]-[0040], [0050]-[0058].                                                                                                                                                                                                                 | 1-12                  |
| A                                                     | LAHS, Ahmad Firdaus B. et al., "Depigmenting Effect of Kojic Acid Esters in Hyperpigmented B16F1 Melanoma Cells", Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, vol. 2012, Article ID 952452, pages 1-9<br>See abstract; page 2, right column, line 44-page 3, left column, line 18; page 5, left column, lines 22-49; figures 2-3. | 1-12                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/001915

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| KR 10-2002-0073624 A                      | 28/09/2002          | KR 10-0379191 B1        | 07/04/2003          |
| CN 101532950 A                            | 16/09/2009          | CN 101532950 B          | 07/09/2011          |
| KR 10-2011-0018091 A                      | 23/02/2011          | KR 10-1131574 B1        | 30/03/2012          |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

G01N 33/50(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/50; C12Q 1/18; A61K 8/49; G01N 21/31; A61Q 19/02; A61K 8/36

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미백성분 부작용 예측, 세포독성, 효능농도, 자외선 전처리, 멜라닌 세포

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 관련 청구항 |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A     | PARK, YUMI 등, 'Effects of Kojic acid, Arbutin and Vitamin C on cell viability and melanin synthesis in B16BL6 cells', Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 2003, 29권, 1호, 151-167 페이지<br>페이지 155, 라인 1-19; 페이지 156, 라인 14 - 페이지 157, 라인 24; 페이지 159, 라인 11 - 페이지 160, 라인 9; 페이지 162, 라인 10-13; 도면 2-3 참조. | 1-12   |
| A     | KR 10-2002-0073624 A (학교법인고려중앙학원) 2002.09.28<br>실시에 3-4; 도면 3-4 참조.                                                                                                                                                                                                                                                          | 1-12   |
| A     | CN 101532950 A (CHENG, SHUJUN) 2009.09.16<br>요약; 페이지 12, 라인 13 - 페이지 14, 라인 13 참조.                                                                                                                                                                                                                                           | 1-12   |
| A     | HEO, SOO-JIN 등, 'Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage', Food and Chemical Toxicology, 2010, 48권, 5호, 1355-1361 페이지<br>요약; 페이지 1358, 좌측컬럼, 라인 7 - 페이지 1359, 좌측컬럼, 라인 15; 도면 3, 6 참조.                                         | 1-12   |

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 06월 10일 (10.06.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 06월 10일 (10.06.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



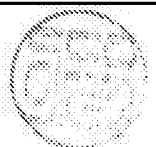
대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이동욱

전화번호 +82-42-481-8163



| C(계속). 관련 문헌 |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |        |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 카테고리*        | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                                                                  | 관련 청구항 |
| A            | KR 10-2011-0018091 A (한국식품연구원) 2011.02.23<br>단락 [0034]-[0040], [0050]-[0058] 참조.                                                                                                                                                                                                            | 1-12   |
| A            | LAJIS, AHMAD FIRDAUS B. 등, 'Depigmenting effect of Kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells' ,<br>Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 2012권,<br>Article ID 952452, 1-9 페이지<br>요약; 페이지 2, 우측컬럼, 라인 44 - 페이지 3, 좌측컬럼, 라인 18;<br>페이지 5, 좌측컬럼, 라인 22-49; 도면 2-3 참조. | 1-12   |

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

|                      |            |                  |            |
|----------------------|------------|------------------|------------|
| KR 10-2002-0073624 A | 2002/09/28 | KR 10-0379191 B1 | 2003/04/07 |
| CN 101532950 A       | 2009/09/16 | CN 101532950 B   | 2011/09/07 |
| KR 10-2011-0018091 A | 2011/02/23 | KR 10-1131574 B1 | 2012/03/30 |