(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 10 월 30 일 (30.10.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/175678 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/704 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003596

(22) 국제출원일: 2014 년 4 월 24 일 (24.04.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0045119 2013 년 4 월 24 일 (24.04.2013) KR

(71) 출원인: **주식회사 아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION)** [KR/KR]; 140-777 서울시 용산구 한강대로 106, Seoul (KR).

(72) 발명자: **김동현 (KIM, Dong Hyun)**; 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR). **류권렬 (RYU, Kwon Real)**; 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR). **이옥찬 (LEE, Ok Chan)**; 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR). **염명훈 (YEOM, Myeong Hun)**; 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR). **조준철 (CHO, Jun Cheol)**; 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **윤동열 (YOON, Dong Yol)**; 153-803 서울시 금천구 가산디지털 1 로 226 에이스 하이엔드타워 5 차 3 층 윤앤리 특허법률사무소, 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, LT, 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.

(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, 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))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

WO 2014/175678 A1

(54) **Title**: TOPICAL COMPOSITION FOR SKIN CONTAINING GINCENOSIDE RG3

(54) **발명의 명칭** : 진세노사이드 RG3 를 함유하는 피부 외용제 조성물

(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition containing, as an active ingredient, gincenoside Rg3, for providing effects such as improvement of acne and skin troubles, skin clearing, pore tightening, in addition to providing effects such as skin tone improvement, hair growth promotion, improvement of graying hair, anti-dandruff, and antisepsis.

(57) **요약서**: 본 발명은 여드름 및 피부 트러블개선 효과, 피부 수렴 및 모공수축 효과도 제공할 수 있으며 피부 혈색 개선의 효과, 육모증진, 백모개선, 항비듬 및 방부효과를 제공할 수 있는, 유효성분으로 진세노사이드 Rg3 를 함유하는 조성물에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 진세노사이드 RG3를 함유하는 피부 외용제 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 진세노사이드 Rg3를 함유함으로써 여드름 및 피부 트러블개선 효과, 피부 수렴 및 모공수축 효과도 제공할 수 있으며 피부 혈색 개선의 효과, 육모증진, 백모개선, 항비듬 및 방부효과를 제공할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 인간의 피부는 인체의 일차 방어막으로서 온도 및 습도의 변화, 자외선, 공해물질과 같은 외부 환경의 자극으로부터 체내의 기관을 보호해 주는 기능을 하며, 나이가 들어감에 따라 여러 가지 내적, 외적 요인에 의해 변화를 겪는다. 즉, 내적으로는 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 세포들의 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되며, 외적으로는 오존층 파괴로 인하여 태양 광선 중 지표에 도달하는 자외선의 함량이 증가하고 환경 오염이 더욱 심화됨에 따라 자유 라디칼 및 활성 유해 산소 등이 증가함으로써, 피부의 두께가 감소하고, 주름이 증가하며, 탄력이 감소될 뿐 아니라 피부 혈색도 칙칙해지고, 피부 트러블이 자주 발생하며, 기미와 주근깨 및 검버섯 또한 증가하고, 혈색이 나빠지고 피부톤도 어두워지는 등 여러 가지 변화를 일으키게 된다.

[3] 이러한 피부 내적 및 외적 요인에 의한 피부 상태의 변화를 방지하고, 건강한 피부 상태를 유지하기 위해서 기존에 알려진 각종 동물, 식물, 미생물 등으로부터 얻은 생리 활성 물질들을 화장품에 부가하여 사용함으로써 피부 상태를 개선시키기 위한 노력이 있어 왔다.

[4] 진세노사이드(Ginsenoside)는 인삼에 있는 사포닌을 일컫는 말인데, 사포닌은 화학적으로 배당체(配糖體: glycoside)라 부르는 화합물의 일종이다. 진세노사이드는 타 식물 사포닌과 구별하기 위해서 인삼(ginseng)에서 분리된 배당체(glyco-side)란 의미로 붙여진 이름이다. 이는 보통 진세노사이드-Rx(ginsenoside-Rx) 등으로 명명된다. 여기서, “R”은 뿌리(Radix 혹은 Root)라는 뜻이고 “x”는 TLC상에 나타나는 스팟(spot)의 이동 거리(Rf값)에 따라 아래쪽에서부터 위쪽으로 o, a, b, c, d, e, f, g 및 h 등의 순서로 이름을 붙인 것이다. 인삼사포닌은 중추신계를 비롯하여 내분비계, 면역계, 대사계 등에 영향을 미쳐 신체 기능 조절에 다양한 효과를 발휘한다. 지금까지 고려 인삼(홍삼 포함)으로부터 30여종 이상의 진세노사이드가 분리 동정되었고, 각각의 진세노사이드의 약리작용이 속속 밝혀지고 있다. 이들 진세노사이드들은 서로 비슷한 작용을 하거나 또는 서로 반대되는 작용을

나타내기도 한다. 예를 들면, 중추신경계에 대해 PPD계 사포닌의 대표적인 진세노사이드인 G-Rb1은 억제적 효과를 나타내고, PPT계 사포닌의 대표적인 G-Rg1은 촉진적 효과를 가지고 있다.

[5] 인삼 사포닌은 사포닌 아글리콘(Aglycon)의 구조에 따라서 파낙사디올계 진세노사이드(Panaxadiol-type Ginsenosides : Ra1, Ra2, Ra3, Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Rg3), 파낙사트리올계 진세노사이드(Panaxatriol-type Ginsenosides : Re, Rf, Rgl, Rg2), 올레아노르산류 진세노사이드(Oleanolic acid-type Ginsenosides) 등 세 가지로 분류될 수 있다. 인삼뿌리에서의 파낙사디올계 사포닌 함량은 48 ~ 60%로 가장 많고 다음으로 파낙사트리올계 사포닌이 30 ~ 35%를 차지하고 있고 올레아놀린산류 사포닌은 미량 함유되어 있다.

[6] 이러한 인삼의 증삼과정에서 생성된 마이너 진세노사이드의 일종인 Rg3에 관한 약리학적 작용으로는 암세포전이 억제작용, 혈소판응집억제작용 및 항혈전작용, 혈관이완작용, 실험적 간상해 억제작용, 항암제의 내성억제작용 등 경구용 약리작용에 관한 특허가 있으나, 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 하는 조성물의 여드름 및 피부 트러블개선 효과, 피부 수렴 및 모공수축 효과, 피부 혈색 개선의 효과, 육모증진, 백모개선, 항비듬 및 방부효과에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 이에 본 발명자들은 진세노사이드 Rg3가, 여드름 및 피부 트러블개선 효과, 피부 수렴 및 모공수축 효과도 제공할 수 있으며 피부 혈색 개선의 효과, 육모증진, 백모개선, 항비듬 및 방부효과를 제공할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[8] 따라서, 본 발명의 목적은 진세노사이드 Rg3를 함유하여 여드름 및 피부 트러블개선 효과, 피부 수렴 및 모공수축 효과도 제공할 수 있으며 피부 혈색 개선의 효과, 육모증진, 백모개선, 항비듬 및 방부효과를 나타내는 피부 외용제 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 함유하는 여드름 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

[10] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 함유하는 혈색 및 피부톤 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

[11] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 함유하는 모공 축소용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Rg3를 함유하는 모발 성장 촉진용 조성물을 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Rg3를 함유하는 백모 방지용 조성물을

제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Rg3를 함유하는 항비듬용 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Rg3를 함유하는 천연 방부제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

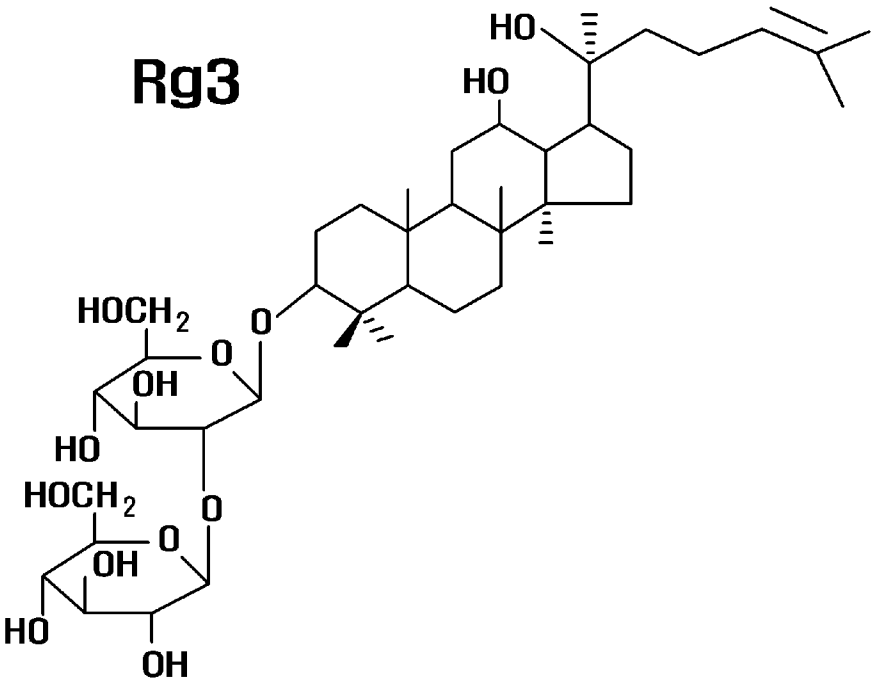
[16] 본 발명의 조성물은 진세노사이드 Rg3를 함유함으로써 여드름 및 피부 트러블개선 효과, 피부 수렴 및 모공수축 효과도 제공할 수 있으며 피부 혈색 개선의 효과, 육모증진, 백모개선, 항비듬 및 방부효과를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[17] 본 발명에 의한 조성물은 진세노사이드 Rg3(Ginsenoside Rg3)를 유효성분으로 함유한다.

[18] 본 발명에서 사용되는 진세노사이드 Rg3는 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

[19] 화학식 1



[20] 본 발명의 진세노사이드 Rg3는 식물에서 추출될 수 있고, 당업계에 공지된 방법에 따라 합성하여 사용할 수도 있으며, 상업적으로 시판되는 것을 사용할 수도 있다. 또한 진세노사이드 Rg3는 인삼 추출물에서 수득할 수 있다. 이 때 사용되는 인삼의 종류는 특히 제한되지 않고, 수삼, 홍삼, 백삼, 태극삼, 미삼 등을 사용할 수 있다. 또한 상기 인삼 추출물은 인삼으로부터 침출, 전출하여 얻은 침출액 뿐 아니라 침출액을 다시 일부 또는 전부 농축하여 얻은 농축물 또는 상기의 농축물을 다시 건조시켜 제조한 침체, 전제, 정기, 유동엑기스 및 인삼 중에 함유되어 주 효과를 발휘하는 화학 물질은 물론 식물 그 자체를 모두 포함하며, 줄기, 뿌리, 잎, 꽃, 열매 등 인삼의 모든 부분으로부터의 추출물이

사용가능하고 어느 특정 부분의 추출물로 한정되지 않는다. 또한 인삼 추출물로부터 진세노사이드 Rg3를 추출하는 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.

[21] 구체적으로 상기 진세노사이드 Rg3는 인삼에서 당업계에 잘 알려진 방법으로 물 또는 유기용매로 인삼 추출물을 제조한 후, 이로부터 분리할 수 있다. 본 발명에 사용하는 유기용매는 에탄올, 메탄올, 부탄올, 에테르, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 이들 유기용매와 물의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 80% 에탄올을 사용한다. 이때, 추출온도는 10~80℃가 바람직하며, 3~24시간 동안 추출할 수 있다. 상기 추출온도 및 추출시간을 벗어나면 추출 효율이 떨어지거나 성분의 변화가 생길 수 있다.

[22] 본 발명의 조성물은 상기 진세노사이드 Rg3를 조성물 총 중량에 대하여 0.001~50중량%의 양으로 함유하는 것이 바람직하다. 이는 상기 유효성분의 함량이 0.001중량% 미만이면 상기 성분에 의한 효능, 효과가 미약하고, 50중량%를 초과하면 피부 안전성 또는 제형상의 문제가 있기 때문이다.

[23] 본 발명의 조성물은 여드름 개선용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 항균 효과, 특히 여드름 원인균에 대한 항균 효과가 우수하며, 또한 항염 효과를 제공한다.

[24] 본 발명의 조성물은 혈색 및 피부톤 개선용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 피부에 적용 시 모세혈관을 확장시키고 혈액순환을 촉진시킴으로써 피부에 영양분을 원활하게 공급하고 피부 노화를 억제시켜 혈색 및 피부톤 개선 효과가 탁월하다.

[25] 본 발명의 조성물은 모공 축소, 피지 조절 및 피부 트러블 개선용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 피부에 적용 시 과잉으로 분비되는 피지를 억제하고, 활성 산소 제거와 콜라겐 합성을 촉진하여 모공을 축소시키며, 염증 인자의 발현 감소로 피부 트러블을 억제하는 효과가 탁월하다.

[26] 본 발명의 조성물은 모발 성장 촉진용 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 휴지기 모발주기의 성장기 모발주기로의 이행을 촉진시킴으로써 모발의 생장을 촉진하고 또한 새로운 모발의 생성을 촉진하는 것뿐만 아니라 기존 모발이 건강하게 자라도록 하는 것을 포함하며, 두피로부터 모발이 탈락하는 현상 또는 모발이 성기거나 가늘어지는 상태를 예방하고 억제하는 효과를 제공한다.

[27] 본 발명의 조성물은 백모 방지용 조성물로서 사용될 수 있으며, 멜라노사이트의 MITF 발현을 증가시켜 멜라노사이트를 활성화시키고 멜라닌 합성을 촉진함으로써 백모의 유발을 사전에 예방하고 흑모유발을 촉진하는 효과를 제공한다.

[28] 본 발명의 조성물은 비듬 방지용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 모발과 두피에 축적된 독소를 효과적으로 배출하여 두피를 정화하고, 비듬균의 증식과 성장을 억제하여 두피염증반응을 예방할 수 있으며, 또한 활성산소의 생성 및 작용을 억제하는 항산화 효능이 뛰어나 두피를 진정시키고

강화시키며 본연의 방어력을 강화시키는 효과를 제공할 수 있다.

[29] 본 발명의 조성물은 천연 방부제 조성물로서 사용될 수 있으며, 천연성분이므로 방부효과가 탁월하면서 인체에 무해한 효과를 제공한다.

[30] 본 발명에 따른 조성물은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용가능한 매질 또는 기제를 함유하여 제형화될 수 있다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로서, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한 포말(foam)의 형태로 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[31] 특히, 본 발명의 피부 외용제 조성물이 비듬 방지, 육모 또는 백모 방지용으로서 사용될 경우에는 두피 및 모발용 조성물로서 제형화될 수 있으며, 제형이 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 헤어토닉, 모발 영양화장수, 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어로션 또는 두피 모발 겸용 트리트먼트 등으로 제형화될 수 있다.

[32] 또한 본 발명에 의한 조성물은 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 상기 보조제는 화장품학 또는 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입된다.

[33] 또한, 본 발명의 조성물은 피부 개선 효과를 증가시키기 위하여 피부 흡수 촉진 물질을 함유할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[34] 이하, 시험예 및 제형예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 시험예 및 제형예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 하기 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[35]

[36] [참고예 1] 진세노사이드 Rg3의 준비

[37] 본 발명의 조성물의 효능을 실험하기 위한 진세노사이드 Rg3는 엠보연구소로부터 구입하여 사용하였다.

[38]

[39] [제형예 1 및 비교제형예 1]

[40] 하기 표 1의 조성에 따라 통상적인 방법으로 영양크림을 제조하였다(단위: 중량%).

[41] 표 1

[Table 1]

배합성분	제형예 1	비교제형예 1
정제수	To 100	To 100
진세노사이드 Rg3	5.00	-
식물성 경화유	1.50	1.50
스테아린산	0.60	0.60
글리세롤 스테아레이트	1.00	1.00
스테아릴 알코올	2.00	2.00
폴리글리세릴-10 펜타스테아레이트 & 베헤닐 알코올 &소디움 스테아로일 락틸에이트	1.00	1.00
아라키딜 베헤닐 알코올 &아라키딜글루코사이드	1.00	1.00
세틸아릴 알코올 & 세테아릴글루코사이드	2.00	2.00
PEG-100 스테아레이트 & 글리세롤올레이트 & 프로필렌글리콜	1.50	1.50
카프릴릭/카르릭 트리 글리세라이드	11.00	11.00
사이클로메디콘	6.00	6.00
방부제, 향	적량	적량
트리에탄올 아민	0.1	0.1

[42] [시험예 1] 혈색 개선 효과

[43] 본 발명에 의한 화장료 조성물의 피부 혈액 순환 촉진 효과를 평가하기 위하여, LDPI(Laser Doppler Perfusion Imager; periscan PIM II, Perimed (stochholm, Sweden))를 이용하여 피부에서의 혈액순환 정도를 측정하였다. LDPI는 피부에서의 혈액순환을 측정하는 기기로 널리 알려져 있고 현재 사용되고 있는 기기로서, 피부의 모세혈관에서 혈액의 속도 및 양 뿐만 아니라 소동맥과 소정맥에서의 흐름까지 측정해 낼 수 있는 매우 민감한 기기이다.

[44] 항온항습실에서 얼굴을 비누로 수세한 후 30분간 적응시키고, LDPI를 이용하여 초기값을 측정하였다. 먼저 평소 손발이 차가운 여성 30명의 이마 아래 부분의 초기 혈류량을 LDPI로 측정하였다. 그런 다음 상기 제형예 1 및 비교제형예 1을 1주일 동안 피시험자들에게 사용하도록 한 후에 측정한

혈류량과 상기 초기 측정값을 비교한 결과(피부 혈류량 변화)를 하기 표 2에 나타내었다.

[45] 표 2

[Table 2]

화장료 사용 전후 LDPI 결과-피부 혈류량	
시험물질	1주 사용 후 피부 혈류량 변화율(%)
제형예 1	13
비교제형예 1	5

[46] 상기 표 2의 결과에서, 본 발명에 의한 화장료 조성물은 진세노사이드 Rg3를 함유하지 않은 비교제형예 1보다 피부 혈류량을 현저하게 증가시켰으며, 이러한 혈액 순환 촉진을 통해 혈색이 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 궁극적으로 본 발명에 의한 진세노사이드 Rg3를 함유하는 화장료 조성물이 피부의 영양분을 효과적으로 전달하고 피부 노화를 억제하며 지연시키는 데 기여할 수 있음을 시사한다.

[47]

[48] [시험예 2] 피부톤 개선 효과

[49] 상기 제형예 1 및 비교제형예 1의 피부톤 개선 효과를 알아보기 위하여 30명의 피험자에게 각각 사용(저녁 1회/일 도포, 총 1주간)하도록 한 후, Facial Stage DM-3(Moritex, Japan) 기기를 활용하여 피부톤 개선 정도를 평가하였다. 피부톤 개선율은 피부의 명도 및 색채 측정값으로 피부의 명도 및 색채 변화 값으로 판단하였으며, 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다. 명도 및 색채 변화 값이 클수록 피부톤이 개선되었음을 의미한다.

[50] 표 3

[Table 3]

시험물질	피부톤 개선율(%)	
	명도(평균±표준편차)	색채(평균±표준편차)
제형예 1	14±3.04	11±2.24
비교제형예 1	5±2.34	5±2.05

[51] 상기 표 3의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Rg3를 함유하지 않는 비교제형예 1은 유의적인 피부톤 개선 효능을 보이지 않은 반면, 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 함유하는 제형예 1은 사용 전보다 사용 후의 피부톤이 많이 개선되는 것을 확인하였다.

[52]

[53] [시험예 3] 모공 축소 효과

[54] 1. 콜라겐 생합성 촉진을 통한 모공 축소 효과

[55] 본 발명에 의한 진세노사이드 Rg3를 콜라겐 생합성 촉진 효과를 TGF-β와 비교하여 측정하였다. 먼저, 섬유아세포(fibroblast)를 24 공(well)에 1 공 당 10^5 개씩 파종(seeding)하여 90% 정도 자랄 때까지 배양하였다. 이를 24시간 동안 무혈청 DMEM 배지로 배양한 후 무혈청 배지에 녹인 본 발명의 진세노사이드 Rg3와 TGF-β를 각각 10ng/ml씩 처리하고 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이들의 상층액을 떠내어 프로콜라겐 형(I) ELISA 키트(procollagen type(I); #MK101, TAKARA(Shiga, Japan))를 이용하여 프로콜라겐(procollagen)의 증감여부를 보았다. 그 결과를 표 4에 나타내었으며, 콜라겐의 합성능은 비처리군을 100으로 하여 대비하였다.

[56] 표 4

[Table 4]

시험물질	콜라겐 합성능(%)
비처리군	100
TGF-β	183.5
진세노사이드 Rg3	197.2

[57] 상기 표 4의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Rg3는 양성대조군인 TGF-β 보다 높은 수준의 우수한 콜라겐 합성능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Rg3가 모공 주변의 콜라겐 생성량을 증가시켜 넓어진 모공을 축소시킬 수 있음을 확인하였다.

[58]

[59] 2. 모공 축소 효과

[60] 제형예 1 및 비교제형예 1의 모공 축소 효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 평가하였다. 모공 크기가 넓은 피험자 남녀 20명을 선정하여 10명씩 2개 군으로 나누고 각 군별로 얼굴에 제형예 1 및 비교제형예 1의 영양크림을 4주간 매일 바르게 하였다. 모공 축소의 효과에 대한 판정은 실험 전과 4주 후 사진을 찍어서 전문가들의 육안 평가로 이루어졌다. 그 결과는 하기 표 5에서 나타내었다(평가 등급: 0 - 전혀 축소 되지 않았다; 5 - 매우 축소되었다).

[61] 표 5

[Table 5]

시험물질	평가 등급
제형예 1	3
비교제형예 1	0

[62] 상기 표 5의 결과에서, 비교제형예 1은 모공 축소 효과가 없지만, 제형예 1의 경우에는 육안으로 확인 가능할 정도의 모공 축소 효과를 나타내어 본 발명에 의한 진세노사이드 Rg3는 모공의 크기를 감소시키는 효과가 우수함을 알 수

있었다.

[63]

[64] [시험예 4] 피지 분비 억제 효과

[65] 1. 5α-리덕타아제 활성 억제를 통한 피부 과분비 억제 효과

[66] 5α-리덕타아제 활성 억제 효과를 확인하기 위해서 HEK293-5αR2 세포에서 [^{14}C]테스토스테론이 [^{14}C]디하이드로테스토스테론(DHT: dihydrotestosterone)으로 변환되는 비율을 측정하였다. HEK293 세포에 p3 x FLAG-CMV-5αR2를 형질감염시켜서 24 웰 플레이트에 웰당 2.5 x 10^5 세포로 넣고 배양하였다(Park et al., 2003, JDS. Vol. 31, pp. 191-98). 다음날 효소 기질과 저해제가 첨가된 새로운 배지로 바꿔주었다. 배지의 기질로는 0.05μCi [^{14}C]테스토스테론(Amersham Pharmacia biotech, UK)을 사용하였다.

[67] 5α-리덕타아제 활성 억제 정도를 확인하기 위해서 진세노사이드 Rg3를 넣고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 이 때 진세노사이드 Rg3를 넣지 않은 것은 음성대조군으로 사용하고, 피나스테라이드(finasteride)를 넣은 것을 양성대조군으로 사용하였다. 이 후 배양 배지를 수거하여 스테로이드를 800㎕ 에틸아세테이트로 추출한 다음 상부의 유기용매층을 분리하여 말린 후 남은 잔유물을 다시 50㎕ 에틸아세테이트로 녹여서 실리카 플라스틱시트 카이젤겔 60 F254(Silica plastic sheet kieselgel 60 F254) 상에서 에틸아세테이트-헥산(1:1)을 용매로 하여 전개하였다.

[68] 플라스틱 시료를 공기 중에서 건조한 후, 동위원소의 양을 측정하기 위하여 바스 시스템을 사용하였는데, 건조된 플라스틱 시트와 엑스레이 필름을 함께 바스 카셋트에 넣어 1주일 후에 필름에 남아있는 테스토스테론과 디하이드로테스토스테론의 동위원소 양을 측정한 다음 하기 수학식 1 및 2에 따라 전환율 및 저해율을 각각 산출하였으며, 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[69] 수학식 1

$$\text{전환율}(\%) = \frac{\text{DHT 영역에서의 방사능}}{\text{총 방사능}} \times 100$$

[70] 수학식 2

$$\text{저해율}(\%) = \frac{\text{대조군의 전환율} - \text{시험물질의 전환율}}{\text{대조군의 전환율}} \times 100$$

[71] 표 6

[Table 6]

시험물질	전환율(%)	저해율(%)
음성대조군	48	-
양성대조군	27.6	42.5
진세노사이드 Rg3	16.3	66.0

[72] 상기 표 6의 결과에서, 테스토스테론을 디하이드로테스토스테론으로 전환시켜 세포질 내에 있는 수용체 단백질과 결합해 핵 내로 들어가 피지선 세포를 활성화하고 분화를 촉진시켜 피지선 내에서 피지를 과분비시키는 역할을 하는 5α-리덕타아제의 활성을 진세노사이드 Rg3가 효과적으로 억제함으로써 테스토스테론의 디하이드로테스토스테론으로의 전환을 차단하는 것을 확인할 수 있었으며, 5α-리덕타아제의 활성을 억제하는 것으로 알려진 피나스테라이드보다도 우수한 억제 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서, 진세노사이드 Rg3는 5α-리덕타아제의 활성을 효과적으로 억제시킴으로써 피지의 과분비를 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

[73]

[74] 2. 피지 분비 억제 효과

[75] 상기 제형예 1 및 비교제형예 1의 피지 분비 억제 효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 평가하였다. 피지분비가 많다고 느끼는 피험자 남녀 30명을 선정하여 얼굴 피부의 지정된 부위에 제형예 1 및 비교제형예 1의 영양크림을 4주간 매일 바르게 하였다. 피지감소의 효과에 대한 판정은 피지량 측정기(Sebumeter SM810, C+K Electronic Co., 독일)를 사용하여 2주 및 4주 경과 후 평균 피지 감소율(%)을 각각 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

[76] 표 7

[Table 7]

시험물질	피지 감소율(%)	
	2주 경과 후	4주 경과 후
제형예 1	32	40
비교제형예 1	5	5

[77] 상기 표 7의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 함유하는 제형예 1은 이를 함유하지 않은 비교제형예 1 보다 과잉으로 분비되는 피지를 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

[78]

[79] [제형예 2 및 비교제형예 2~3]

[80] 하기 표 8에 나타낸 성분 및 함량(중량%)에 따라 제형예 2 및 비교제형예 2~3를 제조하였다. 구체적으로 설명하면, 제형예 2는 진세노사이드 Rg3를 배합시킨 것이고, 비교제형예 2는 여드름 피부 개선의 유효성분을 전혀 포함시키지 않은 것이며, 비교제형예 3은 항균력에 대한 기준으로 삼을 표준물질로서 여드름 치료제로 많이 사용하는 에리스롬마이신(erythromycin)을 함유시킨 것이다.

[81] 제형예 2 및 비교제형예 2~3의 제조 방법은 다음과 같다. 하기 표 8의 A상의 성분들을 완전 용해시키고 별도의 용해조에서 B상의 성분들을 완전 용해시킨

다음, B상을 A상에 첨가하여 혼합가용화 시켰다. 여기에 C상의 성분들을 표 8에 기재된 배합비율에 따라 첨가하여 혼합 균일화시킨 다음 여과시켜 본 조성물들을 제조하였다.

[82] 표 8

[Table 8]

구분		제형예 2	비교제형예 2	비교제형예 3
A	탈이온수(Deionized Water)	To 100	To 100	To 100
	EDTA-2Na	0.02	0.02	0.02
	글리세린	5.0	5.0	5.0
B	에탄올	2.0	2.0	2.0
	PEG-60 경화 피마자유(hydrogenated castor oil)	0.4	0.4	0.4
	향료(perfume)	0.04	0.04	0.04
C	진세노사이드 Rg3	5.0	-	-
	에리스롬마이신	-	-	5.0

[83] [시험예 5] 여드름균에 대한 항균력 시험

[84] 상기 제형예 2 및 비교제형예 2~3의 조성으로 제조된 각각의 화장료 조성물을 가지고 여드름 원인 균주인 프로피오니박테리움 아크네스(ATCC 6919: 배지-BHI 브로쓰(broth))에 대하여 항균력을 시험하였다.

[85] 여드름균에 대한 항균력 시험 방법은 다음과 같았다.

[86] (1) 시험 균액 준비

[87] 프로피오니박테리움 아크네스는 BHI 브로쓰에 접종하여 혐기 배양한 배양액을 사용하였다.

[88] (2) 희석 용액 준비

[89] BHI 브로쓰(pH 6.8) 또는 LB 브로쓰(pH 4.5) 15ml에 상기 시험 균액을 0.15ml 첨가하여 잘 혼합한 것을 희석용액으로 사용하였다.

[90] (3) 시료 준비

[91] 제형예 2 및 비교제형예 2~3으로부터 제조된 화장료 조성물 원액 그대로를 시료로 사용하였다.

[92] (4) 항균력 시험

[93] 1) 96웰의 세포배양관(96 well plate) 1번 행에 출발 농도에 맞도록 시료를 넣고 희석용액으로 총량을 200μl씩을 넣는다.

[94] 2) 1번 행의 혼합액을 잘 섞어준 다음 100μl를 취하여 2번 행에 넣고 잘 섞어준 다음, 다시 100μl를 취하여 3번 행에 넣는 방식으로 이중 희석(double dilution)을 행한다.

[95] 3) 32℃에서 24시간 및 48시간 정치 배양한 후 현탁된 정도로 균의 증식 유무를 판단하여 균의 증식이 없는 최소농도를 MIC(최소저지농도; Minimum Inhibitory Concentration) 값으로 결정한다. 만약 혼합액이 불투명하여 균의 증식 유무를 판단하기 어려우면 현미경 관찰을 통하여 확인한다.

[96] 여드름균에 대한 항균력 시험 결과를 하기 표 9에 나타내었다. MIC는 제형에 함유된 유효성분의 농도로 환산하여 표기하였다.

[97] 표 9

[Table 9]

항목	pH	프로피오니박테리움 아크네스
제형예 2	5.7	>48 ppm
비교제형예 2	5.7	최고 농도(항균력 없음)
비교제형예 3	5.7	>100 ppm

[98] 상기 표 9의 결과에서, MIC에서 ppm 농도가 작을수록 여드름균에 대한 항균력에 대하여 유효한 물질이라고 할 수 있는데, 제형예 2의 경우 공지의 여드름 치료제인 에리스롬마이신을 사용한 비교제형예 3보다 ppm 농도가 현저하게 작게 나와 진세노사이드 Rg3를 함유하는 조성물은 시험균에 대하여 훨씬 우수한 항균력을 가짐을 확인할 수 있다.

[99]

[100] [시험예 6] 지질합성(Lipogenesis) 억제 시험

[101] 생쥐의 섬유아세포주(fibroblast cell line)인 3T3-L1 세포를 10%의 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 함유된 DMEM(Dulbeco's modified eagle's medium, GIBCO BRL, Life Technologes 社) 배지가 담긴 6웰 배양 플레이트(culture plate)에 1×10^5 세포/웰로 부착시켰다. 2일이 지난 후 다시 새로운 DMEM(10% FBS 함유) 배지로 교환하고 2일 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 배양한 세포를 다시 1㎍/㎖ 인슐린(insulin), 0.5mM IBMX 및 0.25μM 덱사메타손(dexamethasone)을 함유한 DMEM(10% FBS 함유)로 분화 유도를 하고 진세노사이드 Rg3 및 카페인을 50μM을 처리한 다음 처리 2일이 경과한 후 다시 인슐린이 포함된 DMEM으로 교환하여 5일 동안 배양하였다. 5일 후 다시 정상 배지(DMEM, 10% FBS 함유)로 교환하고 상기 세포가 형태적으로 지방세포로 변화할 때까지 관찰하면서 배양하였다.

[102] 진세노사이드 Rg3의 지방세포 내 지방 축적 억제 효능을 평가하기 위하여 상기에서 분화가 완료된 3T3-L1 지방세포를 이용하여 수단 III 염색(S4136, sigma-aldrich)을 실시하였다. 지방 세포를 인산염 버퍼 내에서 4%

파라포름알데하이드(pH 7.2)로 상온에서 고정한 후에 PBS(phosphate buffered saline)로 수세해 준 다음, 수단 III으로 염색한 후에 사진을 찍어서 육안 비교하였다. 대조군은 시험물질이나 비교물질을 첨가하지 않은 배지만을 사용한 것이고, 다른 비교군으로 카페인 50μM을 처리하였다. 지방 축적 억제 정도는 염색된 정도를 +++, ++, +, -로 나누어 등급을 부여하였으며, 이때 +++로 갈수록 염색 정도가 크다는 것을 의미한다. 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[103] 표 10

[Table 10]

시료	저해율%
대조군	+++
비교군	+
진세노사이드 Rg3	-

[104] 상기 표 10의 결과에서, 본 발명에 사용된 진세노사이드 Rg3는 지방세포 내 축적된 지방의 양이 적을 뿐만 아니라, 공지된 지질합성 저해 물질인 카페인 보다 우수한 지질합성 저해 효과가 있음을 알 수 있다. 따라서, 지질합성이 억제됨으로써 피지가 감소되어 여드름 발생을 억제할 수 있다.

[105]

[106] [시험예 7] 여드름 개선과 피지분비 감소 및 자극 유무의 시험

[107] 여드름을 보유하고 있는 30명을 10명씩 3개 군으로 나누고 각각의 군에 해당하는 피험자에게 상기 제형예 2 및 비교제형예 2~3으로 제조된 화장료 조성물을 한 달간 사용하게 하였다. 여드름 개선 척도는 1점에서 5점까지로 하고, 1점은 '아니다', 3점은 '보통이다', 5점은 '매우 그렇다'로 표기하도록 하였다. 실험 결과는 하기의 표 11에 10명의 평균점수로 표기하였다.

[108] 여드름 소멸 시기는 소멸이 판독된 일수를 기준으로 하였으며, 여드름 재발은 유무로 1개월 뒤의 결과를 기준으로 하였다. 피지 분비감소는 1점에서 5점까지로 하고, 1점은 '아니다', 3점은 '보통이다', 5점은 '매우 그렇다'로 표기하도록 하였다. 실험 결과는 하기 표 11에 10명의 평균점수로 표기하였다. 피부자극의 유무는 (자극반응을 보인 명수)/(총 시험자수)로 보았다.

[109] 표 11

[Table 11]

	염증성 여드름 개선	면포성 여드름 소멸시기	여드름 재발	피지분비 감소	자극 유무
제형예 2	4.3	3일	무	4.5	0/10
비교제형예 2	2.1	13일	유	2.0	0/10
비교제형예 3	4.2	2일	무	4.1	9/10

[110] 상기 표 11의 결과에서, 제형예 2는 비교제형예 2에 비해 여드름이 재발되지 않았고, 전반적으로 여드름 개선에 대해 우수한 효과가 있음을 알 수 있다. 한편, 항균력 표준물질을 함유한 비교제형예 3의 경우 여드름 개선 효과를 나타내고 있지만, 사용함에 있어 피부자극이 강하여 장기적으로 사용하기에는 적당하지 않은 것으로 보이나, 본 발명에 따른 조성물은 자극이 없어 장기간의 사용에도 적당한 것으로 나타났다.

[111]

[112] [제형예 3 및 비교제형예 4]

[113] 하기 표 12의 조성으로 샴푸를 제조하였다. 구체적으로, 계면활성제와 에틸렌글리콜디스테아레이트를 정제수에 첨가하여 80℃가 될 때까지 가열하여 균일하게 용해시킨 후, 교반하에 40℃까지 서서히 냉각시키고, 상기 혼합물에 본 발명에 따른 유효성분과 방부제, 점도조절제, 향료, 모발 컨디셔닝제를 투입하여 혼합한 후, 교반하에 실온까지 냉각시켜 제조하였다.

[114] 표 12

[Table 12]

성분(중량%)	제형예 3	비교제형예 4
라우릴황산암모늄	10	10
폴리옥시에틸렌라우릴황산암모늄	5	5
코코아미도프로필베타인	2	2
에틸렌글리콜디스테아레이트	1.5	1.5
코코일 모노에탄올아미드	0.8	0.8
진세노사이드 Rg3	5.0	-
폴리쿼터늄-10	0.2	0.2
청색1호	0.0002	0.0002
황색4호	0.0001	0.0001
메틸파라벤	0.1	0.1
향료	0.8	0.8
구연산	0.1	0.1
디메치콘	1.0	1.0
물	to 100	to 100

[115] [시험예 8] 비듬감소 효과 시험

[116] 비듬이 비교적 많은 19~35세의 남성 24명을 선정하여 각 제형예 3 및 비교제형예 4의 샴푸에 대하여 12명씩 2개 그룹으로 1개월간 다음과 같은 방식으로 사용하게 한 후 비듬 감소율을 측정하였다.

[117] 시험 개시전에 보통 통상의 샴푸로 세발하고, 세발 후 2일간 누적된 비듬을 채집하여 채집된 비듬의 중량과 각 제형예 3 및 비교제형예 4의 샴푸로 2일에 한번씩 세발하여 시험종료 후 2일간 누적된 비듬의 중량을 비교 평가하였다. 이때 누적된 비듬은 진공 흡입 장치로써 두피로부터 직접 채집하여, 하기 수학식 3에 의거하여 비듬 감소율을 구하고 그 결과를 하기 표 13에 나타내었다.

[118] 수학식 3

$$\text{비듬 감소율(\%)} = \frac{\text{시험 개시 전 비듬 중량(mg)} - \text{1개월 후 비듬 중량(mg)}}{\text{시험 개시 전 비듬 중량(mg)}} \times 100$$

[119] 표 13

[Table 13]

	제형예 3	비교제형예 4
비듬감소율(%)	82.7	0.7
	86.1	-0.5
	85.6	-1.1
	59.6	1.5
	77.6	2.2
	89.1	1.3
	87.1	6.3
	69.8	3.6
	73.5	3.3
	79.3	4.6
	83.2	3.7
	87.6	4.2
평균값	80.1	2.5
SD	8.70	2.2

[120] 상기 표 13의 결과에서, 진세노사이드 Rg3를 함유한 제형예 3의 경우 우수한 비듬방지 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[121]

[122] [시험예 9] 두피 가려움증 방지 효과 시험

[123] 비교적 두피 가려움을 심하게 느끼는 25세~45세의 남녀 24명을 선정하여 12명씩 2개 그룹으로 나누어 각 제형예 3 및 비교제형예 4의 샴푸를 3일에 1회씩 2주간 사용하게 한 후 두피 가려움 방지 효과를 하기 평가기준을 통하여 평가하고 그 결과를 하기 표 14에 나타내었다.

[124] [평가 기준]

[125] 매우 우수하다 - 5점

[126] 우수하다 - 4점

[127] 보통이다 - 3점

[128] 불량하다 - 2점

[129] 매우 불량하다 - 1점

[130] 표 14

[Table 14]

구분	제형예 3	비교제형예 4
두피의 가려움증 제거효과	4.3	2.3

[131] 상기 표 14의 결과에서, 진세노사이드 Rg3를 함유한 제형예 3의 경우가 두피 가려움증을 방지하는데 보다 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[132]

[133] [시험예 10] 칼륨 이온 채널 활성 증가 효과 평가

[134] 탈모 치료제인 미녹시딜은 잠재적인 미토콘드리아 칼륨 이온 채널 오프너(K_{ATP} channel opener)로 알려져 있으며, 안드로겐성 탈모의 치료에 사용되는 대표적인 약물이다. 이러한 미녹시딜의 기작을 평가하기 위해서 두피의 진피를 구성하는 섬유아 세포에서 K_{ATP} 채널을 막는 톨부타미드(SIGMA AlDRICH, T0891)를 처리하여 세포증식을 억제하고, 다시 칼륨 이온 채널을 열어 세포증식이 회복되는 시험법을 사용하였다.

[135] 본 조성물의 K_{ATP} 채널 오프너로서의 기능을 평가하기 위해서 본 발명에서는 섬유아세포주인 NIH3T3(Mouse embryonic fibroblast cell line) 세포주를 사용하였다. 본 세포주는 NIH 스위스 마우스 배아(Swiss mouse embryo)에서 분리한 섬유아 세포주를 3T3 프로토콜로 자연 불멸화시킨 세포주이다. 상기 세포주는 10% FBS가 함유된 DMEM(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 5% CO_2, 37℃가 유지되는 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. NIH3T3을 96웰 플레이트에 넣고 24시간 동안 37℃ 인큐베이터에서 배양한 후 2.5mM 톨부타미드를 처리하고, 10분 뒤에 양성대조군인 미녹시딜 10μM과 진세노사이드 Rg3를 각각 2.5 ppm, 5 ppm 및 10 ppm의 농도로 처리하며, 약물 처리 48시간 경과 후에 WST-1 키트(Roche)를 사용하여 세포 증식능을 측정하였다. 결과는 하기 표 15에 나타내었다.

[136] 표 15

[Table 15]

구분	세포 증식능(%)
무처리 대조군(Control)	100
미녹시딜	132
진세노사이드 Rg3(2.5ppm)	114
진세노사이드 Rg3(5ppm)	123
진세노사이드 Rg3(10ppm)	129

[137] 상기 표 15의 결과에서, 진세노사이드 Rg3를 처리한 경우 섬유아 세포의 증식이 회복되고, 세포 증식능이 처리한 진세노사이드 Rg3의 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있으며, 진세노사이드 Rg3를 10ppm으로 처리한 경우에는

미녹시딜을 처리한 경우의 수준으로 세포의 증식이 회복되는 것을 확인할 수 있다.

[138]

[139] [시험예 11] 진세노사이드 Rg3의 멜라닌 생성 촉진 효과 시험

[140] RPMI 배지에 5%의 우태아혈청, 100IU의 페니시린G 및 0.2μM의 TPA를 첨가한 배지에 멜라닌 세포(melan-a)를 24웰플레이트(24-well microtiter plate)에 50,000세포/웰이 되도록 분주하였다. 다음날 분주된 세포에 시험 물질로서 진세노사이드 Rg3를 최종농도 10ppm 또는 50ppm으로 처리하고, 음성 대조군으로는 0.1% DMSO를, 양성 대조군으로는 100μM IBMX를 처리한 후에 37℃ 온도에서 3일간 배양하였다. 배양 후, PBS로 웰을 씻어주고 1N NaOH를 100㎕씩 넣은 후 세포 안의 멜라닌을 용해시켰다. 용해된 멜라닌의 흡광도를 평판배양측정기(microplate reader)를 이용하여 405nm에서 측정하였다(Synergy2, BioTek(VT, USA)). 진세노사이드 Rg3의 멜라닌 생성 촉진 효과를 대조군과 비교한 결과는 하기 표 16에 나타내었다.

[141] 표 16

[Table 16]

시료	멜라닌 합성양(%)
DMSO(0.1%)	100
IBMX(100μM)	120
진세노사이드 Rg3(10ppm)	110
진세노사이드 Rg3(50ppm)	120

[142] 상기 표 16의 결과에서, 진세노사이드 Rg3가 멜라노사이트의 멜라닌 합성을 촉진시켜 멜라닌 생성이 늘어나, 우수한 멜라닌 생성 촉진 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[143]

[144] [시험예 12] 진세노사이드 Rg3의 멜라노사이트에서의 MITF 및 티로시나제(tyrosinase) 발현 촉진 효과

[145] 501mel 세포주를 이용하여 6웰플레이트(6-well microtiter plate)에 500,000세포/웰이 되도록 분주하고, 각공에 음성 대조군으로는 DMSO 0.1%, 양성 대조군으로는 IBMX 100μM, 그리고 시험군으로는 진세노사이드 Rg3를 10ppm으로 처리하여, 37℃ 온도에서 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양한 후 단백질을 얻었다. 이렇게 얻은 단백질에 대하여 MITF 및 티로시나제 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 하였다. 단백질 추출과 웨스턴 블랏은 통상적으로 당업자가 사용하는 표준 방법으로 수행하였다. 웨스턴 블랏 후 그 결과를 음성 대조군을 100으로 하고 이 값과 비교하여 하기 표 17에 나타내었다.

[146] 표 17

[Table 17]

	MITF		티로시나제	
	IBMX	진세노사이드 Rg3	IBMX	진세노사이드 Rg3
24hr	121	94	160	150
48hr	98	110	149	153
72hr	224	119	298	182

[147] 상기 표 17의 결과에서, 진세노사이드 Rg3는 멜라노사이트에서 MITF와 티로시나제 단백질 발현을 상승시킴을 확인할 수 있다.

[148]

[149] [시험예 13] 진세노사이드 Rg3의 항균력 평가

[150] 진세노사이드 Rg3의 항균력을 평가하기 위해 항균 실험을 실시하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

[151] 실험에 사용한 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 에스체리치아 콜리(Escherichia coli), 세도모나스 애루지노사(Pseudomonas aeruginosa) 균주는 트립티케이스 대두 배지(Tryptic Soy Broth)에서, 캔디다 알비칸스(Candida albicans), 아스퍼질러스 니거(Aspergillus niger) 균주는 사부로 덱스트로오스 배지(Sabouraud Dextrose Broth)에서 배양했다. 배양액을 각 배지에 1/100(캔디다 알비칸스 균주는 1/10) 희석한 희석액을 시험균액으로 사용하였다. 아스퍼질러스 니거는 2×10^8 cfu/ml이 되도록 제조한 포자 현탁액을 시험균액으로 사용하였다.

[152] 각 배지 15ml에 상기 시험균액을 0.15ml 첨가하여 잘 혼합한 것을 희석용액으로 사용하였다.

[153] 96 딥 웰 플레이트(96 well plate) 1번 행에 진세노사이드 Rg3 10 ppm을 16㎕씩 넣고, 희석용액을 184㎕씩 넣었다. 나머지 웰들에는 희석용액 100㎕씩을 넣었다. 1번 행의 혼합액을 잘 섞어준 다음 100㎕를 취하여 2번 행에 넣고 잘 섞어준 다음, 다시 100㎕를 취하여 3번 행에 넣는 방식으로 2배씩 희석시켰다.

[154] 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 에스체리치아 콜리(Escherichia coli), 세도모나스 애루지노사(Pseudomonas aeruginosa)는 32℃ 항온조에서, 캔디다 알비칸스(Candida albicans), 아스퍼질러스 니거(Aspergillus niger)는 25℃ 항온조에서 배양하였다.

[155] 48시간 후에 균 증식여부를 현탁도와 현미경으로 확인하여 최소저해농도(MIC) 값을 결정하고 그 결과를 하기 표 18에 나타내었다.

[156] 표 18

[Table 18]

샘플	최소저해농도(MIC), 단위 %				
	세도모나스 애루지노사	스타필로코쿠스 아우레우스	에스체리치아 콜리	캔디다 알비칸스	아스퍼질러스 니거
진세노사이드 Rg3	0.18	0.05	0.142	>3	>1

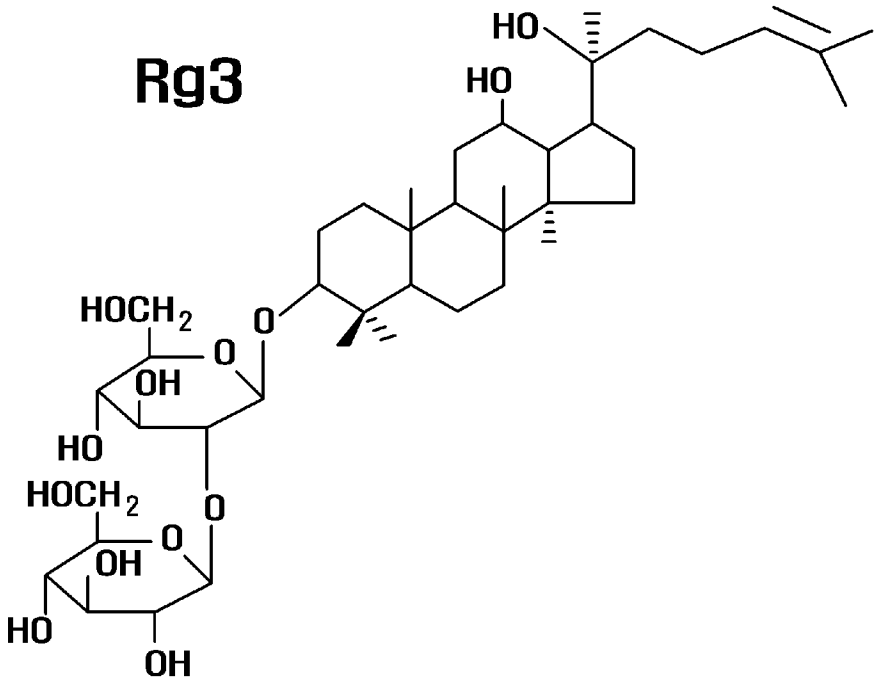
[157] 상기 표 18의 결과에서, 진세노사이드 Rg3는 다양한 균주에 대하여 항균력을 나타냄을 확인할 수 있으며, 이를 통하여 진세노사이드 Rg3는 조성물 내에서 천연 방부제, 또는 항균제로서 작용할 수 있음을 예측할 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 진세노사이드 Rg3는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[화학식 1]



[청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 진세노사이드 Rg3는 조성물 총 중량에 대하여 0.001~50중량%의 양으로 함유됨을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 여드름 개선용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 5] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 항균용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 혈색 및 피부톤 개선용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 모공 축소용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 8] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 피지 조절용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 9] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 피부 트러블 개선용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 10] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 모발 성장 촉진용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 11] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 백모 방지용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 12] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 항비듬용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 13] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 천연 방부제용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 14] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 여드름 개선용으로서의 용도.

[청구항 15] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 항균용으로서의 용도.

[청구항 16] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 혈색 및 피부톤 개선용으로서의 용도.

[청구항 17] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 모공 축소용으로서의 용도.

[청구항 18] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 피지 조절용으로서의 용도.

[청구항 19] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 피부 트러블 개선용으로서의 용도.

[청구항 20] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 모발 성장 촉진용으로서의 용도.

[청구항 21] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 백모 방지용으로서의 용도.

[청구항 22] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 항비듬용으로서의 용도.

[청구항 23] 진세노사이드 Rg3를 유효성분으로 포함하는 피부 외용제 조성물의 천연 방부제용으로서의 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/003596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/704(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i

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)

A61K 31/704; A61K 8/63; A61K 31/70; A61Q 19/00; A23B 7/015; A23L 1/212; A61K 8/60; A61K 8/97; A61K 36/258; A61P 17/00

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) & Keywords: saponin, Ginsenoside Rg3, external composition for skin, acne, antidandruff, contraction of pores

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KR 10-1132246 B1 (KNU-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION et al.) 30 March 2012 See claims 2 and 5; paragraph 3.	1-3,10,20 4-9,11-19,21-23
X	KR 10-2009-0015127 A (BAYER CONSUMER CARE AG) 11 February 2009 See claims 1, 4-5; paragraph 13.	1,4,9,14,19
X	KR 10-2009-0087709 A (KOREA GINSENG CORP. et al.) 18 August 2009 See claims 1 and 3; abstract.	1,5,15
X	KR 10-2010-0124609 A (KOREA ATOMIC ENERGY RESEARCH INSTITUTE) 29 November 2010 See claims 1, 6, 15-16.	1,6,16
PX	KR 10-2014-0013791 A (KNU-INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION et al.) 05 February 2014 See claims 1, 3-4.	1-6,8-9,14-16 ,18-19

☐ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 AUGUST 2014 (27.08.2014)	**27 AUGUST 2014 (27.08.2014)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/003596

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1132246 B1	30/03/2012	NONE	
KR 10-2009-0015127 A	11/02/2009	AU 2007-251857 A1	22/11/2007
		BR PI0712092 A2	06/03/2012
		CA 2652308 A1	22/11/2007
		CL 14142007 A1	01/02/2008
		CN 101443025 A	27/05/2009
		EP 2026827 A1	25/02/2009
		JP 2009-537466 A	29/10/2009
		MX 2008014525 A	27/11/2008
		NO 20084949 A	10/12/2008
		NO 20085089 A	16/12/2008
		PE 02562008 A1	22/05/2008
		RU 2008149433 A	27/06/2010
		US 2009-0169623 A1	02/07/2009
		WO 2007-131677 A1	22/11/2007
		WO 2007-131677 A8	11/12/2008
KR 10-2009-0087709 A	18/08/2009	KR 10-0963465 B1	17/06/2010
KR 10-2010-0124609 A	29/11/2010	KR 10-1117072 B1	22/02/2012
KR 10-2014-0013791 A	05/02/2014	KR 10-1430636 B1	18/08/2014

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/003596

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/704(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/704; A61K 8/63; A61K 31/70; A61Q 19/00; A23B 7/015; A23L 1/212; A61K 8/60; A61K 8/97; A61K 36/258; A61P 17/00

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: 사포닌,진세노사이드 Rg3, 피부 외용제, 여드름, 항비듬, 모공수축

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1132246 B1 (강원대학교산학협력단 외) 2012.03.30 청구항 2 및 5; 단락 3 참조.	1-3,10,20
A		4-9,11-19,21-23
X	KR 10-2009-0015127 A (바이엘 컨수머 케어 악티엔게젤샤프트) 2009.02.11 청구항 1, 4-5; 단락 13 참조.	1,4,9,14,19
X	KR 10-2009-0087709 A (주식회사 한국인삼공사 외) 2009.08.18 청구항 1 및 3; 요약 참조.	1,5,15
X	KR 10-2010-0124609 A (한국원자력연구원) 2010.11.29 청구항 1, 6, 15-16 참조.	1,6,16
PX	KR 10-2014-0013791 A (강원대학교산학협력단 외) 2014.02.05 청구항 1, 3-4 참조	1-6,8-9,14-16 ,18-19

☐ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 08월 27일 (27.08.2014)	2014년 08월 27일 (27.08.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
최승희
전화번호 +82-42-481-8740

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/003596

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1132246 B1	2012/03/30	없음	
KR 10-2009-0015127 A	2009/02/11	AU 2007-251857 A1	2007/11/22
		BR PI0712092 A2	2012/03/06
		CA 2652308 A1	2007/11/22
		CL 14142007 A1	2008/02/01
		CN 101443025 A	2009/05/27
		EP 2026827 A1	2009/02/25
		JP 2009-537466 A	2009/10/29
		MX 2008014525 A	2008/11/27
		NO 20084949 A	2008/12/10
		NO 20085089 A	2008/12/16
		PE 02562008 A1	2008/05/22
		RU 2008149433 A	2010/06/27
		US 2009-0169623 A1	2009/07/02
		WO 2007-131677 A1	2007/11/22
		WO 2007-131677 A8	2008/12/11
KR 10-2009-0087709 A	2009/08/18	KR 10-0963465 B1	2010/06/17
KR 10-2010-0124609 A	2010/11/29	KR 10-1117072 B1	2012/02/22
KR 10-2014-0013791 A	2014/02/05	KR 10-1430636 B1	2014/08/18