



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월23일

(11) 등록번호 10-1579691

(24) 등록일자 2015년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 31/08 (2006.01) **A01N 31/16** (2006.01)

A01P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0130344

(22) 출원일자 2014년09월29일

심사청구일자 2014년09월29일

(56) 선행기술조사문헌

EP0635208 B1

US5464625 A

KR1020140093052 A

US5672352 A

(73) 특허권자

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

이삼빈

대구 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 상서무지개타운)

이진호

대구 달서구 호산로 126, 118동 1803호 (호산동, 삼성한국형아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

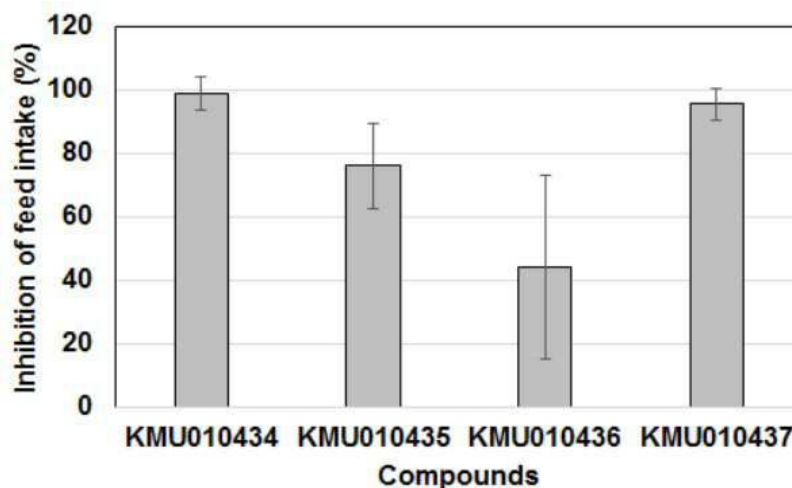
심사관 : 이선화

(54) 발명의 명칭 4-메톡시벤조산 유도체를 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물

(57) 요약

본 발명은 4-메톡시벤조산 유도체를 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물로서, 상세하게는 에스터화 반응 즉, 4-메톡시벤조산 또는 4-메톡시아크릴산과 염화싸이오닐을 이용하여 산-촉매 조건에서 상응하는 알코올과 반응시켜 합성한 4-메톡시벤조산 유도체를 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물에 관한 것이다. 상기 4-메톡시벤조산 유도체들을 사용하여 사료 기피 실험, 피부 안정성 평가를 위한 안점막자극시험 및 인공피부모델을 이용한 일차자극시험을 수행한 결과, 무독성 및 비자극성이었으며, 설치류에 대해 우수한 기피효과를 나타냈다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

김배환

대구 수성구 청수로 213, 1116동 503호 (황금동, 캐슬골드파크1단지)

이은지

대구 달서구 장기로 127, 305동 1603호 (성당동, 성당래미안e-편한세상3단지아파트)

임종순

경북 의성군 봉양면 도원길 2

임지연

대구 달서구 달서대로 719, 110동 103호 (신당동, 신당한화꿈에그린아파트)

박중성

대구 달서구 호산동로36남길 13

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 05-001

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역혁신인력양성사업

연구과제명 유해 생물 기피용 친환경 바이오 신소재 개발 및 상품화

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2011.04.01 ~ 2014.03.31

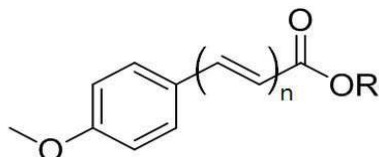
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, R은 C1 내지 C4의 직쇄 또는 분지쇄 알킬이며, n은 0 내지 2의 정수임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 팔각회향 추출물, 계피 추출물 및 이들의 혼합추출물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류 기피용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추출물은 초임계 추출물인 것을 특징으로 하는 설치류 기피용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화합물은 4-메톡시벤조산 메틸 에스터(4-Methoxybenzoic acid methyl ester), 4-메톡시벤조산 에틸 에스터(4-Methoxybenzoic acid ethyl ester), 4-메톡시벤조산 프로필 에스터(4-Methoxybenzoic acid propyl ester), 4-메톡시벤조산 아이소프로필 에스터(4-Methoxybenzoic acid isopropyl ester), 3-(4-메톡시페닐)아크릴산 메틸 에스터(3-(4-Methoxyphenyl)acrylic acid methyl ester), 3-(4-메톡시페닐)아크릴산 에틸 에스터(3-(4-Methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 설치류 기피용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류는 쥐인 것을 특징으로 하는 설치류 기피용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 에스터화 반응 즉, 4-메톡시벤조산 또는 4-메톡시아크릴산과 염화싸이오닐을 이용하여 산-촉매 조건에서 상응하는 알코올과 반응시켜 합성한 4-메톡시벤조산 유도체를 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

쥐는 인류의 발달과 더불어 생활 구조 및 환경의 변화에 적절히 진화하여 전세계적으로 가장 성공적으로 번식하고 있는 포유류이다. 설치류는 지구상의 포유류의 40%를 차지하고 한국에는 14속 18종이 알려져 있으며, 주로 민가에 출몰하는 종은 7속 9종이다.

[0003]

우리나라에 서식하는 설치목 (Order Rodentia)에는 쥐과(Family Muridae), 다람쥐과(Family Sciuridae), 비단털쥐과(Family Cricetidae), 뛰는쥐과(Family Dipodidae)가 알려져 있다. 야생들쥐의 생태학적 특성을 보면 등

줄쥐(*Apodemus agrarius*)는 국내 야생쥐들의 최우점종으로 쥐과의 붉은쥐속(genus *Adodemus*)에 속하며 등에 검은 줄이 있는 것이 특징이고 동북아시아에 분포하고 있다. 점유율은 약 74%를 차지하며 농경지나 야산에 서식하고 있다. 대륙밭쥐(*Myodes regulus*)는 대륙밭쥐속(genus *Eothenomys*)에 속하며 해발 300 미터 이상의 높은 산의 산 밑, 산중턱, 계곡, 작은 돌이 많이 쌓여 있는 미경작지 등에 서식한다.

[0004] 이렇듯 다양하고 광범위하게 서식하는 수많은 쥐가 번식하고 있으며, 이러한 폭발적인 개체수의 증가로 인해 심각한 문제들이 발생하고 있다. 엄청난 곡식의 손실과 인간생활의 수많은 재원에 막대한 피해를 끼친다. 뿐만 아니라 세계적으로 흑사병(plague), 살모넬라증(salmonellosis)을 비롯한 수많은 사상자를 발생시킨 질병 매개체로서 특히 국내에서 신증출혈열(Korean haemorrhagic fever)과 쯔쯔가무시(tustusgamushi disease) 등이 발생하고 있다.

[0005] 쥐를 방제하기 위해 다양한 살서제들이 개발되고 있다. 살서제 초기에는 백합과 식물 red squil(*Urginea maritima*, *U. burkei*) 분말 사용을 필두로 황린, 아비산, 황산타리움, 인화아연(zinc phosphide) 등의 무기화합물 살서제가 개발되었고, 근래에는 유기 화학적 합성기법의 발달과 더불어 소디엄모노플루오로아세테이트(sodium monofluoroacetate), 와라핀(warfarin), Brodifacoum, Thiosemicarbazide 등의 살서제가 개발되어 사용되어 왔다. 그러나, 이러한 유기합성 살서제인 화학 살서제는 계속적인 사용으로 인한 저항성 유발, 2차 독성, 잔류성 등의 독성으로 인한 인축의 피해, 환경오염을 야기시켜 사용상의 많은 문제점을 수반한다. 따라서 최근에는 이러한 문제점을 보완할 수 있는 안전한 살서제 및 기피제의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2014-0093052호(2014.07.25 공개)

발명의 내용

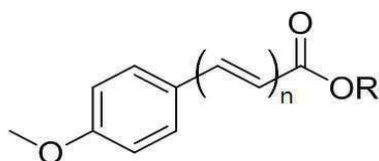
해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 4-메톡시벤조산 유도체를 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물을 제공한다.

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 상기 화학식 1에서, R은 C1 내지 C4의 직쇄 또는 분지쇄 알킬이며, n은 0 내지 2의 정수임.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 4-메톡시벤조산 유도체를 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물로서, 상세하게는 에스테르화 반응 즉, 4-메톡시벤조산 또는 4-메톡시아크릴산과 염화싸이오닐을 이용하여 산-촉매 조건에서 반응하는 알코올과 반응시켜 합성한 4-메톡시벤조산 유도체를 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물에 관한 것이다. 상기 4-메톡시벤조산 유도체들을 사용하여 사료 기피 실험, 피부 안정성 평가를 위한 안점막자극시험 및 인공피부모델을 이용한 일차자극시험을 수행한 결과, 무독성 및 비자극성이었으며, 설치류에 대해 우수한 기피효과를 나타냈다.

도면의 간단한 설명

[0013]

도 1은 사료 기피 실험을 위한 사료 및 케이지를 나타낸다.

도 2는 피부 안정성 평가를 위한 안점막자극시험에 사용된 인공각막조직을 나타낸다.

도 3은 피부 안정성 평가를 위한 안점막자극시험 과정을 나타낸다.

도 4는 피부 안정성 평가를 위한 인공피부모델을 이용한 일차자극시험에 사용된 인공피부조직을 나타낸다.

도 5는 피부 안정성 평가를 위한 인공피부모델을 이용한 일차자극시험 과정을 나타낸다.

도 6은 KMU010434, KMU010435, KMU010436, KMU010437 합성물의 설치류에 대한 기피효과를 확인한 결과이다.

도 7은 트랜스-아네톨(Trans-anethole)과 합성물의 설치류 기피활성을 측정한 결과이다.

도 8은 낮은 농도의 합성물에 대한 설치류 기피활성 측정 결과이다.

도 9는 팔각회향 초임계 추출물과 KMU010434의 시너지 효과에 대한 기피효과를 확인한 결과이다.

도 10은 KMU010444와 KMU010445 합성물의 설치류에 대한 기피활성을 확인한 결과이다.

도 11은 초임계 추출물과 합성물의 시너지 효과에 대한 기피효과를 확인한 결과이다.

도 12는 팔각회향 및 계피 초임계 추출물의 기피활성을 평가한 결과이다.

도 13은 팔각회향 및 계피 초임계 추출물과 합성물의 시너지효과에 대한 기피활성 평가 결과이다.

도 14는 마우스의 체중 변화를 나타낸다. 수컷은 5마리 마우스의 평균 $\pm$ SD로 나타났다. 시험 화합물은 ICR 마우스의 등에 14일 동안 국소적으로 적용하였다. 437 M : KMU010437 수컷, 437 F : KMU010437 암컷, 434 M : KMU010434 수컷, 434 F : KMU010434 암컷, Corn oil M : Corn oil 수컷, Corn oil F : Corn oil 암컷.

도 15는 시험 화합물에 대한 안점막자극시험 평가 결과를 나타낸다.

도 16은 시험 화합물에 대한 인공피부모델을 이용한 일차자극시험 평가 결과를 나타낸다.

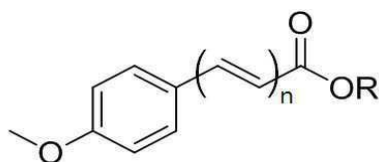
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 설치류 기피용 조성물을 제공한다.

[0015]

[화학식 1]



[0016]

[0017]

상기 화학식 1에서, R은 C1 내지 C4의 직쇄 또는 분지쇄 알킬이며, n은 0 내지 2의 정수임.

[0018]

상세하게는, 상기 조성물은 팔각회향 추출물, 계피 추출물 및 이들의 혼합추출물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 더 포함할 수 있다.

[0019]

상세하게는, 상기 추출물은 초임계 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020]

본 명세서에서 용어 "초임계 추출"은 임계온도 및 경계압력을 초과하는 상태의 유체인 초임계유체를 사용하여 추출하는 방법을 의미한다. 기체는 임계온도이하에서는 어떤 압력을 초과하면 액화되지만 임계온도 이상에서는 저압에서 고압까지 연속한 상(相)상태를 나타내고 기체와 액체의 성질을 구별할 수 없게 된다. 따라서, 초임계 유체는 높은 밀도가 있으면서 낮은 점성과 액체의 백 배가량이나 큰 확산능력이 있기 때문에 초임계유체를 이용한 초임계 추출법은 액체추출법에 비교하면 효율이 높은 추출법이다.

[0021] 바람직하게는, 상기 화합물은 4-메톡시벤조산 메틸 에스터(4-Methoxybenzoic acid methyl ester), 4-메톡시벤조산 에틸 에스터(4-Methoxybenzoic acid ethyl ester), 4-메톡시벤조산 프로필 에스터(4-Methoxybenzoic acid propyl ester), 4-메톡시벤조산 아이소프로필 에스터(4-Methoxybenzoic acid isopropyl ester), 3-(4-메톡시페닐)아크릴산 메틸 에스터(3-(4-Methoxyphenyl)acrylic acid methyl ester), 3-(4-메톡시페닐)아크릴산 에틸 에스터(3-(4-Methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 기피 대상 동물인 설치류는 쥐, 다람쥐, 등줄쥐, 또는 대륙발쥐일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0024] < 실험예 >

[0025] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0026] 1. 실험동물

[0027] 본 발명에 사용된 동물은 180 ± 10 g의 SD(Sprague-Dawley)계 랫드(rat)으로 4주령 수컷을 ㈜ 오리엔트(Orient Co., Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 사육실의 환경은 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$, 명암주기 12시간으로 일정하게 유지하였고, 1주일간 랫드용 고형사료와 물을 충분히 공급하였다.

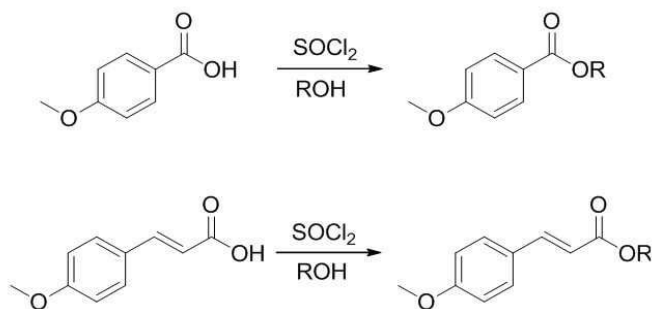
[0028] 2. 사료 기피 실험

[0029] 랫드에 대한 기피효과는 전선 침지법을 응용하여 사료에 오일을 도포하여 사용하였다. 합성물을 농도별로 식용유와 에틸아세테이트에 희석하여 사료를 4시간 동안 침지하여 사용하였다. 24시간 절식시킨 랫드에 각각 다른 합성물이 도말된 사료를 18-20 g씩 공급하고 24시간 후 감기 활성을 평가하였다(도 1). 대조구로는 희석에 사용된 식용유와 에틸아세테이트를 사용하였다. 케이지(cage)의 커버(cover)는 세 종류의 사료와 물을 동시에 공급할 수 있도록 제작하여 사용하였다. 랫드의 스트레스 및 오일향의 적응을 최소화하기 위해 암실에서 통풍이 원활하게 하여 실험을 진행하였으며, 실험 때마다 각각 다른 오일이 도말된 사료를 공급하였다. 사료 섭취 저해율은 24시간 후에 남은 사료 무게를 오일이 도말된 사료의 무게로 나누어 계산하였다. 사료 섭취 저해율(%) = $(24\text{시간 후 남은 사료 무게} / \text{오일 도말된 사료 무게}) \times 100$.

[0030] 3. 합성물 조제 방법

[0031] 화합물은 에스터화 반응 즉, 4-메톡시벤조산 혹은 4-메톡시아크릴산과 염화싸이오닐을 이용한 산-촉매 조건에서 상응하는 알코올과 반응시켜 합성하였다(반응 식 1).

[0032] < 반응식 1 >



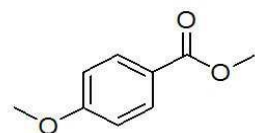
[0033]

[0034] (1) 4-메톡시벤조산 메틸 에스터(4-Methoxybenzoic acid methyl ester; KMU010434)

[0035] 메탄올(Methanol) 20 mL에 염화싸이오닐(thionylchloride) (0.14 mol, 10 mL)를 천천히 첨가한 후, 상온에서 30분 동안 교반하였다. 4-메톡시벤조산(4-Methoxybenzoic acid) (0.046 mol, 7.0 g)를 반응 용기에 첨가하고 10시간 동안 용매를 환류시키며 끓여 주었다. 용매를 감압 증류로 제거한 다음, 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 가하고 유기층을 포화 NaHCO₃ 수용액, 포화 NaCl 수용액, 증류수 순으로 순차적으로 씻어 주었다. 에틸 아세테이트(Ethyl acetate) 층을 무수 황산 마그네슘(MgSO₄)으로 처리하여 물을 제거하였다. 감압여과 하여 얻어진 용매를 감압증류로 제거하고 헥산(hexane):에틸 아세테이트(ethyl acetate) (12:1) 혼합 용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 4-메톡시벤조산 메틸 에스터(4-Methoxybenzoic acid methyl ester; 화학식 2) 7.6 g 을 99% 수율로 얻었다.

[0036] ¹H NMR (CDCl₃,400MHz): δ (ppm) 7.99 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (s, 3H). ¹³C(CDCl₃,100MHz): δ (ppm) 166.83, 163.33, 131.57, 122.60, 113.59, 55.37, 51.81.

[0037] < 화학식 2 >



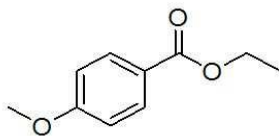
[0038]

[0039] (2) 4-메톡시벤조산 에틸 에스터(4-Methoxybenzoic acid ethyl ester; KMU010435)

[0040] 에탄올(Ethanol) 20 mL, 염화싸이오닐(thionylchloride) (0.099 mol, 7.2 mL), 4-메톡시벤조산(4-Methoxybenzoic acid) (0.033 mol, 5.0 g)를 사용하여 상기와 같은 방법으로 실험하였다. 헥산(hexane):에틸 아세테이트(ethyl acetate) (12:1) 혼합 용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 4-메톡시벤조산 에틸 에스터(4-Methoxybenzoic acid ethyl ester; 화학식 3) 5.7 g 을 97% 수율로 얻었다.

[0041] ¹H NMR (CDCl₃,400MHz): δ (ppm) 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.35 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 1.38 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ¹³C(CDCl₃,100MHz): δ (ppm) 166.35, 163.25, 131.51, 122.95, 113.53, 60.59, 55.36, 13.36.

[0042] < 화학식 3 >



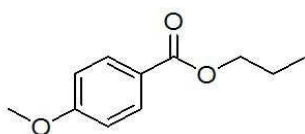
[0043]

[0044] (3) 4-메톡시벤조산 프로필 에스터(4-Methoxybenzoic acid propyl ester; KMU010436)

[0045] 프로판올(Propanol) 20 mL, 염화싸이오닐(thionylchloride) (0.16 mol, 12 mL), 4-메톡시벤조산(4-Methoxybenzoic acid) (0.033 mol, 5.0g)를 사용하여 상기과 같은 방법으로 실험하였다. 헥산(hexane):에틸 아세테이트(ethyl acetate) (12:1) 혼합 용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 4-메톡시벤조산 프로필 에스터(4-Methoxybenzoic acid propyl ester; 화학식 4) 6.2 g 을 97% 수율로 얻었다.

[0046] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm) 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 4.26 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 1.79 (sex, J = 7.1 Hz, 2H), 1.03 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz): δ (ppm) 166.42, 163.25, 131.51, 122.97, 113.54, 66.21, 55.37, 22.16, 10.52.

[0047] < 화학식 4 >



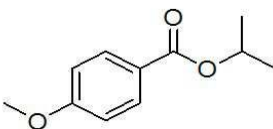
[0048]

[0049] (4) 4-메톡시벤조산 아이소프로필 에스터(4-Methoxybenzoic acid isopropyl ester; KMU010437)

[0050] 아이소프로판올(Isopropanol) 30 mL, 염화싸이오닐(thionylchloride) (0.16mol, 12mL), 4-메톡시벤조산(4-Methoxybenzoic acid)(0.033 mol, 5.0g)를 사용하여 상기과 같은 방법으로 실험하였다. 헥산(hexane):에틸 아세테이트(ethyl acetate) (12:1) 혼합 용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 4-메톡시벤조산 아이소프로필 에스터(4-Methoxybenzoic acid isopropyl ester; 화학식 5) 5.5 g 을 87% 수율로 얻었다.

[0051] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ (ppm) 7.99 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 5.22 (hep, J = 6.2 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 1.35 (d, J = 6.4 Hz, 6H). ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz): δ (ppm) 165.86, 163.17, 131.48, 123.37, 113.48, 67.91, 55.38, 21.99.

[0052] < 화학식 5 >



[0053]

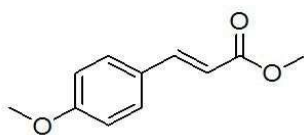
[0054] (5) 3-(4-메톡시페닐)아크릴산 메틸 에스터(3-(4-Methoxyphenyl)acrylic acid methyl ester; KMU010444)

[0055] 메탄올(Methanol) 10 mL, 염화싸이오닐(thionylchloride) (0.11 mol, 8.2 mL), 3-(4-methoxyphenyl)acrylic

acid(3-(4-메톡시페닐)아크릴산) (0.024 mol, 4.0 g)를 사용하여 상기와 같은 방법으로 실험하였다. 헥산(hexane):에틸 아세테이트(ethyl acetate) (9:1) 혼합 용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 3-(4-Methoxyphenyl)acrylic acid methyl ester(3-(4-메톡시페닐)아크릴산 메틸 에스터; 화학식 6) 4.1 g을 94% 수율로 얻었다.

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm) 7.67 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.81 (s, 3H). ¹³C(CDCl₃, 100MHz): δ (ppm) 167.80, 161.39, 144.55, 129.74, 127.11, 115.25, 114.32, 55.38, 51.61.

< 화학식 6 >

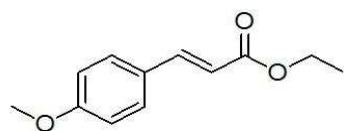


(6) 3-(4-메톡시페닐)아크릴산 에틸 에스터(3-(4-Methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester; KMU010445)

에탄올(Ethanol) 10 mL, 염화싸이오닐(thionylchloride) (0.098 mol, 7.1 mL), 3-(4-methoxyphenyl)acrylic acid(3-(4-메톡시페닐)아크릴산) (0.020 mol, 3.5g)를 사용하여 상기와 같은 방법으로 실험하였다. 헥산(hexane):에틸 아세테이트(ethyl acetate) (9:1) 혼합 용매를 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 3-(4-Methoxyphenyl)acrylic acid ethyl ester(3-(4-메톡시페닐)아크릴산 에틸 에스터; 화학식 7) 3.9 g을 96% 수율로 얻었다.

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm) 7.63 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.30 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C(CDCl₃, 100MHz): δ (ppm) 167.26, 161.32, 144.21, 129.67, 127.13, 115.69, 114.28, 60.27, 55.28, 14.35.

< 화학식 7 >



4. 초임계 추출방법

초임계 추출에 사용한 장치는 waters AD-RC 08 (Waters CO., Milford, MA, USA)를 사용하였다. 분말화된 팔각 회향 또는 계피를 추출 용기에 300 g을 넣어 CO₂ 유속(flow rate) : 공용매(co-solvent) 유속을 47.5 g/min : 2.5 g/min으로 하여 전체 유속(total flow rate) (CO₂ 유속 + 공용매 유속)를 50 g/min의 속도로 흘려주었고, 공용매로는 HPLC급 에틸알코올(JT Baker Co., Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였다. 추출 온도로는 35, 압력은 150 bar의 조건하에서 30분씩 4회 반복하여 총 120분 추출하였다.

5. 피부 안정성 평가(단회 경구투여 독성 시험)

(1) 시험계

- 1) 종 및 계통 : ICR mouse
- 2) 공급원 : 오리엔트 바이오
- 3) 주령 : 7 주령으로 입수하여 8주령에 물질 투여
- 4) 사용 동물 수 : 30마리 (수컷: 15, 암컷: 15)
- 5) 검역 및 적응 : 일주일간 검역 및 적응기간을 가진 후 건강한 동물만을 실험에 사용하였다.

(2) 시험방법

- 1) 군 분리 : 동물을 검역, 적응기간 중의 체중을 기초로 하여 선별한 후 군 분리 당일의 체중을 기초로 하여 무작위법으로 각 군의 평균체중이 가능한 한 균등하도록 군을 구성하였다. 본 실험의 실험군 구성은 표 1과 같다. 군당 마리수는 각 5마리씩으로 할당하여 실험을 실시하였다.

표 1

Test compound	Groups	Sex	No. mice
corn oil (control)	con oil M	수컷(Male)	5
	con oil F	암컷(Female)	5
KMU010434	KMU010434 M	수컷(Male)	5
	KMU010434 F	암컷(Female)	5
KMU010437	KMU010437 M	수컷(Male)	5
	KMU010437 F	암컷(Female)	5

- 2) 개체식별 : 꼬리 표식법으로 하였으며, 케이지당 5마리씩 수용하였다.
- 3) 물질 투여 : 투여전일 절식(14-16시간 정도)한 후, 존테를 이용하여 시험물질을 투여 가능한 최대용량인 0.25g/10mL/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다.
- 4) 관찰 및 검사항목
 - 체중측정: 투여 직전, 투여 후 1 day, 2 day, 3 day, 7 day 및 부검 직전(14 day)에 측정하였다.
 - 임상증상 및 사망여부 관찰 : 투여당일은 투여 후 30 min, 1 hr, 2 hrs, 3 hrs, 4 hrs, 5 hrs, 6 hrs 까지는 매 시간 마다 관찰하고, 투여 다음날부터 1 day, 2 day, 3 day, 7 day, 14 day에 1회씩 관찰함을 원칙으로 하였다. 시험물질에 의한 일반상태의 변화, 중독증상 및 폐사여부를 관찰하였으며, 14 day에는 부검을 실시하여 이상소견이 있는 장기가 있을 경우 병리조직검사를 실시하였다.

6. 피부 안정성 평가(안점막 자극 시험)

(1) 인공각막모델

- 1) 공급원 : (주) MCTT
- 2) 모델명 : HCM
- 3) 구조 : 3개의 세포층인 superficial cell layers, wing cell layers, basal cell layers로 분화하여 있다.
- 4) 특이사항 : 조직의 표면적은 0.67cm²이며 24-well plate에 담긴 gel 표면에 고정되어 배송된다(도 2).

(2) 시험방법

- 1) 시약 : OECD Test guideline 437, OECD Test guideline 438, Seaman 등(2010)의 연구와 Jung 등(2011)의 연구에서 제시된 음성대조물질과 양성대조물질을 참조하여, 음성대조물질은 phosphate buffered

saline(PBS)(Sigma, USA)를 사용하였고 양성대조물질로는 1% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS, in PBS)(Sigma, USA)을 사용하였다.

2) 군 분리 : HCM으로 자극성과 비자극성 판정을 위해 사용된 물질은 표 2와 같다.

표 2

Test number	Groups	Chemical
1	NC	PBS
2	PC	1% SDS
3	T1	Corn oil
4	T2	KMU010437 2.5%
5	T3	KMU010437 1%
6	T4	KMU010434 1%
7	T5	KMU010434 2.5%
8	T6	KMU010445 1%

3) 음성대조물질의 흡광도 : 자극 평가 시험 과정에서 물질 적용 시 음성대조물질인 PBS를 적용하였으며, post-incubation이 끝난 HCM에 MTT assay를 실시하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조물질 PBS를 각 lot 당 3개 insert에 적용하였다.

4) 양성대조물질의 세포생존율 : 자극 평가 시험 과정에서 물질 적용 시 양성대조물질인 1% SDS를 적용하였으며, post-incubation이 끝난 HCM에 MTT assay를 실시하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조물질 1% SDS를 각 lot 당 3개 insert에 적용하였다. 음성대조물질의 세포생존율을 100%로 하고, 양성대조군의 흡광도를 기준으로 음성대조군의 흡광도를 백분율(%)로 나타내었다.

5) 자극 평가 시험 : (주) MCTT에서 제조된 HCM을 당일 배송 받아 세포의 안정화를 위해서 pre-incubation을 실시하였다. 각 well 당 0.9ml의 배지를 넣은 6-well plate에 HCM의 insert를 배치하고 37℃, 5% CO₂ 조건으로 22±2시간 pre-incubation시켰다. Pre-incubation이 끝난 HCM의 insert 내부에 직접 40μl의 시험물질을 천천히 떨어뜨린 다음 insert의 끝을 잡고 돌려주어 시험물질이 고르게 적용되도록 하였다. 물질 적용 시간은 10분으로 물질 적용 시간이 끝난 후 다음 단계인 시험물질의 washing을 수행하였다. HCM에 적용한 시험물질이 넘치도록 4ml의 PBS로 overflowing시켜 1분간 정제 후 PBS 10ml을 이용하여 insert 내부를 1회 세척하였다. 다음 12-well plate에 insert를 넣고 4ml의 PBS로 overflowing시켜 shaking 후 PBS 13ml을 이용하여 insert 내·외부를 1회 세척하였다. Washing 후, 피펫과 티슈, 면봉을 이용하여 insert 내·외부의 PBS를 제거한다. 각 well 당 0.9ml 배지를 분주한 6-well plate에 HCM의 insert를 넣고 37℃, 5% CO₂조건으로 16±1시간 post-incubation을 실시하였다(도 3).

6) MTT assay : MTT 용액은 사용 직전 용시조제를 원칙으로 하였다. 37℃로 유지시킨 phenol red-free DMEM에 0.3mg/ml로 조제한 MTT 용액을 24-well plate에 200μl씩 분주해 놓고 post-incubation이 끝난 HCM의 insert를 배치시킨 뒤 차광하여 37℃, 5% CO₂ 조건으로 3시간 배양하였다. 배양을 마친 뒤 PBS 2ml을 HCM insert 내부에 overflowing 시켜 내외부 이물질을 제거하고, 아이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)이 1.9ml/well 씩 넣어 놓은 6-well plate에 HCM insert을 옮긴 후, 아이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)을 100μl씩을 HCM insert 내부에 처리하였다. 6-well plate 차광하여 Shaker에 올려놓고 speed 68~70rpm에 맞춰 2시간 동안 shaking하여 포르마잔(formazan)을 추출하였다. 추출한 formazan 용액을 96-well plate에 250μl씩 2회 반복 분주하여 ELISA reader를 이용해 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7. 피부 안정성 평가(인공피부모델 KeraSkinTM 을 이용한 일차자극시험)

(1) 인공피부모델

1) 공급원 : (주) MCTT

- [0098] 2) 모델명 : KeraSkinTM
- [0099] 3) 구조 : 사람의 다층의 표피 구조와 유사한 기저층, 유극층, 과립층, 각질층의 잘 분화된 4개의 층을 명확하게 가진다.
- [0100] 4) 특이사항 : 조직의 표면적은 0.67cm^2 이며 24-well plate에 담긴 gel 표면에 고정되어 배송된다(도 4).

[0101] (2) 시험방법

- [0102] 1) 시약 : OECD Test guideline 439에서 제시된 음성대조물질과 양성대조물질을 참조하여, 음성대조물질은 phosphate buffered saline(PBS)(Sigma, USA)를 사용하였고 양성대조물질로는 5% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS, in PBS)(Sigma, USA)를 사용하였다.

- [0103] 2) 군 분리 : KeraSkinTM로 자극성과 비자극성 판정을 위해 사용된 물질은 표 3과 같다.

표 3

Test number	Groups	Chemical
1	NC	PBS
2	PC	5% SDS
3	T1	Corn oil
4	T2	KMU010437 2.5%
5	T3	KMU010437 1%
6	T4	KMU010434 1%
7	T5	KMU010434 2.5%
8	T6	KMU010445 1%

- [0105] 3) 음성대조물질의 흡광도 : 자극 평가 시험 과정에서 물질 적용 시 음성대조물질인 PBS를 적용하였으며, post-incubation이 끝난 KeraSkinTM에 MTT assay를 실시하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조물질 PBS를 각 lot 당 3개 insert에 적용하였다.

- [0106] 4) 양성대조물질의 세포생존율 : 자극 평가 시험 과정에서 물질 적용 시 양성대조물질인 5% SDS를 적용하였으며, post-incubation이 끝난 KeraSkinTM에 MTT assay를 실시하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조물질 5% SDS를 각 lot 당 3개 insert에 적용하였다. 음성대조물질의 세포생존율을 100%로 하고, 양성대조군의 흡광도를 기준으로 음성대조군의 흡광도를 백분율(%)로 나타내었다.

- [0107] 5) 자극 평가 시험 : (주) MCTT에서 제조된 KeraSkinTM을 당일 배송 받아 세포의 안정화를 위해서 pre-incubation을 실시하였다. 각 well 당 0.9ml의 배지를 넣은 6-well plate에 인공 각막 모델의 insert를 배치시킨 후 37℃, 5% CO₂ 조건으로 22±2시간 pre-incubation시켰다. Pre-incubation이 끝난 KeraSkinTM의 insert 내부에 직접 30 μl의 시험물질을 적용 후 nylon mesh를 이용해 도포를 돕는다. 시험물질이 적용된 다음 insert의 끝을 잡고 돌려주어 시험물질이 고르게 적용되도록 물질의 도포를 도와주었다. 물질 적용 시간은 45분으로 물질 적용 시간이 끝난 후 다음 단계인 시험물질의 washing을 수행하였다. PBS 10ml을 insert 내부에 overflowing 2회 시키면서 nylon mesh와 물질을 제거하고, 12-well plate에 insert를 넣고 PBS 4ml로 overflowing 시킨 상태에서 1 분간 정체시킨 후 PBS 10ml로 insert 안팎 세척을 2회 실시하였다. Washing 후, 피펫과 티슈, 면봉을 이용하여 insert 내·외부의 PBS를 제거하고, 각 well 당 0.9ml 배지를 분주한 6-well plate에 KeraSkinTM의 insert를 넣고 37℃, 5% CO₂조건으로 42±2시간 post-incubation을 실시하였다(도 5).

- [0108] 6) MTT assay : MTT 용액은 사용 직전 용시조제를 원칙으로 하였다. 37℃로 유지시킨 phenol red-free DMEM에 0.3mg/ml로 조제한 MTT 용액을 24-well plate에 200μl씩 분주해 놓고 post-incubation이 끝난 KeraSkinTM의

insert를 배치시킨 뒤 차광하여 37℃, 5% CO₂ 조건으로 3시간 배양하였다. 배양을 마친 뒤 PBS 2mℓ을 KeraSkin™ insert 내부에 overflowing 시켜 내외부 이물질을 제거하고, 아이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)이 1.9mℓ/well 씩 넣어 놓은 6-well plate에 KeraSkin™을 옮긴 후, 아이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)을 100μℓ씩을 KeraSkin™ 내부에 처리하였다. 6-well plate 차광하여 Shaker에 올려놓고 speed 68~70rpm에 맞춰 2시간동안 shaking하여 포르마잔(formazan)을 추출하였다. 추출한 포르마잔(formazan) 용액을 96-well plate에 250μℓ씩 2회 반복 분주하여 ELISA reader를 이용해 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0109]

<실시예 1> 설치류 기피활성 평가

[0110]

1. 합성물을 이용한 설치류 기피활성 평가

[0111]

4-메톡시벤조산(4-Methoxybenzoic acid; p-Anisic acid)를 합성하여 제조한 KMU010434, KMU010435, KMU010436, KMU010437 합성물의 설치류에 대한 기피효과를 확인하였다. 2.5%의 처리량에서 KMU010435는 76.29%의 기피율을 보였으며, KMU010436은 44.25%로 매우 낮게 나타났고, KMU010437은 95.9%로 높게 나타났다. 특히 KMU010434 합성물에서 99% 이상으로 가장 높은 기피율을 보였다(도 6).

[0112]

2. 트랜스-아네톨(Trans-anethole)과 합성물의 설치류 기피활성 평가

[0113]

다양한 합성물을 이용하여 기피활성을 평가한 결과에서 기피율이 매우 저조한 KMU010436을 제외하고, 트랜스-아네톨(trans-anethole)과 비교하여 합성물의 설치류에 대해 기피효과를 알아보았다. 1%의 처리량에서 KMU010434는 61.8%, KMU010435는 49.38%로 나타났고, KMU010437은 84.68%로 나타났다. 이는 트랜스-아네톨(trans-anethole)에서 94.72%의 기피율로 매우 높게 나타난 것에 비해 합성물의 기피율이 저조하였다(도 7).

[0114]

3. 합성물 저농도에 따른 설치류 기피활성 평가

[0115]

낮은 농도의 합성물로 설치류에 대한 기피효과를 확인하였다. 트랜스-아네톨(trans-anethole)과 비교하여 KMU010434, KMU010435의 기피활성을 평가한 결과, 0.1%의 처리량에서 트랜스-아네톨(trans-anethole)은 1.8%, KMU010434는 15.46%로 나타난 것에 비해, KMU010435는 48.85%로 조금 높게 나타났다. 0.5%의 처리량에서 KMU010434는 13.48%, KMU010435는 41.1%로 나타났고, 특히 트랜스-아네톨(trans-anethole)은 78.7%로 높게 나타났다(도 8).

[0116]

4. 팔각회향 초임계 추출물과 KMU010434의 시너지 효과에 대한 기피효과

[0117]

팔각회향 초임계 추출물 0.1%와 KMU010434 합성물 1%의 시너지 효과의 설치류에 대한 기피효과를 알아보았다. 팔각회향 초임계 추출물 0.1%에서는 14.09%의 기피효과를 보였고, KMU010434 합성물 1%에서는 82.01%의 기피효과를 보였다. 팔각회향 초임계 추출물과 KMU010434 합성물의 혼합물에서는 71.32%의 기피효과가 나타났다(도 9).

[0118]

5. 합성물의 기피활성 평가

[0119]

KMU010444와 KMU010445 합성물의 설치류에 대한 기피활성을 확인하였다. 합성물을 녹인 용매로 사용한 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 대조구로 사용하였다. 1% 처리량에서 대조구로 사용한 에틸 아세테이트(ethyl acetate)는 9.38%로 나타났고, 합성물 KMU010434는 42.73%, KMU010445는 65.98%의 기피효과가 나타났다(도 10).

[0120]

6. 초임계 추출물과 합성물의 시너지 효과에 대한 기피효과

[0121] 기피효과가 높은 KMU010445 합성물과 팔각회향 및 계피 초임계 추출물을 혼합하여 설치류에 대한 기피활성을 평가하였다. 합성물 KMU010445를 녹인 용매로 사용된 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 대조구로 사용하였다. 대조구로 사용된 에틸 아세테이트(ethyl acetate)는 8%의 기피율을 보였고, 팔각회향 초임계 추출물 1%와 KMU010445 합성물(SFESA+445)은 68.13%의 기피율이 나타났고, 계피 초임계 추출물 1%와 KMU010445 합성물(SFEC+445)에서는 87.71%의 기피율을 보였다(도 11).

[0122] 7. 팔각회향 및 계피 초임계 추출물의 기피활성 평가

[0123] 팔각회향(Star anise)과 계피 초임계 추출물(Cinnamon)을 비교하여 설치류에 대해 기피효과를 알아보았다. 팔각회향 초임계 추출물의 기피활성을 평가한 결과, 0.5% 처리량에서 64.33%, 1%에서는 67.53%, 2%에서는 69.29%의 기피효과가 나타났다. 계피 초임계 추출물에서는 0.5% 처리량에서 67.6%, 1%는 85.3%, 2%는 91.87%의 기피효과가 나타났다. 팔각회향과 계피 초임계 추출물 각각 농도의존적으로 기피율이 높게 나타났으며, 특히 계피 초임계 추출물 2% 처리량에서 가장 높게 나타났다(도 12).

[0124] 8. 팔각회향 및 계피 초임계 추출물과 합성물의 시너지효과에 대한 기피활성 평가

[0125] 팔각회향(SA) 및 계피 초임계 추출물(C)과 기피효과 테스트 시 기피율이 높게 나타난 합성물 KMU010434, KMU010437을 각각 농도 별로 합성하여 시너지 효과에 대한 기피활성을 평가하였다. 팔각회향 초임계 추출물 1%에 KMU010434를 혼합하였을 때, 80.77%의 기피율이 나타났고, KMU010437을 혼합하였을 때는 88%의 기피율이 나타났다. 계피 초임계 추출물 1%에 KMU010434를 혼합하였을 때, 78.44%의 기피율이 나타났고, KMU010437을 혼합하였을 때는 93.83%로 나타나 매우 높은 기피효과를 보였다. 팔각회향 및 계피 초임계 추출물을 0.5%씩 각각 첨가하여 혼합한 것은 64.98%로 나타났고, 1%씩 첨가하여 혼합한 것은 80.84%의 기피효과가 나타났다(도 13).

[0126] <실시예 2> 피부 안정성 평가(단회 경구투여 독성 시험)

[0127] (1) 체중

[0128] 체중 변동에 있어서 실험기간 동안 모든 군에서 경미한 증가를 보였으나 통계적으로 유의성은 보이지 않았다(도 14).

[0129] (2) 사망률 및 LD₅₀ 값

[0130] 실험물질을 경구투여 한 마우스를 14일 동안 관찰한 결과는 표 4와 같다. 본 발명에서 실험 최대 용량인 0.25g/10mL/kg를 투여하여도 모든 암수컷 ICR 마우스의 사망은 관찰되지 않았다. 따라서 본 발명에서 LD₅₀값은 암수컷 ICR 마우스 모두 0.25g/kg 이상으로 사료된다.

표 4

[0131]

Groups	Days after reatment							Final mortality
	0	1	2	3	4	7	14	
corn oil M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
corn oil F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010434 M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010434 F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010437 M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010437 F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

(3) 일반증상

실험물질을 투여한 단회경구급성독성 시험 결과 탈모, 설사, 다뇨, 활동력 및 부종등과 같은 일반 증상 소견 결과 암,수컷 ICR 마우스의 모든 투여군에서 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았다(표 5).

표 5

Groups	Days after reatment						
	Loss of fur	Diarrhea	Polyuria	Soft stool	Decreased motor activity	Tremor	Edema
corn oil M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
corn oil F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010434 M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010434 F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010437 M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010437 F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

(4) 부검소견

부검소견에서는 암,수컷 모든 투여군에서 실험물질 투여와 관련된 간, 비장 등과 같은 내부 장기의 육안적인 이상소견이 관찰되지 않았다(표 6).

표 6

Groups	Days after reatment					
	Liver	Heart	Spleen	Lung	Kidney	Stomach
corn oil M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
corn oil F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010434 M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010434 F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010437 M	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
KMU010437 F	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

(5) 고찰

실험물질의 단회 경구 독성시험을 ICR mouse 암수컷에 실험 최대 용량인 0.25g/10mL/kg으로 경구투여하고 14일간 사망률, 일반증상, 체중의 변화 및 부검소견을 관찰하여 독성증상 발현 여부를 관찰하였다. 본 시험에서 실험물질 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD₅₀ 값은 0.25g/kg을 훨씬 상회할 것으로 사료된다.

체중변화에 있어서 모든 실험군에서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으며, 외관 및 부검결과 내부 장기의 육안적 이상소견도 관찰되지 않았으며, 시험동물에서 사망례가 없어서 평균치사량 산출은 불가능하였다.

<실시에 3> 피부 안정성 평가(안점막 자극시험)

(1) 음성대조물질의 흡광도

음성대조군 흡광도 측정 결과는 표 7과 같다. 음성대조군의 흡광도는 HCM에 PBS를 처리하여 MTT assay 후 흡광도를 측정하였다. 실험실 내 음성대조군의 흡광도 품질관리 기준은 0.7 이상이다.

표 7

[0144]

	1run	2run	3run	Mean $\pm$ SD
광학 밀도	0.974	0.923	0.807	0.901 $\pm$ 0.085

[0145]

음성 대조군 광학 밀도의 정상 범위 수치는 0.7과 동일하거나 높다.

[0146]

(2) 양성대조물질의 세포생존율

[0147]

양성대조군의 세포생존율 측정 결과는 표 8과 같다. 양성대조군의 세포생존율은 1% SDS를 HCM에 처리하여 MTT assay 후 양성대조군의 흡광도를 음성대조군의 흡광도로 환산하여 구하였다. 실험실 내 양성대조물질의 세포생존율 품질관리 기준은 20% 이하이다.

표 8

[0148]

	1run	2run	3run	Mean $\pm$ SD
세포 생존율	11.9	17.8	14.9	14.86 $\pm$ 2.7

[0149]

양성 대조군 세포 생존율의 정상 범위 수치는 20%와 동일하거나 낮다.

[0150]

(3) 자극 평가 시험 결과

[0151]

HCM의 자극 평가 시험의 결과는 도 15 및 표 9와 같다. HCM에 음성대조물질인 PBS를 적용 후 MTT assay를 실시한 흡광도를 기준으로 백분율로 자극의 정도를 나타내어 50% 이상의 세포생존율을 보이면 비자극성, 50% 미만의 세포생존율을 보이면 자극성으로 판정한다. 모든 시험물질에서 50% 이상의 세포생존율을 보여 비자극성으로 판정되었다.

표 9

[0152]

세포 생존율 (%)	HCM									Mean	SD
	1run		Mean	2run		Mean	3run		Mean		
NC	109.67	107.13	108.4	102.75	102.17	102.5	89.37	88.91	89.1	100.00	8.9
PC	12.11	11.65	11.9	18.34	17.18	17.8	14.65	15.22	14.9	14.86	2.7
T1	101.94	99.87	100.9	88.91	90.52	89.7	95.14	94.10	94.6	95.08	5.1
T2	83.61	85.34	84.5	87.64	87.53	87.6	88.22	85.34	86.8	86.28	1.8
T3	82.34	80.72	81.5	85.34	84.76	85.0	79.45	80.15	79.8	82.13	2.5
T4	92.83	94.79	93.8	78.42	80.38	79.4	78.99	78.99	79.0	84.07	7.6
T5	87.07	85.68	86.4	76.69	80.38	78.5	81.88	81.99	81.9	82.28	3.7
T6	77.84	76.92	77.4	73.23	71.96	72.6	75.99	78.42	77.2	75.73	2.6

[0153]

(4) 고찰

[0154]

HCM의 품질관리기준인 음성대조물질의 흡광도, 양성대조물질의 세포생존율을 실시했을 때 음성대조물질의 흡광도는 1, 2, 3차 모두 기준 값인 0.7 이상의 측정 결과를 보여 모두 품질관리 기준을 통과하였으며, 양성대조물질의 세포생존율 또한 1, 2, 3차 모두 기준 값인 20% 미만의 결과를 보여 품질관리 기준을 통과하였다. T1은 시험물질의 vehicle로 음성대조물질과 비슷한 수치의 세포생존율을 보이므로 시험물질의 자극평가에 미치는 영향은 없다고 판단된다.

[0155] 자극평가 시험에서 모든 시험물질에서 50% 이상의 세포생존율을 보여 비자극성으로 판정되었다.

[0156] <실시예 4> 피부 안정성 평가(인공피부모델 KeraSkin™을 이용한 일차자극시험)

[0157] (1) 음성대조물질의 흡광도

[0158] 음성대조군 흡광도 측정 결과는 표 10과 같다. 음성대조군의 흡광도는 인공 각막 모델에 PBS를 처리하여 MTT assay 후 흡광도를 측정하였다. 실험실 내 음성대조군의 흡광도 품질관리 기준은 0.7 이상 1.5 이하이다.

표 10

	1run	2run	3run	Mean ± SD
광학 밀도	0.703	0.709	0.702	0.705 ± 0.003

[0160] 음성 대조군 광학 밀도의 정상 범위 수치는 0.7과 동일하거나 높고, 1.5 보다 동일하거나 낮다.

[0161] (2) 양성대조물질의 세포생존율

[0162] 양성대조군의 세포생존율 측정 결과는 표 11과 같다. 양성대조군의 세포생존율은 5% SDS를 인공 각막 모델에 물질 처리하여 MTT assay 후 양성대조군의 흡광도를 음성대조군의 흡광도로 환산하여 구하였다. 실험실 내 양성대조물질의 세포생존율 품질관리 기준은 20% 이하이다.

표 11

	1run	2run	3run	Mean ± SD
세포 생존율	15.2	19.8	17.1	17.39 ± 2.1

[0164] 양성 대조군 세포 생존율의 정상 범위 수치는 20%와 동일하거나 낮다.

[0165] (3) 자극 평가 시험 결과

[0166] KeraSkin™의 자극 평가 시험의 결과는 도 16 및 표 12와 같다. KeraSkin™에 음성대조물질인 PBS 적용 후 MTT assay를 실시한 흡광도를 기준으로 백분율로 자극의 정도를 나타내어 50% 이상의 세포생존율을 보이면 비자극성, 50% 미만의 세포생존율을 보이면 자극성으로 판정한다. 모든 시험물질에서 50% 이상의 세포생존율을 보여 비자극성으로 판정되었다.

표 12

세포 생존율 (%)	Keraskin									Mean	SD
	1run		Mean	2run		Mean	3run		Mean		
NC	99.85	99.55	99.7	100.75	100.60	100.7	99.85	99.40	99.6	100.00	0.5
PC	15.05	15.35	15.2	19.52	20.12	19.8	17.59	16.69	17.1	17.39	2.1
T1	101.49	100.45	101.0	95.23	96.42	95.8	104.47	104.77	104.6	100.47	4.0
T2	91.80	93.44	92.6	95.08	97.32	96.2	91.51	92.40	92.0	93.59	2.2
T3	85.69	86.29	86.0	75.71	77.05	76.4	80.48	81.67	81.1	81.15	4.3
T4	98.21	98.06	98.1	97.32	94.49	95.9	98.51	100.45	99.5	97.84	1.9
T5	82.41	84.05	83.2	86.74	85.54	86.1	76.60	76.30	76.5	81.94	4.5

T6	78.24	78.09	78.2	57.23	57.08	57.2	68.26	68.41	68.3	67.88	9.4
----	-------	-------	------	-------	-------	------	-------	-------	------	-------	-----

[0168]

(4) 고찰

[0169]

KeraSkin™의 품질관리기준인 음성대조물질의 흡광도, 양성대조물질의 세포생존율을 실시했을 때 음성대조물질의 흡광도는 1, 2, 3차 모두 기준 값인 0.7 이상, 1.5 이하의 측정 결과를 보여 모두 품질관리 기준을 통과하였으며, 양성대조물질의 세포생존율 또한 1, 2, 3차 모두 기준 값인 20% 미만의 결과를 보여 품질관리 기준을 통과하였다.

[0170]

T1은 시험물질의 vehicle로 음성대조물질과 비슷한 수치의 세포생존율을 보이므로 시험물질의 자극평가에 미치는 영향은 없다고 판단된다.

[0171]

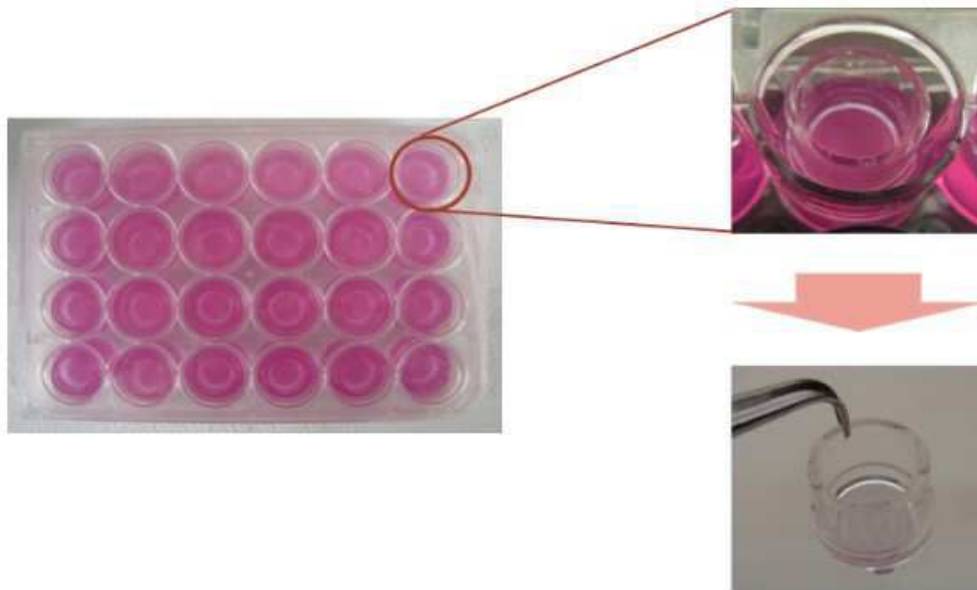
자극평가 시험에서 모든 시험물질에서 50% 이상의 세포생존율을 보여 비자극성으로 판정되었으나 T6은 다소 낮은 세포생존율을 보여주었다.

도면

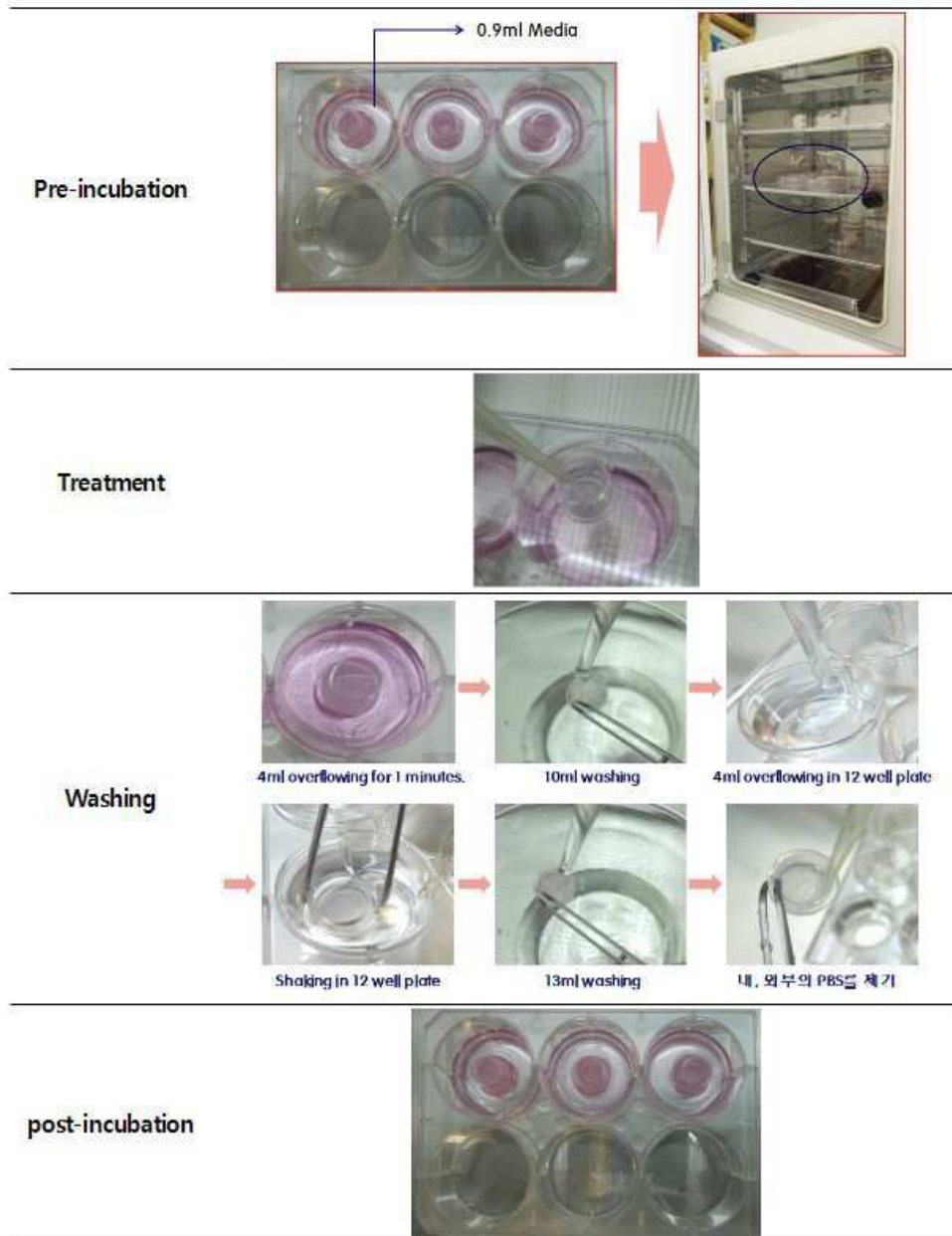
도면1



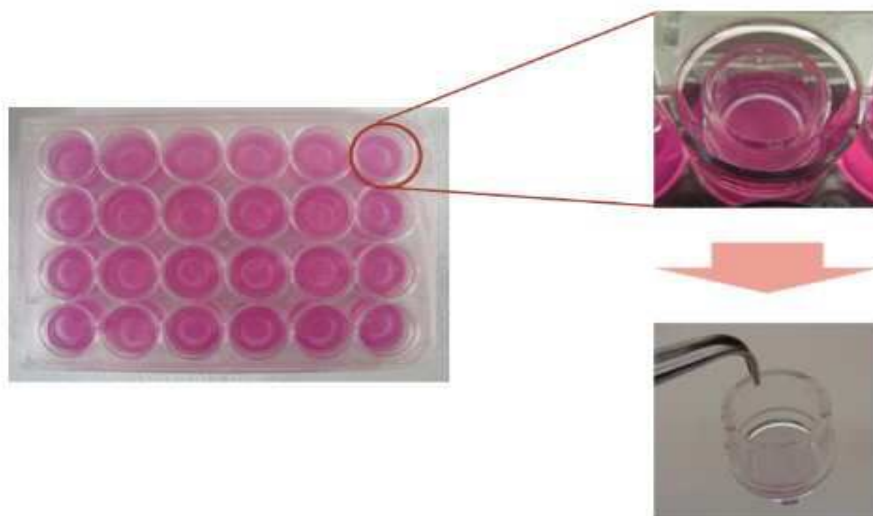
도면2



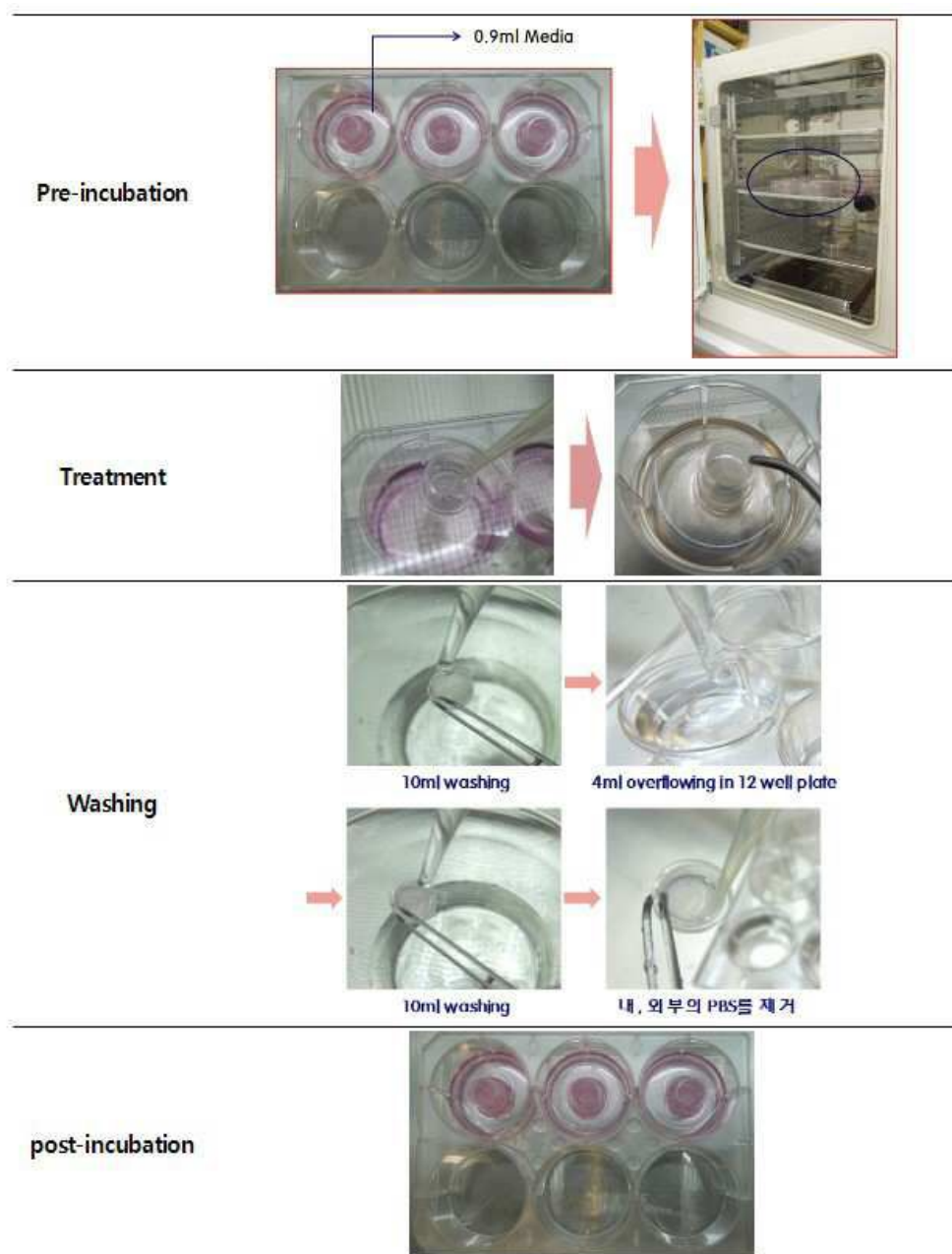
도면3



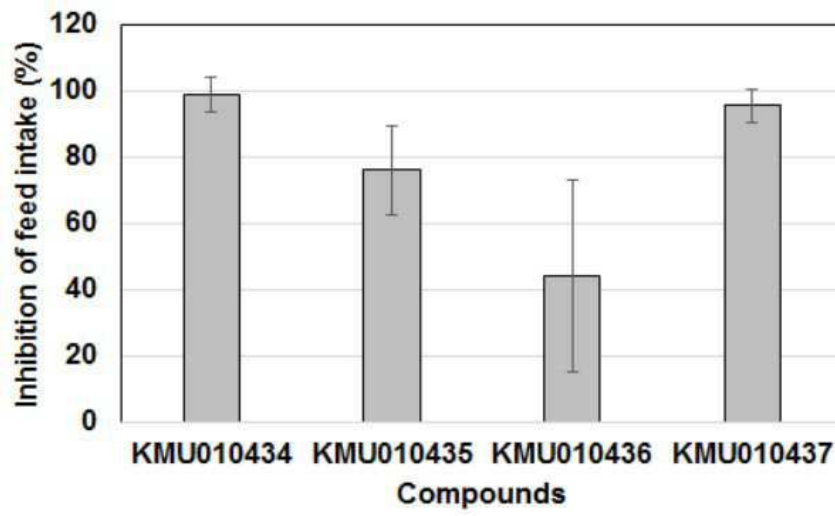
도면4



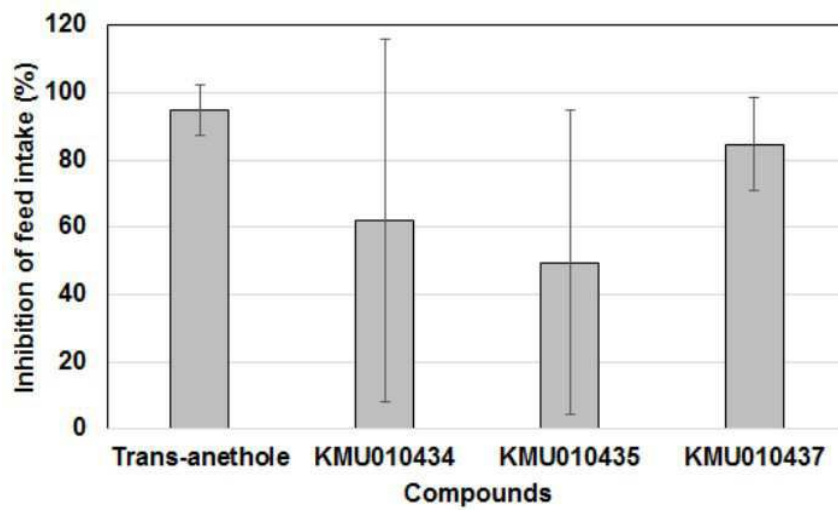
도면5



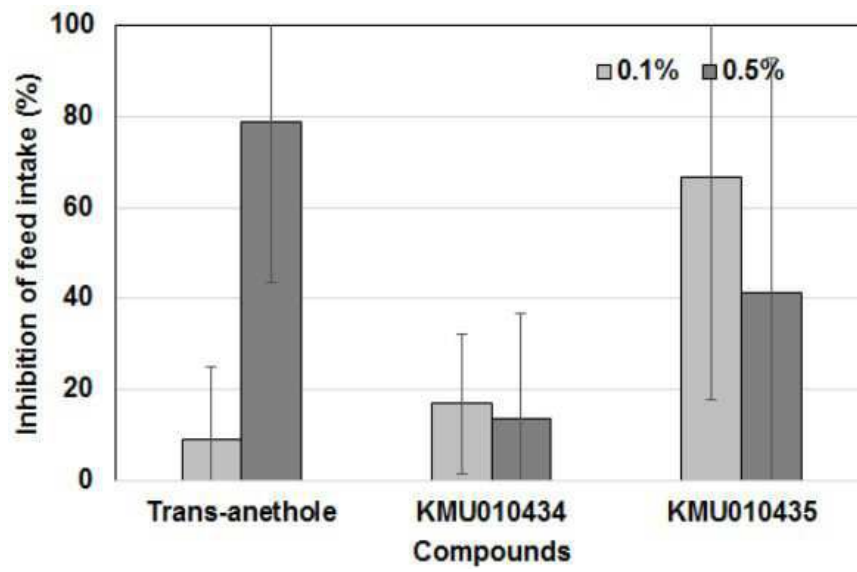
도면6



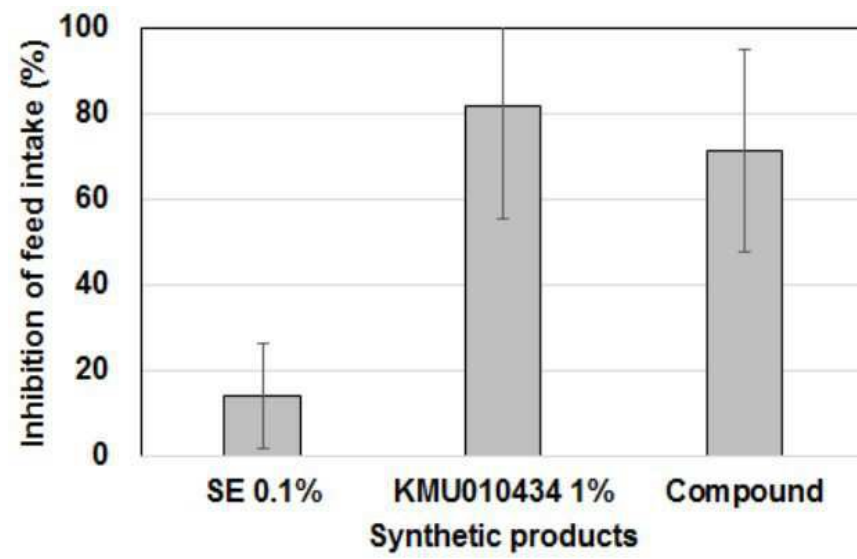
도면7



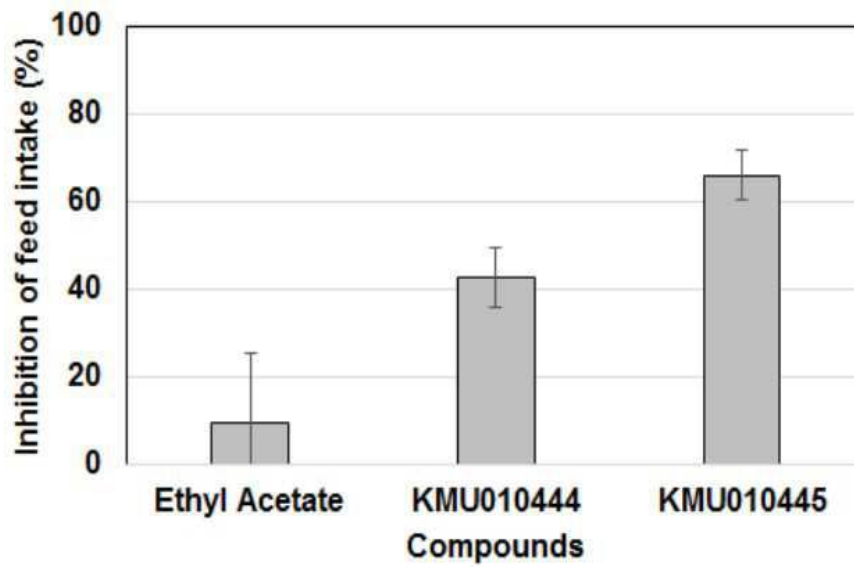
도면8



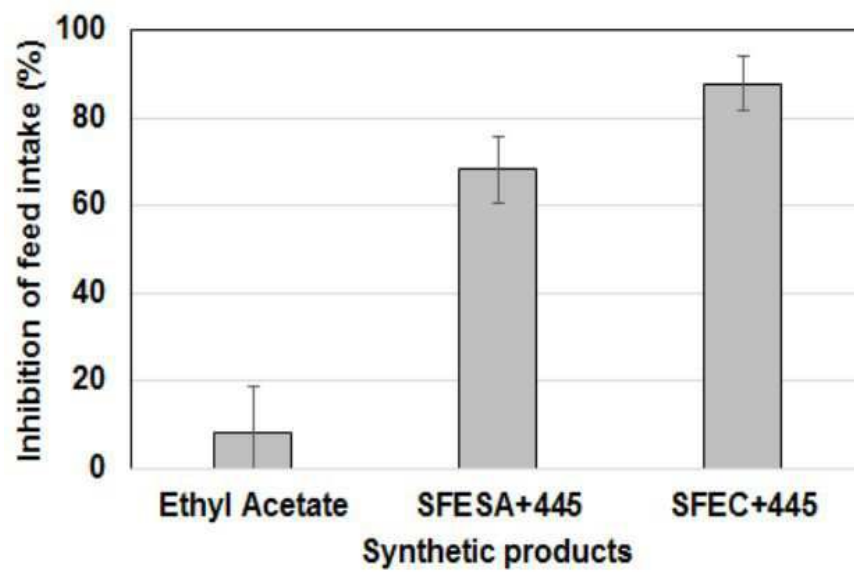
도면9



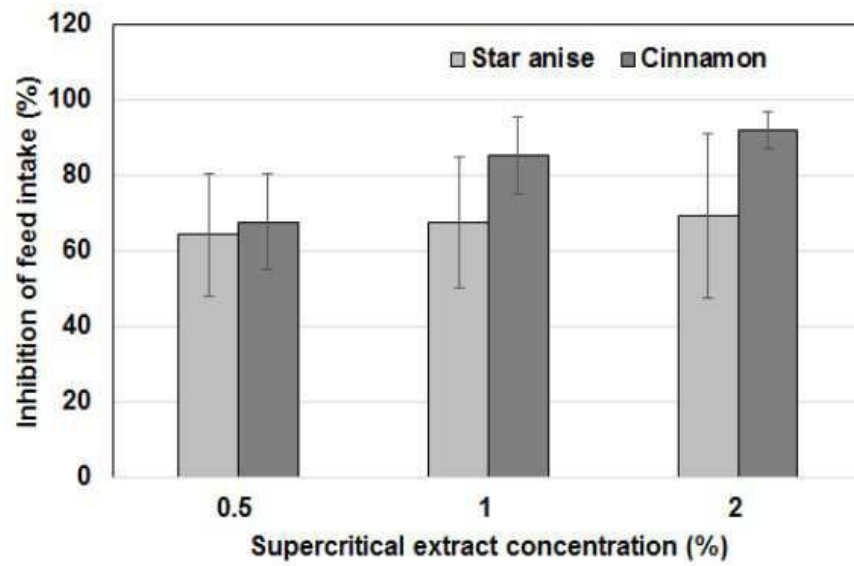
도면10



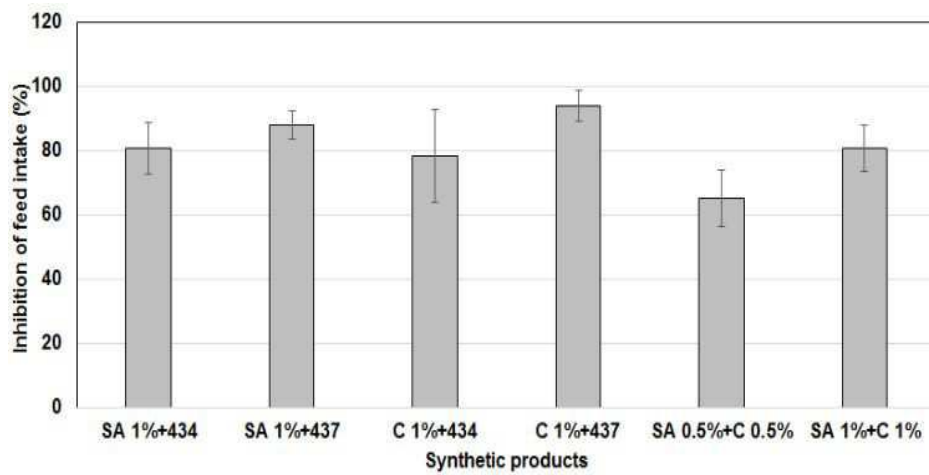
도면11



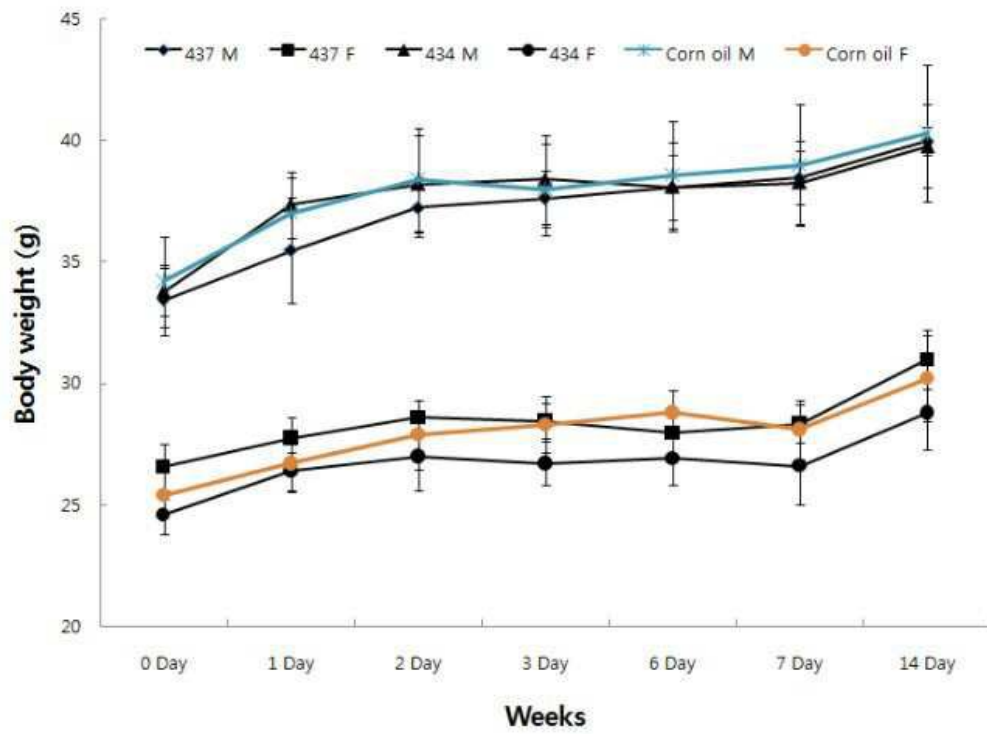
도면12



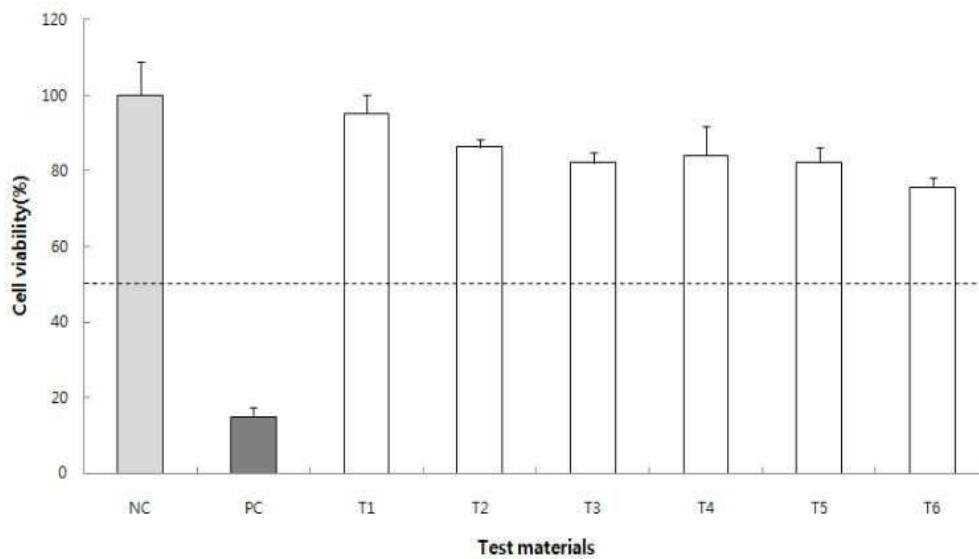
도면13



도면14



도면15



도면16

