

극지연구소장 귀하

극지 미세조류 유래 소재를 이용한 효능평가

Biological activity evaluation of materials  
from polar microalgae

본 보고서를 “극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석” 과제의 협동연구 “극지 미세조류 유래 소재를 이용한 효능평가” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 12. 30.

(본과제) 총괄연구책임자: 김 상 희

협동연구기관명: 한국한의학회연구원  
협동연구책임자: 채 성 옥

한국한의학회연구원

협동참여연구원: 김기모  
“ : 이익수  
“ : 이주영



보고서 초록

요 약 문

협동연구과제명	극지 미세조류 유래 소재를 이용한 효능평가				
협동연구책임자	채 성 옥	해당단계 참여연구원 수	3	해당단계 연구비	60,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	한국한의학회연구원/한약연구부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서면 수
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 극지유래 주름개선 소재 국제화장품원료집(ICID)에 등재 (2019.05.24)                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상품명 : KOPRI-KIOM Eico glycerol, INCI 명칭 : Glyceryl Eicosapentaenoate</li> <li>* ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary): 미국화장품협회(CTFA)에서 발행하는 화장품원료사전으로 화장품과 퍼스널케어에 사용되는 원료리스트를 제공</li> </ul> </li> <li>○ 비임상 효능평가                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자외선에 의한 세포손상 보호효과와 피부노화를 유발하는 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름개선 효능이 있음을 확인함.</li> <li>- 피부세포에서 세포 안전성을 확인함.</li> </ul> </li> <li>○ 임상시험에서 효능 검증 (마케팅용 임상이 아닌 기능성화장품 임상)                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 승인번호 IRB : 제1-220777-A-N-02호-DICN19106, CRIS : KCT0004021</li> <li>- 극지미세조류 유래 물질은 모든 피험자에게서 피부 이상반응이 관찰되지 않았고 피부주름 개선 효능평가 결과 유의성 있는 효과를 확인함.</li> <li>* 주름피라미드의 구간비교에 따른 효능검증 (Rt, Rm, Rp, Rz, Ra)</li> <li>- 임상시험을 통해 피부안전성과 주름개선 효능을 확인함.</li> </ul> </li> <li>○ 임상결과 관련 지재권 확보                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 출원번호 (10-2019-0164076)</li> </ul> </li> </ul>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	극지미세조류, 피부, 임상, 자외선			
	영 어	polar microalgae, skin, clinical trial, ultraviolet			

I 제목 : 극지 미세조류 유래 소재를 이용한 효능평가

II 연구개발의 목적 및 필요성

- 인류보건과 삶의 질 개선
  - 인류 보건과 삶의 질 향상을 좌우하는 피부건강에 대한 관심은 국내뿐만 아니라 글로벌 이슈임.
  - 웰빙 트렌드와 함께 피부건강을 유지하기 위한 다양한 방안들이 적극적으로 제시되고 있음.
  - 심화되는 환경오염으로 웰빙 트렌드에 대한 관심이 더욱 증가하여 2020년까지 유기농 생활용품 시장은 15.98조 (50%이상)로 증가할 것으로 추정되고 있음 (Grand view research 2015).
  - 특히 극한 환경에서 생물들이 만들어내는 천연 방어물질들은 화장품, 의약품계의 폭발적인 관심(craze)을 받고 있으며 활성산소억제, 자외선차단제 등으로 개발되고 있음.

III 연구개발의 내용 및 범위

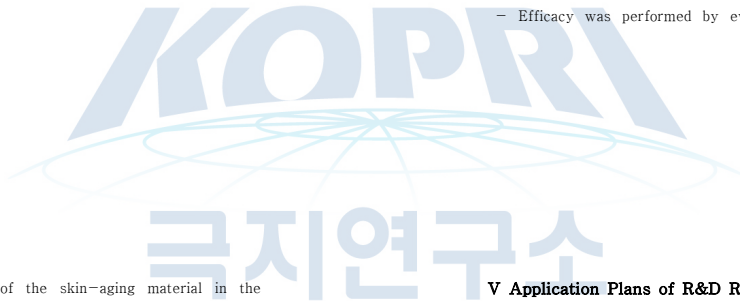
- 원료 시료의 확보
  - 분류학적으로 정확하게 동정된 시료를 극지연으로부터 공급받아 효능실험에 활용함.
  - 효능성분의 경우 대량확보를 통해서 비임상 및 임상평가 활용함.
  - 극지유래 주름개선 소재는 국제화장품원료집(ICID)에 등재됨 (INCI 명칭 : Glyceryl Eicosapentaenoate).
- 피부노화 관련 효능평가
  - 산화적손상에 의한 피부손상을 세포모델에서 평가하였으며, 이런 산화적손상에 의해서 유발된 노화조절 인자에 대한 연구를 진행함.
  - 세포모델에서 피부노화와 관련된 약물의 독성, 주름억제 단백질 발현량, 보습인자 평가를 통해서 효능을 평가함.
  - 임상평가를 통해서 피부 안전성과 주름개선 효능을 평가하였으며 (식약처 평가 가이드라인), 피험자들을 선정할 후 이중맹검과 무작위배정에 따라 시험제품과 대조제품을 각각 좌, 우측 시험부위에 사용함.
  - 평가는 사용 전과 사용 4 주 , 8 주 , 12 주 후 시험에서 육안평가, 주름 파라

IV 연구개발결과

- 원료 시료의 권리 확보
  - 극지유래 주름개선 소재는 국제화장품원료집(ICID)에 등재됨 (INCI 명칭 : Glyceril Eicosapentaenoate).
  - 본 소재의 경우 지재권 확보를 위해 특허를 출원함.
- 피부노화 관련 효능평가
  - 극지유래 소재를 스크리닝 하여 자외선 유도 피부손상을 개선 시킬 수 있는 소재를 도출함.
  - 도출된 소재에 대해 주름개선 관련인자인 MMP (Matrix Metalloproteinases)와 보습관련 인자를 평가하여 효능을 확인함.
  - 산화적손상에 의한 피부손상보호 효능을 세포모델에서 평가하였으며, 세포독성은 나타나지 않음을 확인함.
  - 피험자를 대상으로 시험기간 동안 모든 피험자에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않았고, 인체피부 일차자극 시험 결과, 본 시험물질에서 자극 반응이 나타나지 않음.
  - 주름개선 임상평가 결과 중간 비교 시, Rt 및 Rm 파라미터가 제품 사용 4 주, 8 주 및 12 주 시점에서, Rp 파라미터가 제품 사용 4 주 및 8 주 후 시점에서, Rz 및 Ra 파라미터가 제품 사용 8 주 및 12 주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 유의하게 감소함 (p <0.05).

V 연구개발결과의 활용계획

- 극지유래 피부노화개선 소재 사업화
  - 기술마케팅 참석을 통한 관심기업 확보 및 비밀유지계약 체결
  - 식약처 기능성인증 및 기술이전 추진
  - 기술사업화 사업 등을 이용한 제품 생산



expression, and moisturizing factor of the skin-aging material in the cellular model.

- Clinical trial evaluated skin safety and anti-wrinkle efficacy (MFDS evaluation guideline). After selecting subjects, the test product and the control were used for the left and right test sites, respectively, according to double-blind and randomized assignment.
- The evaluation was performed before and after 4 weeks, 8 weeks, and 12 weeks of use, by visual evaluation, wrinkle evaluation, and questionnaire evaluation by skin test subjects.

IV R&D Results

- Securing rights of raw material
  - Polar-derived wrinkle improvement materials are registered in the International Cosmetics Collection (ICID) (INCI name: Glyceril Eicosapentaenoate).
  - This material was applied for a patent to secure intellectual property rights.
- Evaluation of skin aging
  - Screening polar-derived materials to derive materials that can improve UV-induced skin damage.
  - The efficacy of the material was evaluated by evaluating the factors related to wrinkle improvement and matrix metalloproteinases (MMP).
  - The protective effect on skin damage by oxidative damage was evaluated in the cellular system, and the cytotoxicity was not shown.
  - No skin damage was observed in all subjects during the test period, and subjects did not show any irritant response in this test substance.
  - In the comparison of wrinkle improvement between groups, the Rt and Rm parameters at 4, 8, and 12 weeks of use of the product, the Rp parameters at 4 and 8 weeks of use of the product, and the Rz and Ra parameters at 8 and 12 weeks of the use of the product were significantly decreased in the test group compared to the control group (p <0.05).

I Title : Biological activity evaluation of materials from polar microalgae

II Purpose and Necessity of R&D

- Improve human health and quality of life
  - The interest in skin health, which affects human health and quality of life, is a global issue not only in Korea.
  - Along with well-being trends, various measures for maintaining skin health are being actively proposed.
  - Increasing interest in well-being trends due to intensified environmental pollution, the organic household goods market is estimated to increase to 15.98 trillion (over 50%) by 2020 (Grand view research 2015).
  - Natural defense materials created by living organisms, especially in extreme environments, are receiving explosive interest in the cosmetics and medical industries and are being developed as active oxygen inhibitors and sunscreens.

III Contents and Extent of R&D

- Securing raw material sample
  - The taxonomically accurate sample is supplied from the KOPRI and used for the efficacy test.
  - Active compound was evaluated for non-clinical and clinical trial through mass production.
  - Polar-derived wrinkle improvement materials are registered in the International Cosmetics Collection (ICID) (INCI name: Glyceril Eicosapentaenoate).
- Evaluation of the efficacy related to skin aging
  - The skin damage caused by oxidative damage was evaluated in the cellular system, and the aging control factors caused by the oxidative damage were studied.
  - Efficacy was performed by evaluating the toxicity, anti-wrinkle protein

V Application Plans of R&D Results

- Commercialization of polar derived anti-wrinkle material
  - Securing interested companies and non-disclosure agreement (NDA) by attending technology marketing
  - Cosmeceutical certification from MFDS and technology transfer
  - Production of cosmetics by commercialization projects

## 목 차

제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술개발현황	3
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	7
제 4 장 연구개발목표 달성도	42
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	43
제 6 장 참고문헌	45

## I. 서론

### 1. 연구개발 개요

#### 1) 연구개발 목표

- 주름개선 효능이 확인된 소재(지재권화보)를 이용한 제품의 임상시험, 효능 관련 작용기전을 규명하여 주름개선 기능성화장품을 개발하고자 함.

#### 2) 연구개발 필요성

- 현대인들은 고령화시대를 맞이하여 오래사는 것 보다는 어떻게 사는 지에 대한 삶의 질을 추구하는 트렌드로 인해, 화장품산업은 글로벌 경제위기에 불구하고 필수 소비재로 인식하면서 높은 성장률을 보이고 있어 이런 트렌드에 부합되는 제품을 개발하고자 함.
- 극한 환경에서 생물들이 만들어내는 천연 방어물질들은 화장품, 의학업계의 많은 관심을 받고 있으며 활성산소억제, 자외선차단제 등으로 개발되고 있음.
- 국내 화장품 산업은 기능성, 피부 안정성, 제제 안정화 등 다양한 연구가 진행되고 있으며 매년 기능성 화장품 시장의 점유율이 크게 성장하고 있음.
- 화장품 시장 규모는 지속적인 성장에 비해 새로운 소재의 개발은 새로운 성장동력을 위해서 연구가 필요한 실정임.
- 화장품 시장도 지속적인 성장을 이루고 있지만, 기능성 화장품에 대한 연구개발로 기능성 화장품의 시장이 확대되고 있으며, 기능성 화장품은 화장품 시장을 견인하는 것으로 해석됨.
- 본 연구에서는 단순한 추출물이 아닌 효능성분의 수준까지 연구가 된 것으로 진입 장벽이 높아 기술사업화를 통해 시장에서 독점적 지위를 가질 수 있음.
- 본 기술은 특허의 존속기간이 2039년으로 권리안정성이 확보되어 유리함.

#### 3) 지식재산권 현황

- 본 기술은 앞서 설명한 바와 같이 임상에서 효능을 검증하여 국내 특허출원을 마쳤다.
- 아래의 표와 같이 관련 지식재산권이 존재하는 것으로 분석되었고, 본 기술과 유사한 소재를 이용하기는 하지만 유효성분이 대상특허와 차이가 있어 관련도는 A로 판단되어 향후 과제를 수행하는 데 무리가 없을 것으로 판단됨.
- \* 관련도 : X - 관련없음, Y - 관련있음, A - 관련은 없으나 참고할 자료
- \* X, Y - 주요참증에 해당, A - 참고참증에 해당



< 표 I-1-1. 본 기술 관련 국내외 선행문헌 현황 >

선행문헌명	출원인	문헌번호	관련도
Eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid 1:1 ratio improves histological alterations in obese rats with metabolic syndrome	Unit of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira I Virgili University, Reus, Spain	Lipids in Health and Disease 2014, 13:31	A
Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo	Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine, Laboratory of Cutaneous Aging Research, Clinical Research Institutes	Journal of Lipid Research Volume 47, 2006 921	Y
미세녹조류를 이용한 항산화, 주름개선, 항어드름·항염증 및 미백효능을 가지는 기능성 추출물 및 그의 제조방법	조원순	한국등록특허 제0889973호	A
<b>&lt;종합의견&gt;</b> ○ 본 기술에 대비되는 선행문헌에는 본인 발명의 유효성분과 유사한 구조를 가지는 EPA 및 DHA의 주름개선 효과를 제시하고 있으나 본 기술의 유효성분인 1-monoicosapentaenoic의 주름개선 효과는 아님. ○ 이를 종합하여 볼 때, 본 기술의 유효성분인 1-monoicosapentaenoic의 주름개선 효과를 용이하게 유추 또는 도출할 수 없을 것으로 판단됨.			

#### 4) 관련규정

- 화장품법 (법률 제14264호, 2016.5.29)
- 화장품법 시행령 (대통령령 제27827호, 2017.1.31)
- 화장품법 시행규칙 (총리령 제1357호, 2017.1.12)
- 식품의약품안전처 고시
- 기능성화장품 범위 확대 (2017.05.30. 시행)
- \* 기능성 3종 (주름, 미백, 자외선차단)에서 10종으로 추가 개정

## II. 국내외 기술개발 동향

### 1. 연구개발 동향

#### 1) 기술수준 비교

- 많은 연구가 학교보다는 화장품 회사를 중심으로 이루어지고 있으며, 다국적기업의 연구범위나 수준은 상당히 높은 수준이지만 한국의 화장품기술의 격차가 선진국 대비 크지 않아 추적이 가능함.

< 표 II-1-1. 현 보유기술의 선진국과의 기술수준 비교 >

기술분류	국가	연구기관	연구내용	기술격차 (년)
A, B, C	프랑스	L'OREAL GROUP	- 자외선 차단, 피부노화, 탈모의 다양한 분야의 연구 - 피부세포 약물전달 시스템 연구 - 천연물과 합성의약품을 이용한 소재 발굴	5
A, C	미국	PROCTER & GAMBLE (P&G)	- 보습, 세정, 피부보호, 자외선차단제, 아토피 등의 피부질환, 두피관련 연구	5
A, B, C	영국	UNILEVER	- 피부보호 조성물, 세정, 미백, 제형등의 다양한 연구 - 합성의약품을 이용한 소재 발굴	5
A, B, C	미국	THE ESTEE LAUDER	- 보습, 세정, 피부보호, 자외선차단제 - 합성의약품을 이용한 소재 발굴	5
A, B, C	일본	SHISEIDO CO.	- 화장품 또는 화장품제제, 자외선 차단제, 피부 보호제, 주름개선 연구	2

\*기술분류

- A - 피부세포 보호능 측정기술
- B - 후보군 도출기술
- C - 작용기전 평가기술

- 해외 선진국이 독과점으로 선점하기 힘든 영역인 극저소재 발굴을 통해서 세계시장으로의 영역으로 진출하는 것이 국가경쟁력 확보에서 유리함.
- 세계의 피부질환 치료제 시장규모는 연평균 성장률 7.7%로 2015년 200억 달러에서 2022년 337억 달러로 확대될 전망이다 (세계의 피부 질환 치료제 시장 전망, 2016)
- NDSL (National Digital Science Library)에 검색어 해조류 화장품으로 단 21편의

논문이 검색될 만큼 연구가 미비하며 주로 대형 해조류 위주로 미세조류 성분 연구는 진부한 상황임.

- 전세계적으로 마린 코스메틱이 각광을 받고 있으며 비오덤 (Biotherm)은 해조류 추출물 특히 보유, 해양 성분을 메인으로 한 제품을 개발하였고 일본 Kento사는 해조엑기스 후코이단을 넣은 화장품, 샴푸 등 판매 증진.
- 피부노화 및 안티에이징 목적으로 어류 유래의 천연 세포보호 단백질질을 함유한 상품이 현재 시판되고 있음 (LIFT LABS Co.).
- Kurbiel (프랑스), Lumene (노르웨이), Skyn ICELAND (핀란드)등은 남극극 식물, 해조류, 미세조류 등의 추출물을 이용한 화장품과 피부보호제품들을 제작하여 시판하고 있음.
- 피부질환 개선제의 원료로서 천연 및 제조합 세포보호 물질 등이 함유된 제품은 개발된 바 없음.

## 2) 선진시장의 진출 확대

- 한국의 적극적인 해외 진출 전략으로 미국, 유럽 등의 대형 화장품 매장인 울타 (Ulta), 세포라(Sephora), 부츠(Boots)에 방문하는 등 해외 오프라인 유통 패러다임에 맞춰 국내 화장품기업들의 움직임이 활발해지고 있음 (2017 화장품 산업분석보고서, KHIDI).

## 2. 시장동향

### 1) 세계시장 동향

- 글로벌 화장품 산업은 전 세계적 불황에도 불구하고 수요를 지속적으로 창출해내는 미래 유망산업으로 위상을 넓혀가고 있음.
- Euromonitor 자료에 의하면 2017년 세계 화장품 시장규모는 3,918억 달러로 전년 대비 1.1% 증가함.
- 북미·유럽에서의 재정위기 등으로 2016년 화장품 산업의 성장이 다소 둔화되었지만 2017년을 기점으로 다시 반등하는 추세임.
- 향후 2022년 세계 화장품 시장규모는 4,487억 달러로 꾸준한 증가세를 보일 것으로 전망됨.



〈그림 11-2-1. 세계화장품 시장규모 및 증가율〉

주 : 1. Euromonitor 자료를 이용하여 우리나라 화장품 유형 위주로 자료를 분석  
2. 2018년 이후 연도의 시장규모는 Euromonitor에서 추정된 값임  
자료 : Euromonitor International, 2019(Mar), 2019년 화장품분석보고서 KHIDI

### 2) 국내시장 동향

- 2018년 국내 화장품 생산 및 수출입 현황 자료를 이용하여 산출한 시장규모(생산 + 수입 - 수출)는 전년 대비 6.5% 증가한 10조 4,011억 원으로 나타났으며, 연평균 성장률(2014~18) 또한 5.4%로 꾸준한 성장세
- 국내 화장품산업 총생산규모는 15조 5,028억 원으로 전년 대비 14.7% 증가하였으며, 최근 5년 연평균(2014~18) 증가율이 14.7%로 매년 10% 이상 지속 성장함.
- 화장품 수출은 해마다 증가하여 2018년 6조 9,081억 원으로 전년 대비 26.5% 증가했으며, 수입(1조 8,064억 원)도 전년 대비 5.4% 증가함.
- 국내 화장품의 뚜렷한 수출 성장세가 지속되고 있으며, 2018년 무역수지는 2014년 흑자전환 이후 4년 새 약 10배 증가함 (2019년 화장품산업 분석보고서, KHIDI).
- 이런 세계시장 동향에 맞추어 불 때 화장품 분야는 국가적으로 경쟁력이 있어 이에 부합되는 극지유래의 소재개발은 국가이익을 위해서 매우 중요함.

### 3) 천연물 중심의 화장품 소재 확대

- 부작용이 적은 천연물소재를 이용한 화장품 개발이 이루어지고 있으며, 미국의 Johnson & Johnson은 아토피 및 유아로션 등을 Aveeno라는 천연화장품 브랜드로 제품을 출시함.



- 또한, 미국의 유명 화장품 기업인 Estee Lauder는 자회사 (Origins와 Aveda)를 통해서 유기농 재료를 이용한 천연화장품을 출시함.
- 국내에서도 이런 천연물 분야를 선점하기 위해 특허출원이 활발하게 진행되고 있으며, 아모레퍼시픽의 대기업 중심으로 다수의 특허가 출원된 것으로 분석됨 (중소·중견기업 기술로드맵 2017-2019, 중소기업부).

### 4) 신성장 동력확보를 위한 인수합병 전략

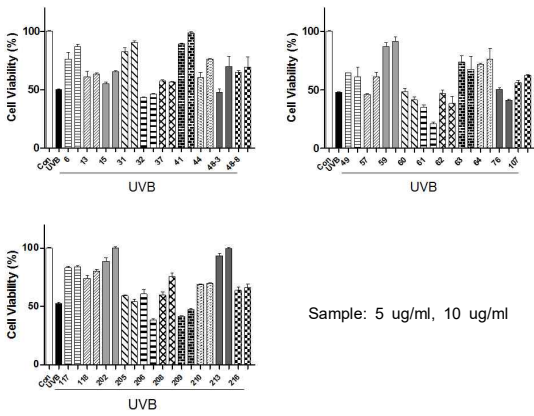
- 제품 수명주기가 단축되고 제품개발에 필요한 기술이 복잡하게 되면서 선진국 화장품 기업의 경우 개방형 혁신 시스템 도입을 적극 추진하는 추세임.
- 로레알은 중소기업 인수 후 자사의 플랫폼을 활용하여 사업을 고도화하는 전략으로 사업을 확대함 (로레알 산하 28개 브랜드중 자체 브랜드는 4개에 불과).
- 인수합병(M&A)를 통해 브랜드를 인수하고 타겟 소비자, 가격, 판매채널 등에 따라 브랜드를 차별화하는 니치 마켓을 지속적으로 공략하고 있음 (화장품산업인성장 동력화 연구, 한국수출입은행).
- 본 기술은 이런 동향에 부합되는 소재로 향후 적극적인 기술마케팅을 통해서 기술 이전 또는 상용화 가능성이 높은 소재로 판단됨.

## III. 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 세포효능평가

#### 1) 스크리닝

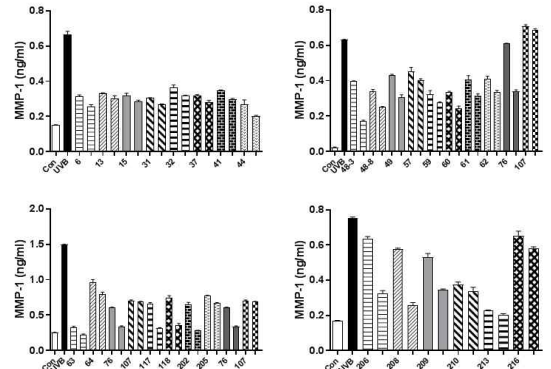
- 극지유래 유효소재 발굴
  - 극지유래 소재를 스크리닝 하여 자외선 유도 피부손상을 개선시킬 수 있는 소재를 도출하였다.
  - 도출된 소재에 대해 주름개선관련인자와 보습관련 인자를 평가하여 효능을 확인하였다.
- 유효소재의 자외선손상에 따른 세포보호 효능평가 (스크리닝)
  - 세포태양은 HaCaT (human keratinocyte)세포를 미국 세포주 은행 (American Type Culture Collection, ATCC)에서 분양받아, DMEM (10% 우태아 혈청 첨가, 1% 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하고, 24시간 시료를 처리하여 후보소재의 세포독성을 확인하고 농도를 설정한 후, 후보소재를 24시간 처리한 후 자외선(UV Crosslinker, Ultra Lum)을 조사한 후 자외선에 의한 세포 보호효능을 확인하였다.
  - 극지연구소에서 제공받은 소재 중 자외선에 의한 세포 보호 효능이 있는 소재를 스크리닝하여 확인하였다 (그림 III-1-1).



<그림 III-1-1. 극지유래소재 KSF시리즈의 세포보호 효능평가>

○ 유효소재의 MMP-1 억제 효능평가

- MMP-1은 피부노화와 연관있는 단백질로 자외선과 같은 산화적 스트레스에 의해 증가하는 것으로 알려졌으므로 본 실험에서는 산화적 손상으로부터 유도된 MMP-1의 억제 효능을 측정하기 위해 HaCaT 세포를 배양하여 다양한 농도로 시료를 처리한 후 Quantikine ELISA human pro MMP-1 kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 MMP-1을 측정하였다.
- 실험결과, UVB를 조사하면 MMP-1의 발현량이 증가하는데 MMP-1의 발현량을 감소시키는 효능이 있는 KSF소재를 확인할 수 있었다 (그림 III-1-2).



<그림 III-1-2. 극지유래소재 KSF시리즈의 MMP-1 효능평가>

- 세포보호효능과 MMP-1억제 효능 스크린을 통하여 효능이 우수한 KSF-0006 메탄을 추출물의 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 제공 받았고 이의 세포 독성 및 자외선에 의한 세포 보호 효능을 확인하였다.
- 실험 결과 아무것도 처리하지 않은 control 그룹과 비교하여 10 ug/ml의 농도까지는 세포 독성을 나타내지 않았고(표 III-1-1), 처리 농도를 1, 2.5, 5, 10 ug/ml 농도로 설정하여 자외선에 의한 세포 보호 효능을 확인하였다 (그림 III-1-3).

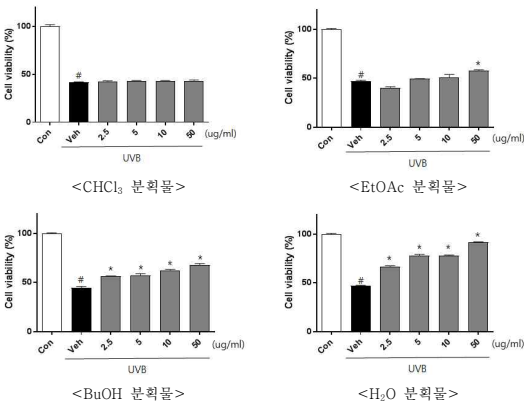
<표 III-1-1. KSF-0006 분획물의 세포독성 결과>

	control	1 ug/ml	2.5 ug/ml	5 ug/ml	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
CHCl <sub>3</sub> fr.	100	94.92	95.17	98.06	94.4	89.03	85.06
EtOAc fr.	100	99.45	93.94	104.05	94.29	93.46	79.49
BuOH fr.	100	95.66	97.6	98.14	98.29	91.56	89.87
H <sub>2</sub> O fr.	100	104.57	108.08	110.8	110.61	110.1	111.45

- KSF-0006 메탄을 추출물의 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 2.5, 5, 10, 50 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사한 결과 BuOH 분획물과



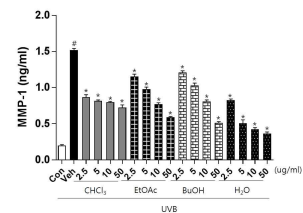
H<sub>2</sub>O 분획물에서 세포 보호 효능을 확인하였으며 H<sub>2</sub>O 분획물에서는 아무것도 처리하지 않은 control과 비교하여 세포보호 효능이 91.46 % 까지 증가하는 것을 확인하였다 (그림 III-1-3).



<그림 III-1-3. 자외선에 의한 세포보호 효능>

#p<0.05, con vs vehicle, \*p<0.05, vehicle vs samples

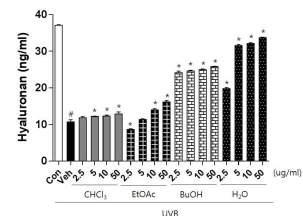
- KSF-0006의 메탄을의 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 2.5, 5, 10, 50 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사하여 MMP-1의 발현량을 확인한 결과 BuOH 분획물과 H<sub>2</sub>O 분획물에서 MMP-1 억제 효능을 확인하였다 (그림 III-1-4).



<그림 III-1-4. KSF-0006 분획물의 MMP-1 발현량>

#p<0.05, con vs vehicle, \*p<0.05, vehicle vs samples

- KSF-0006 메탄을 추출물의 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 2.5, 5, 10, 50 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사하여 hyaluronan의 발현량을 확인한 결과 BuOH 분획물과 H<sub>2</sub>O 분획물에서 UVB에 의해 감소하였던 hyaluronan의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다 (그림 III-1-5).



<그림 III-1-5. KSF-0006 분획물의 Hyaluronan 발현량>

#p<0.05, con vs vehicle, \*p<0.05, vehicle vs samples

- 극지연구소에서 제공받은 소재 중 단백질 1종과 CnAFP 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 제공 받았고 이의 세포 독성 및 자외선에 의한 세포 보호 효능을 확인하였다.
- 실험 결과 아무것도 처리하지 않은 control 그룹과 비교하여 200 ug/ml의 농도까지는 세포 독성을 나타내지 않았고(표 III-1-2), 처리 농도를 10, 50, 100,

200 ug/ml 농도로 설정하여 자외선에 의한 세포 보호 효능을 확인하였다.

표 III-1-2. 단백질 소재의 세포독성 결과

	control	10 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml	200 ug/ml	250 ug/ml
protein	100	95.89	93.37	98.71	98.77	101.55	96.28
ChAFP	100	107.78	110.19	101.1	99.2	109.24	94.91
ChAFP isoform	100	100.54	100.24	106	96.87	98.97	101.12
ChAFP mut3	100	85.84	93.75	104.26	102.13	102.01	98.22

- 단백질 1종과 CnAFP 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 10, 50, 100, 200 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사한 결과 단백질 1종과 CnAFP에서 세포 보호 효능을 확인하였으며 CnAFP에서는 아무것도 처리하지 않은 control과 비교하여 세포보호 효능이 95.47 % 까지 증가하는 것을 확인하였다 (그림 III-1-6).

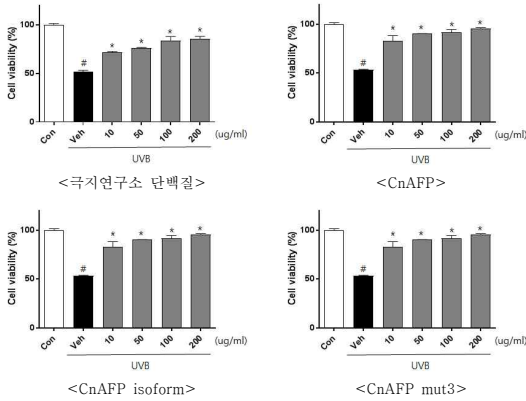


그림 III-1-6. 자외선에 의한 세포보호 효능

#p<0.05, con vs vehicle, \*p<0.05, vehicle vs samples

- 단백질 1종과 CnAFP 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 10, 50, 100, 200 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사하여 MMP-1의 발현량을 확인한 결과 CnAFP와 극지연구소 단백질에서 MMP-1 억제 효능을 확인하였다 (그림 III-1-7).

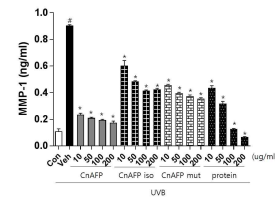


그림 III-1-7. 단백질소재의 MMP-1 발현량

#p<0.05, con vs vehicle, \*p<0.05, vehicle vs samples

- 단백질 1종과 CnAFP 3종 (CnAFP, CnAFP isoform, CnAFP mut3)을 10, 50, 100, 200 ug/ml 농도로 24시간 처리한 후 자외선을 조사하여 hyaluronan의 발현량을 확인한 결과 CnAFP와 극지연구소 단백질에서 hyaluronan의 발현량이 증가함을 확인하였다 (그림 III-1-8).

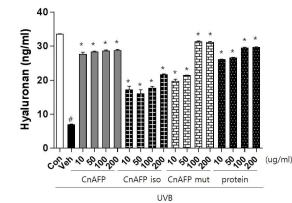


그림 III-1-8. 단백질소재의 Hyaluronan 발현량

#p<0.05, con vs vehicle, \*p<0.05, vehicle vs samples



## 2) 후보소재 선정

○ 극지유래 유효소재의 피부 보호 효능 확인

- 스크리닝을 통하여 도출된 극지 유래 소재의 임상시험을 수행하기 위하여 대용량 스케일로 제조된 *Micractinium* sp. KSF0031 Extract의 주름개선 관련 인자와 보습관련 인자를 평가하여 효능을 확인하였다.

○ 후보소재의 자외선손상에 따른 세포보호 효능평가

- 세포배양은 HaCaT (human keratinocyte)세포를 DMEM (10% 우태아 혈청 첨가, 1% 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하고, 24시간 시료를 처리하여 후보소재의 세포독성을 확인하고 농도를 설정한 후, 후보소재를 24시간 처리한 후 자외선(UV Crosslinker, Ultra Lum)을 조사한 후 자외선에 의한 세포 보호효능을 확인하였다.

- 실험결과 KSF0031은 세포독성이 없었음을 확인하였고 (그림 III-1-9), 자외선에 의해서 손상된 피부세포의 생존율을 회복시켰다 (그림 III-1-10).

- 또한 피부노화를 유발하는 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름개선 효능이 있음을 확인하였다 (그림 III-1-11).

- 극지 연구소에서 스크리닝을 위하여 제공받았던 KSF0031 시료와 비교하여 임상시험을 수행하기 위해 대용량으로 제조된 *Micractinium* sp. KSF0031 Extract 소재의 효능이 동등함을 확인하였다.

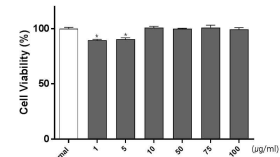


그림 III-1-9. *Micractinium* sp. KSF0031 소재의 세포독성

\* p<0.05 vs normal group

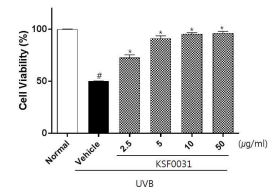


그림 III-1-10. *Micractinium* sp. KSF0031 소재의 자외선에 의한 세포보호 효능

# p<0.05 vs normal group, \* p<0.05 vs vehicle group

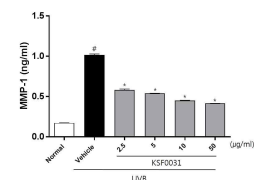
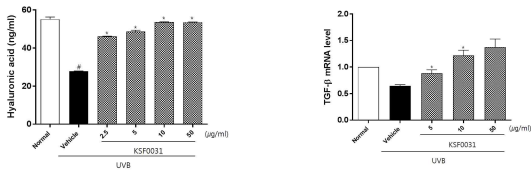


그림 III-1-11. *Micractinium* sp. KSF0031 소재의 자외선에 의한 MMP-1 억제 효능

# p<0.05 vs normal group, \* p<0.05 vs vehicle group

- 피부 보습 인자인 hyaluronic acid와 TGF-β는 자외선을 조사하였을 때 발현량이 감소하는데 *Micractinium* sp. KSF0031 Extract 소재를 처리하였을 때 피부 보습

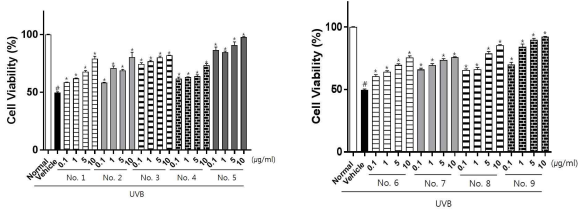
효능이 있음을 확인하였다 (그림 III-1-12).



〈그림 III-1-12. *Micractinium* sp. KSF0031 소재의 자외선손상에 의한 보습 회복효능〉

# p<0.05 vs normal group, \* p<0.05 vs vehicle group

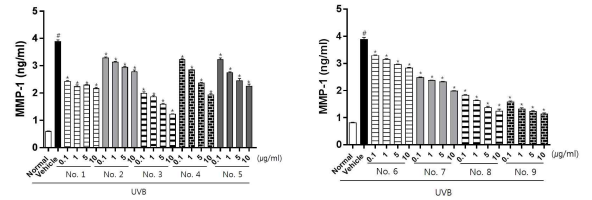
- *Micractinium* sp. KSF0031 Extract 소재에서 분리된 9개의 화합물을 제공받았으며, 자외선에 의한 세포 손상 실험 결과 5번과 9번 화합물에서 세포 보호 효능이 있음을 확인 하였다 (그림 III-1-13).



〈그림 III-1-13. *Micractinium* sp. KSF0031 화합물의 UVB에 의한 세포보호효능〉

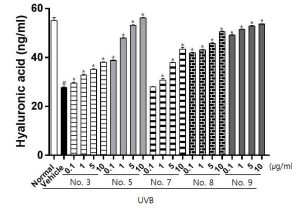
# p<0.05 vs normal group, \* p<0.05 vs vehicle group

- 피부세포 보호 효능과 MMP-1 억제 효능이 확인된 화합물 3, 5, 8, 9번의 피부보습효능을 확인한 결과 5, 9번의 효능이 가장 좋은 것을 확인하였다 (그림 III-1-14~15).



〈그림 III-1-14. *Micractinium* sp. KSF0031 화합물의 UVB에 의한 MMP-1 억제 효능〉

# p<0.05 vs normal group, \* p<0.05 vs vehicle group



〈그림 III-1-15. *Micractinium* sp. KSF0031 화합물의 UVB에 의한 보습 효능〉

# p<0.05 vs normal group, \* p<0.05 vs vehicle group



- 극지유래 후보소재(KSF0031) 국제화장품원료집(ICID)에 소재 등재
- \* ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary): 미국화장품협회(CTFA)에서 발행하는 화장품원료사전으로 화합물과 퍼스널케어에 사용가능한 원료리스트를 제공
- 소재의 ICID 관련 서류를 준비하여 신청하여 등록 완료(2018.05.17)
- 상품명 : KOPRI-KIOM KSF0031, INCI 명칭 : Chlorella sp. KSF0031 Extract

- 후보소재 (KSF0031)에서 분리된 후보 화합물의 세포독성 및 주름개선 평가
- 후보소재인 KSF0031에서 효능이 가장 우수한 9번 화합물 Glycerlyl Eicosapentaenoate (Eico glycerol)의 대용량 스케일로 제조된 물질을 제공 받아 효능 검증에 활용하였다.
- 대용량 스케일로 제조된 Glycerlyl Eicosapentaenoate소재의 세포독성 및 세포보호, MMP-1 발현량 시험을 진행하여 임상시험을 위한 기초자료로 활용하였다.
- 세포배양은 HaCaT (human keratinocyte)세포를 DMEM (10% 우태 혈청 첨가, 1% 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하고, 24시간 시료를 처리하였다.
- 후보 화합물 (Glycerlyl Eicosapentaenoate)의 세포독성을 확인하고 농도를 설정한 후, 후보소재를 24시간 처리한 후 자외선(UV Crosslinker, Ultra Lum)을 조사한 후 자외선에 의한 MMP-1의 발현량을 확인하였다.
- 실험결과 Glycerlyl Eicosapentaenoate은 세포독성이 없었음을 확인하였고 (그림 III-1-17), 자외선에 의해서 손상된 피부세포의 생존율을 회복시켰다.
- 또한 피부노화를 유발하는 단백질인 MMP-1의 발현을 억제하여 주름개선 효능이 있음을 확인하였다 (그림 III-1-18).

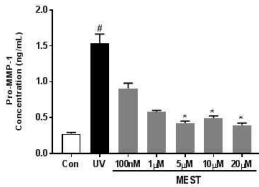


〈그림 III-1-17. Glycerlyl Eicosapentaenoate의 세포독성〉

Personal Care Products Council  
On-Line INFOBASE >> Ingredient Database  
PCPC APPLICATION NUMBER: 2017-6768  
TRADE NAMES WITH ASSIGNED INCI NAMES  
Chlorella sp. KSF0031 Extract  
INCI Name: Chlorella sp. KSF0031 Extract  
INCI Monograph ID: 33030  
Delineation: Monograph development in progress.  
Trade Names: Click here to view full list of Trade Names  
International Buyers Guide  
Tradename: Kopi-Kiom KSF0031  
Assigned INCI Name(s): MonoID: 33030 Chlorella sp. KSF0031 Extract

< INCI 명칭:Chlorella sp. KSF0031 Extract> < 상품명 : KOPRI-KIOM KSF0031 >  
〈그림 III-1-16. ICID 등재〉

- 후보소재 (KSF0031)의 피부 안전성(자극테스트) 평가 (MFDS, CTFA 가이드라인)
- IRB 승인번호 : 제1-220777-A-N-02호-DICN18142
- 최고 연령자 49세, 최저 연령자 21세, 평균 연령 37.58세±9.69세의 총 31명의 선정기준과 제외기준에 부합하는 대상자가 인체 피부 일차자극 시험에 참여하였다.
- 등 부위에 시험물질을 도포하여 48시간 후 제거 하였고 첩포 제거 30분 후와 24시간 후를 관찰하여 Frosch & Kligman method에 의해 평가하였음.
- 첩포 농도 0.25%의 시험 결과 48시간 후 1명, 72시간 후 2명이 피부에서 경미한 자극을 나타 내었다.



〈그림 III-1-18. Glyceril Eicosapentaenoate의 MMP-1 억제 효능〉  
# p<0.05 vs normal group, \* p<0.05 vs vehicle group

## 2. 임상효능평가

### 1) 후보 화합물의 피부 안전성 평가

#### ○ 시험목적

- 본 시험은 극지유래 후보 화합물인 Eico glycerol (EG) 외 1 종의 인체피부에 대한 일차자극 유무를 확인하고자 PCPC 가이드라인 (2014) 및 주식회사 티마프로의 SOP 에 따라 시행하였다.

#### ○ 윤리적 수행

- 본 시험은 헬싱키 선언에 근거하여 주식회사 티마프로 기관생명윤리위원회로부터 윤리적, 과학적 타당성을 심의받아 피험자의 자발적 동의에 의해 윤리적 원칙에 따라 수행하였다.

- IRB 승인번호: 제1-220777-A-N-02호-DICN19108

- CRIS 임상연구 번호: PRE20190524-003

#### ○ 시험 대상자

- 피부질환이 없는 건강한 20세~60세의 여성 30명 이상을 대상으로 선정기준에 부합하고 제외기준에 부합하지 않는 피험자를 선정하였다.

- 선정된 피험자를 대상으로 시험의 목적과 방법 그리고, 이상반응을 설명하여 참여 의사를 보이는 자는 시험 참가 동의서를 작성하고 시험에 참여하도록 하였다.

#### 1) 선정기준

- ① 20~60세의 남성 또는 여성으로 피부 질환이 없는 건강한 지원자
- ② 시험에 앞서 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분히 설명을 듣고 자발적으로 서면동의서에 서명한 지원자
- ③ 시험기간 동안 실험에서 요구하는 사항에 협조하고 이상증상이 있으면 즉시 연락을 할 의향이 있는 지원자
- ④ 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 지원자

#### 2) 제외기준

- ③ 프로토콜에 따른 준수사항을 따르지 않은 경우
- ④ 추적관찰 실패 등 기타 시험자의 판단에 의해 시험수행에 지장이 있다고 생각되는 경우
- ⑤ 기타

#### 5) 피험자수에 대한 근거

- 피험자는 기능성 화장품 심사에 관한 규정의 특성시험법 7항 (1)인체 첩포 시험방법에 근거하여 30명 이상을 선정하여 시행하였다.

#### ○ 시험방법

#### 1) 시험재료

- ① Finn chambers® (SmartPractice, Denmark)
- ② Micropore tape (3M / Medical-Surgical Division, USA)
- ③ Microman M250 (Gilson, France)
- ④ Skin Marker (Chemotechnique Diagnostics AB, Sweden)

#### 2) 시험방법

- 본 시험은 시험대상자의 배정 및 병력조사를 통해 선정기준에 적합하고, 제외기준에 해당하지 않는 남성 또는 여성 30명 이상을 대상으로 실시하였다.  
- 시험부위인 등을 70% ethanol로 세척한 뒤 건조시키고 Finn chamber®를 사용하여 시험물질 15µl를 첩포 하였다. 48시간 후 첩포를 제거하고 20분 경과시 1차 평가, 24시간 경과시 2차 평가를 실시하였다.

#### 3) 평가기준

- 피부 일차자극 반응도는 다음과 같이 PCPC Guideline에 따라 평가하였다 (표 III-2-1).

- 20 -

- 21 -



- ① 임신, 수유 중이거나 임신 가능성이 있는 여성
- ② 한달 내에 아토피, 건선, 습진, 계절성 알레르기 등을 포함한 피부질환 경력이 있는 지원자
- ③ 시험 부위에 scoring을 방해할 수 있는 비정상적인 색소침착 등이 있는 지원자
- ④ 항염증약, 항히스타민제 및 면역억제제를 복용하고 있는 지원자
- ⑤ 시험참여 2주 내에 시험부위에 국소적인 항염증제를 사용한 적이 있는 지원자
- ⑥ 시험목적에 방해되는 피부질환이 있는 지원자
- ⑦ 자가면역질환이나 면역결핍질환 경력이 있는 지원자
- ⑧ 시험참여 1주 내에 면역치료를 받은 적이 있거나 현재 또는 시험기간 동안 치료 예정이 있는 지원자
- ⑨ 천식이나 당뇨 등 만성질환 치료를 받고 있는 지원자
- ⑩ 동시에 다른 시험에 참여하고 있거나 동일 시험에 참여하고 4주 이상 경과하지 않은 지원자
- ⑪ 첩포용 테이프에 자극이나 알러지가 있는 지원자

#### 3) 준수사항 및 제한사항

- ① 피험자는 첩포를 붙이고 있는 동안 시험부위(등)에 물이 닿지 않도록 하였다.
- ② 신체의 치료를 위한 약을 복용하거나 사용하는 경우 시험 담당자에게 통지하도록 하였다.
- ③ 제한사항을 성실히 이행하며 검사인정을 준수 하도록 하였다.
- ④ 시험기간 중 피험자에게 발생하는 모든 증상을 상세하고 빠짐없이 시험자에게 통보 하도록 하였다.

#### 4) 시험중단 및 탈락기준

- ① 갑작스런 사고, 질환의 병발, 임신 등으로 피험자가 임상시험 동의서를 자발적으로 철회한 경우
- ② 시험 중 시험물질에 의한 이상반응이 심각한 경우

- 22 -

- 23 -



표 III-2-1. Grading System for Skin Primary Irritation Test

Grade	Description of clinical observation
+1	Slight erythema
+2	Moderate erythema, possibly with barely perceptible edema at the margin, papules may be present
+3	Moderate erythema, with generalized edema
+4	Severe erythema with severe edema, with or without vesicles
+5	Severe reaction spread beyond the area of the patch

4) 결과판정

- 각 시험물질에 대한 자극반응 결과를 아래의 공식에 따라 평균 반응도를 계산하였다.
- 계산된 각 시험물질의 평균 반응도는 다음과 같이 판정하였다 (표 III-2-2).

$$\text{Response} = \frac{\sum (\text{Grade} \times \text{No. of Responders})}{4 (\text{Maximum grade}) \times n (\text{Total Subjects})} \times 100 \times 1/2$$

표 III-2-2. Determination Criteria for Skin Primary Irritation

Range of Response	Judgement
0.00 ≤ R < 0.87	None to Slight
0.87 ≤ R < 2.42	Mild
2.42 ≤ R < 3.44	Moderate
3.44 ≤ R	Severe

○ 시험결과

1) 피험자정보

- 본 시험은 제외기준 및 선정기준에 준하는 여성피험자 32명이 전과정에 참여하였다.
- 피험자들의 평균연령은 38.00±5.18세였으며 최고연령자는 49세, 최저연령자

는 25세였다.

2) 결과

- 시험결과, 본 시험물질 2종에서 자극 반응이 관찰되지 않았다 (표 III-2-3).

표 III-2-3. Results of human skin primary irritation test (n=32)

No	Test sample	No. of responder	48hr				72hr				Reaction Grade				
			+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4	48h	72h	Mean		
1	Eico glycerol(EG)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
2	대조군	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
3	Negative control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0



2) 후보 화합물의 주름개선 임상 평가

○ 시험목적

- 본 임상은 극지유래 후보화합물의 기능성화합물의 유효성평가를 위해 식약처 가이드라인에 따라 주름이 생성되기 시작하거나 이미 생성된 여성을 대상으로 12 주간 시험제품을 사용하게 하여 제품의 주름개선 효능을 평가하였다.

○ 윤리적 수행

- 본 시험은 헬싱키 선언에 근거하여 주식회사 더마프로 기관생명윤리위원회로부터 윤리적, 과학적 타당성을 심의받아 피험자의 자발적 동의에 의해 윤리적 원칙에 따라 수행하였다.
- IRB 승인번호: 제1-220777-A-N-02호-DICN19106
- CRIS 승인번호: KCT0004021

○ 시험제품

- 관리자는 시험제품을 피험자가 내용물의 차이를 인식할 수 없도록 동일한 제형, 동일한 용기에 제공받은 후 독립적으로 시험제품 관리실에서 시험코드 라벨 작업을 수행하였으며, 시험자는 블라인드 상태로 시험제품 관리자로부터 시험제품을 제공받아 피험자에게 지급하여 이중맹검으로 수행하였다.
- 또한, 블록 무작위 배정 (Block Randomization) 방법을 이용하였으며, SSPP, SPSP, SPPS, PPSP, PPS, PSSP인 블록 무작위 배정표를 생성하여 피험자에게 제공, 선택하도록 하여 시험제품 S 또는 P를 12 주간 사용하도록 하였다.

○ 제품명

- Eico glycerol (EG) (Lot no. KOPRI KIOM2019 (EG))
- (1) 시험군 (P): 1-icosapentaenoyl glycerol 0.1% 함유
- (2) 대조군 (S): 1-icosapentaenoyl glycerol 미함유
- 제품의 색상: 백색의 크림상
- 제품의 보관: 실온
- 제품의 유효성분: 1-icosapentaenoyl glycerol 0.1%

- 제품의 사용방법: 12주 동안 1 일 2 회(아침, 저녁) 세안 후 스킨 , 로션 다음 단계에서 시험제품과 대조제품을 블록 무작위 배정(block randomization)에 따라 앞면 좌, 우측 정해진 부위(눈가)에 사용하도록 하였다.

○ 시험 대상자

- 주름이 생성되기 시작하거나 이미 생성된 30세~65세의 남성 또는 여성 20명 이상을 대상으로 피험자의 선정기준에 부합하고 제외기준에 부합하지 않는 피험자를 선정하였다.
- 선정된 피험자를 대상으로 시험의 목적과 방법 그리고 기대 효과와 이상반응을 설명하여 참여 의사를 보이는 자는 시험 참가 동의를 작성하고 시험에 참여하도록 하였다.

1) 선정기준

- ① 30~65세의 성인 남녀로 주 시험자의 판단에 따라 시험부위에 주름을 가지고 있는 자
- ② 피부질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- ③ 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분히 설명을 듣고 자발적으로 시험 동의서에 서명한 지원자
- ④ 시험 기간 동안 추적 관찰이 가능한 자

2) 제외기준

- ① 임신, 수유 중이거나 임신 가능성이 있는 여성
- ② 피부질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부외용제를 1개월 이상 사용하는 경우
- ③ 동일한 시험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않는 경우
- ④ 민감성, 과민성 피부를 가진 경우
- ⑤ 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상조건이 있는 경우
- ⑥ 시험시작 3개월 이내에 시험부위에 동일 또는 유사한 화장품 또는 의약품을 사용한 경우
- ⑦ 시험부위에 시술 피부 박피술, 보톡스, 주름제거 시술, 기타 피부관리 등을 받았거나 6개월 이내에 계획한 경우

- ⑥ 만성 소모성 질환이 있는 경우 천식, 당뇨, 고혈압 등
  - ⑦ 그 외 주 시험자의 판단으로 시험이 곤란하다고 판단되는 경우
- 3) 준수사항 및 제한사항
- ① 피험자는 시험기간 동안 기능성을 표방하고 있는 화장품 혹은 의약품의 사용을 중지한다.
  - ② 피험자는 시험기간 동안 일상생활에서 보다 많은 수준의 태양광선에 노출을 피하도록 하며, 외출 시 선크림을 반드시 사용하도록 한다.
  - ③ 피험자는 시험제품을 혼동하여 바르지 않도록 유의하며, 제품 도포를 거르지 않도록 한다.
  - ④ 피험자는 시험기간 동안 시험제품 이외의 사용하는 기초제품은 변경하지 않는다.
  - ⑤ 피험자는 시험기간 중 피험자에게 발생하는 모든 증상을 상세하고 빠짐없이 시험자에게 보고 하도록 한다.
  - ⑥ 피험자는 시험기간 동안 제품의 사용방법과 제한사항을 성실히 이행하며 검사일정을 준수하도록 하며, 방문 시마다 제품 사용확인서와 사용중인 시험제품을 시험자에게 확인 받도록 한다.
  - ⑦ 피험자는 평가 12 시간 전에는 화장을 금하도록 한다.
  - ⑧ 피험자는 시험기간 동안 일상생활을 크게 벗어난 활동을 하지 않도록 한다
- 4) 시험중단 및 탈락기준
- ① 갑작스런 사고, 질환의 병발, 임신 등으로 피험자가 임상시험 동의서를 자발적으로 철회한 경우
  - ② 시험 중 시험물질에 의한 이상반응이 심각한 경우
  - ③ 프로토콜에 따른 준수 사항을 따르지 않은 경우
  - ④ 추적관찰 실패 등 기타 시험자의 판단에 의해 시험수행에 지장이 있다고 생각되는 경우
  - ⑤ 지나친 음주, 흡연 및 과도한 자외선 노출을 한 경우
- 5) 피험자 수에 대한 근거
- ① 피험자 수는 식약처 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인 II (2005)에 준하여 20명 이상을 선정하여 시험을 시행하였다.

- 시험방법
- 평가는 제품 사용 전과 사용 4 주 , 8 주 및 12 주 후 시험에서 육안평가, 피부주름 파라미터 측정, 피험자에 의한 설문평가 및 시험자의 관찰과 문진을 통해 평가하였다.
  - 모든 피험자는 방문 시마다 시험부위를 세척한 다음에 항온항습실 (22±2℃, 50±5%) 에 입실 하였으며 30분 동안 안정을 취한 후 시험에 참여하였다.
- 1) 피부주름 의 육안평가
- 육안평가는 양측 눈가의 주름 상태에 대해 주름평가 기준에 의거 2 인의 시험자가 일정한 조명하에 독립적으로 평가하였다.
  - 각 평가시점마다 주름 상태의 등급을 10 단계 (0.5 점 단위)로 기록하고, 시험자 2 인의 평균값을 분석하였다 (표 III-2-4).



표 III-2-4. Visual assessment by using modified Danielle' s criteria

Grade	Description Criteria
0	피부에 주름이 없으며 피부 결이 섬세하다.
1	피부에 얇은 주름이 보이기 시작한다.
2	피부에 얇은 주름이 보인다.
3	얇은 주름이 많거나 보통 주름이 보이기 시작한다.
4	피부에 보통주름이 보인다.
5	보통주름이 있으나 깊은 주름은 보이지 않는다.
6	보통주름이 많거나 깊은 주름이 보이기 시작한다.
7	피부에 깊은 주름이 보인다.
8	피부에 깊은 주름이 많다.
9	피부에 깊은 주름이 매우 많다.

\*평가는 0.5점 단위로 진행함.

- 2) 레플리카를 이용한 주름 파라미터 평가
- 피부주름은 각 평가시점에서 Visioline® VL650 (C+K, Germany 및 Quantiride® (Monaderm, Monaco)를 이용하여 피부 레플리카 이미지를 분석하여 평가하였다.
  - 이 측정기는 제작한 SILFLO 레플리카 기기내의 frame에 장착하고, 레플리카에 35°의 각도로 빛을 투과시켜 이미지를 촬영 하였다.
  - 촬영된 이미지는 녹색으로 그림자가 마크되며, 자동적으로 수치화하여 5 가지의 주름 파라미터 Skin roughness Rt, Maximum roughness Rm, Average roughness Rz, Smoothness depth Rp, Arithmetic Average roughness Ra를 분석하였다 (표 III-2-5).

표 III-2-5. Diagram and definition of wrinkle parameters

파라미터	기준에 대한 설명
	<b>Skin Roughness Rt:</b> 프로필의 가장 높은 지점과 가장 낮은 지점간의 거리
	<b>Maximum Roughness Rm:</b> 균분된 영역의 Rt 중 최고 값
	<b>Average Roughness Rz :</b> 프로필을 연속적으로 5개의 길이로 균분한 다음 각 영역에서의 Rt 값의 산술 평균
	<b>Smoothness Depth Rp :</b> 프로필의 가장 꼭대기 값에서 수평선을 그어 프로필과 이루는 면적을 적분하여 중간선의 길이로 나눈 값으로서 피부 주름의 평균 깊이를 의미
	<b>Arithmetic Average Roughness Ra:</b> 프로필의 중간선과 프로필이 이루는 면적을 적분하여 프로필의 중간선의 길이로 나눈 값으로서 피부의 평균 거칠기를 의미

3) 사진촬영

- 각 평가 시점에서 안면 피부 촬영장치 VISIA®CR, Canfield, USA)를 이용하여 안면 좌, 우 측면을 촬영하였다.

4) 설문평가

- 제품의 효능에 관한 설문은 제품 사용 4 주, 8 주 및 12 주 후 평가 시점에서 피험자로 하여금 5 점 척도 (1, 매우 그렇지 않다; 2, 그렇지 않다; 3, 변화 없음; 4, 그렇다; 5, 매우 그렇다) 설문을 작성하도록 하였다.  
 - 또한 제품 사용성에 관한 설문은 제품 사용 12 주 후 평가시점에서 5 단계 척도 (1, 매우 좋지 않다/매우 그렇지 않다; 2, 좋지 않은 편이다/그렇지 않은 편이다; 3, 보통이다; 4, 좋은 편이다/그런 편이다; 5, 매우 좋다/매우 그렇다)로 실시하여, 긍정적인 답변(4, 5)을 분석하였다

○ 통계분석

- 모든 데이터는 SPSS Package Program (IBM, 을 이용하여 통계적 유의성을 검증하고, 육안평가의 경우 시험자간 Intraclass correlation coefficient (ICC) value 가 0.8 이상이면 시험자간의 신뢰도를 인정하여 평균값을 적용하여 분석 하였다.  
 - 정규성은 Shapiro-Wilks test 및 첨도 (kurtosis)와 왜도 (skewness)를 통해 검증하였고 (첨도와 왜도의 경우 ±2 이내일 경우 정규성으로 인정) 사진 동질성은 paired t-test 를 통해 검증하였다.  
 - 구간 비교 및 시점별 전후 변화를 확인하기 위해 반복측정 분산분석법 (Repeated Measures ANOVA)을 적용하였다.  
 - 효능 및 사용성 설문평가는 두 군의 비모수적 평균값을 비교하기 위해 Chi-Square test를 사용하였고, 기대빈도가 5보다 작은 셀이 전체의 20% 이상인 경우 Fisher's exacttest를 적용하였다.  
 - 모든 데이터의 통계학적 유의수준은 p 값이 0.05 미만으로 설정하였고, 증감률은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{증감률(\%)} = \frac{[(\text{제품사용전 측정값} - \text{제품사용후 측정값})]}{\text{제품사용전 측정값}} \times 100$$

○ 시험결과

1) 피험자 정보

- 제외기준 및 선정기준에 준하는 38세~56세 (평균 연령 49.88±4.34세) 여성 피험자 24 명이 참여하여 시험 종료 시 까지 전 과정을 성실히 수행하였다.  
 - 피험자의 정보는 설문에 의해 조사되었으며, 분석 결과는 다음과 같다 (표 III-2-6).

표 III-2-6. Information of subjects

Item	Classification	Frequency (N)	Percentage (%)
연령	30대	1	4.17
	40대	7	29.17
	50대	16	66.67
피부타입	건성	10	41.67
	중성	8	33.33
	지성	2	8.33
	건지성	4	16.67
	문제성피부	0	0.00
수분	촉촉	0	0.00
	보통	11	45.83
	부족	13	54.17
유분	번들거림	2	8.33
	보통	12	50.00
	부족	10	41.67
표면 상태	부드러움	5	20.83
	보통	15	62.50
	거침	4	16.67
피부 두께	얇은 편	10	41.67
	보통	11	45.83
자외선 노출시간	두꺼운 편	3	12.50
	1시간 이내	11	45.83



수면시간	1~3시간	13	54.17
	3시간 이상	0	0.00
	5시간 이하	0	0.00
	5~8시간	23	95.83
	8시간 이상	1	4.17
흡연 유무	안 권	24	100.00
	10개피 이내	0	0.00
자극 감수성	10개피 이상	0	0.00
	예	0	0.00
따가움 감수성	아니오	24	100.00
	예	0	0.00
이상반응 경험	아니오	24	100.00
	예	0	0.00

2) 피부주름의 육안평가 분석

(1) 각 시점별 전후 변화 비교

- 분석 결과, 시험군의 경우 제품 사용 8 주 및 12 주 후 시점에서 피부주름이 유의하게 감소 하였으며 (p<0.05), 감소율은 각각 3.41% 및 2.39%였다 (그림 III-2-1).

(2) 각 시점별 구간 비교

- 분석 결과, 제품 사용 8 주 및 12 주 후 시점에서 시험군의 피부주름이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (p<0.05, 그림 III-2-1).

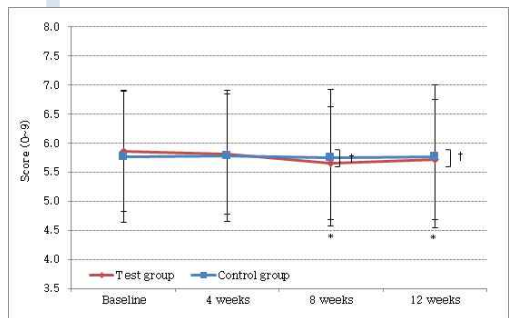


그림 III-2-1. Changes of visual assessment following 12 consecutive weeks application of test and control products (Mean±SD, \*p<0.05 after vs. baseline, †p<0.05 test vs. control group)

3) 레플리카를 이용한 주름 파라미터 분석

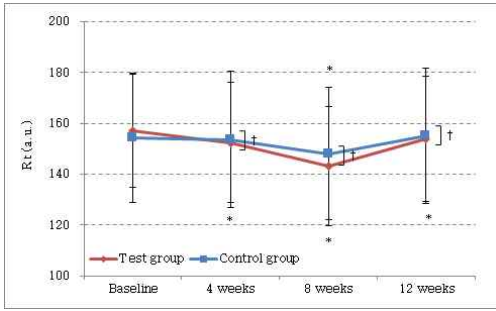
(1) 각 시점별 전후 변화 비교

- 분석 결과, 시험군의 경우 Rt 및 Rp 파라미터가 제품 사용 4 주, 8 주 및 12 주 시점에서, Rm 및 Rz 파라미터가 제품 사용 4 주 및 8 주 후 시점에서, Ra 파라미터가 제품 사용 8 주 후 시점에서 유의하게 감소하였으며 (p<0.05), 감소율은 2.17%~15.86%였다.

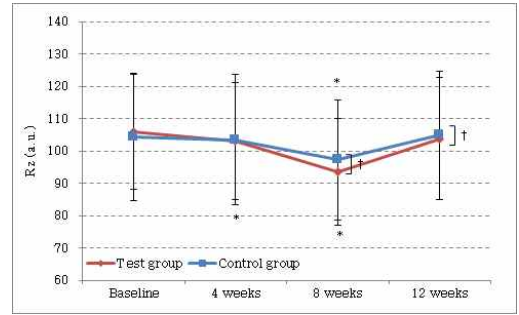
- 대조군의 경우 Rt, Rm, Rz 및 Ra 파라미터가 제품 사용 8 주 후 시점에서 유의하게 감소하였으며 (p<0.05), 감소율은 4.10%~9.13%였다 (그림 III-2-2~6).

(2) 각 시점별 구간 비교

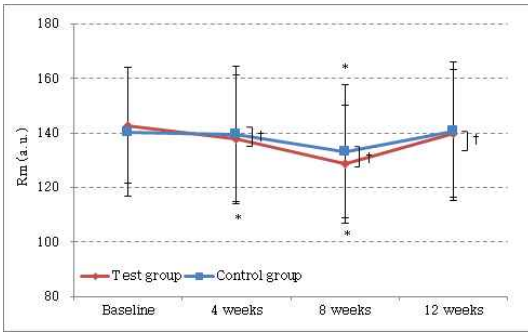
- 분석 결과, Rt 및 Rm 파라미터가 제품 사용 4 주, 8 주 및 12 주 시점에서, Rp 파라미터가 제품 사용 4 주 및 8 주 후 시점에서, Rz 및 Ra 파라미터가 제품 사용 8 주 및 12 주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 유의하게 감소 하였다 (p<0.05, 그림 III-2-2~6).



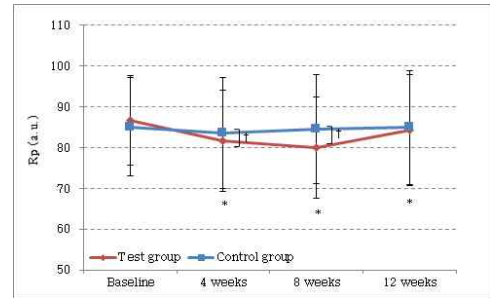
〈그림 III-2-2. Changes of Skin roughness Rt following 12 consecutive weeks application of test and control products (Mean±SD, \*p<0.05 after vs. baseline, †p<0.05 test vs. control group)〉



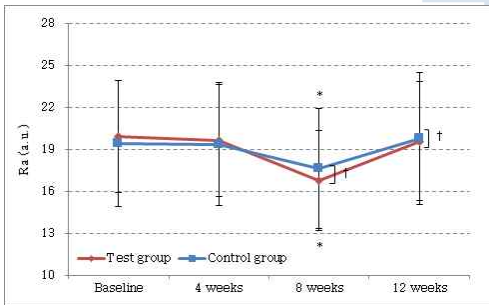
〈그림 III-2-4. Changes of Average roughness Rz following 12 consecutive weeks application of test and control products (Mean±SD, \*p<0.05 after vs. baseline, †p<0.05 test vs. control group)〉



〈그림 III-2-3. Changes of Maximum roughness Rm following 12 consecutive weeks application of Test and control products (Mean±SD, \*p<0.05 after vs. baseline, †p<0.05 test vs. control group)〉



〈그림 III-2-5. Changes of Smoothness depth Rp following 12 consecutive weeks application of test and control products (Mean±SD, \*p<0.05 after vs. baseline, †p<0.05 test vs. control group)〉

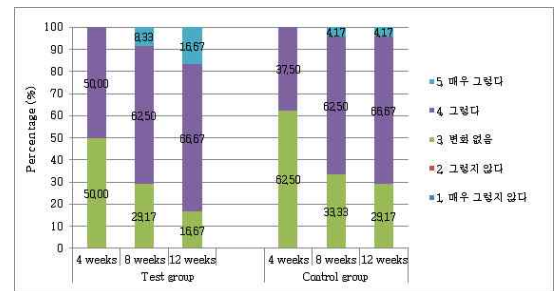


〈그림 III-2-6. Changes of Arithmetic Average roughness Ra following 12 consecutive weeks application of test and control products (Mean±SD, \*p<0.05 after vs. baseline, †p<0.05 test vs. control group)〉

4) 설문평가 분석

(1) 효능에 관한 설문평가

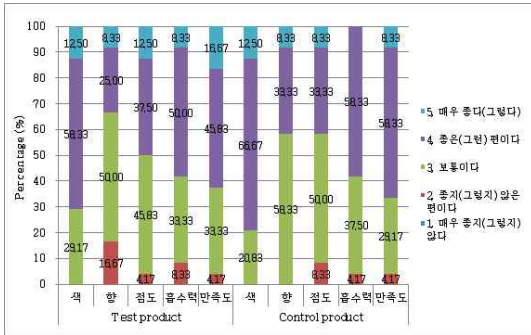
- 평가 결과, '눈가 (잔)주름이 개선됨' 항목에 대해 시험군은 제품 사용 4주, 8주 및 12주 후 시점에서 약 50%~83%, 대조군은 제품 사용 8주 및 12주 후 시점에서 약 67%~71%가 긍정적으로 응답하였으며, 모든 시점에서 군 간 유의차는 없었다 (그림 III-2-7).



〈그림 III-2-7. Comparative sensorial profile of test and control groups for efficacy (Percentage, %)〉

(2) 제품 사용성에 관한 설문평가

- 평가 결과, 시험군은 '색', '점도', '흡수력' 및 '만족도' 항목에 대하여 피험자의 약 50%~71%가, 대조군은 '색', '흡수력' 및 '만족도' 항목에 대하여 피험자의 약 58%~79%가 긍정적으로 응답하였고, 모든 항목에서 중간 유의차는 없었다 (그림 III-2-8).



〈그림 III-2-8. Comparative sensorial profile of test and control products for usability (Percentage, %)〉

인체시험결과 소견서

1. 제품명: Eico glycerol (EG)  
 2. 평가기간: 2019년 06월 03일 ~ 2019년 8월 29일  
 3. 시험결과  
 본 시험제품에 대한 피부주름 개선효과 평가 결과, 육안평가 및 5종의 주름 파라미터(Rt, Rm, Rz, Rp, Ra)에서 유의한 개선효과를 보였고, 모든 피험자에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않았다.  
 한국한의학연구원에서 의뢰한 Eico glycerol (EG)은 피부주름 개선에 도움을 주는 제품으로 판단된다.

시험책임자: 의학박사 고재숙 (인)  
 피부과 전문의: 의학박사 신민경 (인)



IV. 연구개발 목표 달성도

세부연구목표	달성 내용	달성도(%)
효능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>In vitro에서 피부보호 효능평가</li> <li>극지시료 스크린을 통한 효능소재 도출</li> <li>노화관련 인자 평가</li> <li>피부세포 보호효능 평가</li> </ul>	100
ICID 등재	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료의 ICID 등재</li> <li>KOPRI-KIOM Eico glycerol</li> <li>INCI 명칭 : Glyceryl Eicosapentaenoate</li> <li>*ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary): 미국화장품협회(CTFA)에서 발행하는 화장품원료사전으로 화장품과 퍼스널케어에 사용가능한 원료리스트를 제공</li> </ul>	100
임상시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>승인번호 IRB</li> <li>제1-220777-A-N-02호-DICN19106</li> <li>CRIS 번호</li> <li>KCT0004021</li> <li>인체시험평가</li> <li>주름파라미터의 중간비교에 따른 효능검증 (Rt, Rm, Rp, Rz, Ra)을 통한 유의성있는 효능 확인</li> <li>피부독성 평가</li> <li>피부자극테스트를 통한 안전성 확인</li> </ul>	100
해당 기술 권리성 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>발명의 명칭</li> <li>Eico glycerol을 유효성분으로 함유하는 주름개선용 조성물</li> <li>발명 요지</li> <li>Eico glycerol을 유효성분으로 함유하는 주름개선용 조성물로 피부 주름 육안평가, 피부주름 파라미터 측정을 통해 주름개선 효능을 확인하였으며, 자외선 조사에 의해 증가된 MMP-1 발현을 감소시키는 효과가 나타났다.</li> <li>출원번호</li> <li>10-2019-0164076</li> <li>출원일자</li> <li>2019.12.10</li> </ul>	100

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 상용화 전략

1) 수요기업 발굴을 위한 기술마케팅 수행

- 산업계 수요 접수 시 기술이전의향서 제출기업과 지속적인 기술협상 진행 및 의견 수렴
- 국내·외 기술설명회에 참석하여 기술발표 및 수요기업과의 1:1상담을 통해 수요기업 발굴
- (국내) 바이오코리아, 인터비즈, 자체기술설명회, NTB기술사업화 등 (해외) IP 로드쇼, bio-europe, cosmoprof 등
- 외부 전문기관을 활용한 온·오프라인 마케팅을 통해 지속적인 수요기업 발굴 및 협상 진행
- 동 기술 관련 분야인 화장품·건강기능식품 위주의 수요기업을 대상으로 타겟 마케팅 시행
- 기관 자체·외부 전문기관의 수요기업 DB를 활용하여, 화장품 및 건강기능식품 중심의 잠재 수요기업 선정
- 선정된 수요기업 대상 타겟마케팅 시행 결과, 즉시 관심을 보이는 '유망기업'과 향후 이전 가능성이 있는 '향후가망기업' 발굴

2) 사업화 성공률 제고를 사업화 Risk Factor 및 관련 Hedge안 수립

- 동 기술에 대한 국내·외 선행기술 조사 시행 및 권리성 확보·강화 방안 수립
- 시장에 있는 경쟁제품 추가 검토 및 차별화 방안 검토
- 소재·제품에 대한 대량생산을 위한 제조공정 구축 방안 수립

3) 상용화 관련 R&D 연계를 위한 사업화사업 탐색·발굴 지원

- 수요기업의 사업화 R&D 지원을 위해 동 기술에 적합한 외부 상용화R&BD 사업 탐색 및 발굴
- 상용화R&BD사업 제안을 포함하는 기술홍보 추가 시행
- 관심기업들의 기업 재무정보, 사업화 목표·역량, 주요계약 조건 등을 기반으로 상용화R&BD사업 수행을 위한 수행기업 선정 및 사업 신청·수주

#### 4) 기술이전 체결

- 주요계약 조건을 기반으로 계약 관련 세부 사항 협상 후 최종 기술이전계약 체결

- 44 -



편집순서 8

뒷 면

patch tests in 7,440 Korean women during 12 years. *Int J Cosmet Sci.* 2014 36(1): 62-7.

(15) Loretz LJ. Safety Evaluation Guidelines. Personal Care Products Council 2014.

(16) Valerie T. Politano, Anne Marie Api. The research institute for fragrance materials' human repeated insult patch test protocol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2008 35 - 38

(17) Daniell HW. Smoker's wrinkles. A study in the epidemiology of "crow's feet". *Ann Intern Med.* 1971, 75, 873-80.

(18) Akazaki Sandmokawa G. Mechanical methods for evaluating skin surface architecture in relation to wrinkling. *J Dermatol Sci.* 2001, 27, 1:S5-10.

(19) Lemperle G, Holmes RE, Cohen SR and Lemperle SMA. Classification of facial wrinkles. *Plast Reconstr Surg.* 2001, 108, 1735-50; discussion 1751-2.

- 46 -

#### VI. 참고문헌

(1) Frosch PJ, Kligman AM. The soap chamber test. A new method for assessing the irritancy of soaps. *J Am Acad Dermatol.* 1979 1(1):35 - 41.

(2) Fisher T, Maibach HI. Finn chamber patch test technique. *Contact dermatitis.* 1984 11(3): 137-40.

(3) Francis NM, Maibach HI. *Dermato toxicology* (4th ed). Hemisphere Publishing Corporation, New York. 1991 143-452.

(4) James GM, Vincent AD. Patch testing. *Contact and occupational dermatology.* St. Louis: Mosby Year Book. 1992 30-49.

(5) Doooms-Goossens A. Patch testing without a kit. 1995 In: Guyin JD (ed) *Practical contact dermatitis.* McGraw-Hill, New York, 63-74.

(6) Walker AP, Basketter DA, Baverel M, Diembeck W, Matties W, Mouglin D, Paye M, Rothlisverger R, Dupuis J. Test guidelines for assessment of skin compatibility of cosmetic finished products in man. Task Force of COLIPA. *Food Chem Toxicol.* 1996 34(7): 651-60.

(7) Basketter DA, Chamnerlain M, Griffiths HA, Rowson M, Whittle E, York M. The classification of skin irritants by human patch test. *Food Chem Toxicol.* 1997 35(8): 845-52.

(8) Bourke J, Coulson I, English J. Guidelines for care of contact dermatitis. *Br J Dermatol.* 2001 145(6): 877-85.

(9) Devos SA, Van Der Valk PG. Epicutaneous patch testing. *Eur J Dermatol.* 2002 12(5): 506-13.

(10) Kim E, Maibach HI. Changing paradigms in dermatology: science and art of diagnostic patch and contact urticaria testing. *Clin Dermatol.* 2003 21(5): 346-52.

(11) 기능성 화장품 심사에 관한 규정. 개정: 2017. 5. 23 식품의약품안전처 고시 제 2017-42호.

(12) 기능성화장품의유효성평가를 위한가이드라인(II). 2005.07. 식품의약품안전처

(13) 기능성화장품 심사에 관한 규정 일부 개정고시. (제2015-14호). 식품의약품안전처

(14) An SM, Ham H, Choi EJ, Shin MK, An SS, Kim HO, Koh JS. Primary irritation index and safety zone of cosmetics: Retrospective analysis of skin

- 45 -

#### 주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 협동과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 협동연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

- 47 -