



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0107557
(43) 공개일자 2025년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9789 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/532 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2024-0002278

(22) 출원일자 2024년01월05일

심사청구일자 2024년01월05일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김광동

경상남도 진주시 새평거리 30, 109동 2704호 (평거동, 엠코타운더프라하)

김정윤

경상남도 진주시 내동로348번길 10, 111동 903호 (가좌동, 가좌그린빌주공아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

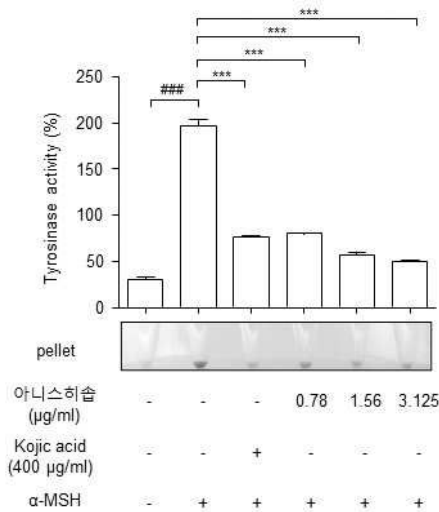
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 아니스히습 추출물은 세포독성이 없는 농도에서 α -MSH에 의해 증가된 티로시나아제 활성 및 멜라닌 합성을 억제하고, 멜라닌 합성 관련 단백질의 발현을 억제하는 효과가 우수하므로, 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 조성물은 피부 미백용 화장품, 건강기능식품 또는 멜라닌 색소 침착 질환의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 36/532 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A61K 2800/782 (2013.01)

(72) 발명자

이기원

경상남도 창원시 성산구 원이대로 774, 103동 251
 3호 (상남동, 성원아파트)

손윤곤

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

박아영

경상남도 진주시 개양로 9-4, 102호 (가좌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180995
과제번호	2021R1A2C1004847
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	멜라노솜 선택적 자가포식(멜라노파지)의 분자기전 규명
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711181092
과제번호	2021R1A5A8029490
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	항노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아니스히습 추출물의 추출용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이의 혼합물인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아니스히습 추출물은 아니스히습 씨앗 추출물인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 티로시나아제 활성 또는 멜라닌 합성을 저해하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 5

아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 멜라닌 색소 과다 침착 질환은 주근깨, 노인성 반점, 간반, 기미, 갈색 또는 흑점, 일광 색소반, 푸른흑피증(cyanic melasma), 약물 사용 후의 과다 색소 침착; 찰상, 화상 또는 피부염으로 인한 염증 후 과다 색소 침착; 또는 임신성 갈색반(gravidic chloasma)인 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대 사회에서 외모는 사회적 경쟁력 중 하나라는 인식이 증가하고 있으며, 의료 기술과 소득 수준이 향상됨에 따라 인간의 평균 수명이 증가하면서 건강한 삶과 아름다움에 대한 욕구가 강해지고 있다. 이러한 시대적 변화

와 관심의 증가를 바탕으로 화장품 분야의 시장 규모는 빠른 속도로 확대되고 있으며, 이와 관련된 연구가 다각도로 진행되고 있다.

[0003] 특히 색소 침착형의 기미(melasma)나 주근깨(freckle)와 같은 피부 미백에 대한 관심이 높아지고 있다. 사람의 피부색을 결정하는데는 다양한 요인들이 관여하는데, 그 중에서도 멜라닌 색소를 만드는 멜라노사이트(melanocyte)의 활동성, 혈관의 분포, 피부의 두께 및 카로티노이드, 빌리루빈 등의 인체 내외의 색소 관련 요인들이 중요하다.

[0004] 그 중 가장 중요한 요인은 인체 내의 멜라노사이트에서 티로시나제 등의 여러 효소가 작용하여 생성되는 멜라닌이라는 색소이다. 피부의 색소침착은 자외선이나 염증 등의 자극에 의해 야기되며 또 유전적 요인이나 호르몬, 식품 등과 화학물질 등의 인자에 의해서도 발생된다고 알려져 있다. 특히 기미, 주근깨, 색소침착 등과 같은 피부색소 이상침착 증상에 프로스타글란딘(prostaglandins), 히스타민(histamine), 알파-MSH(alpha-MSH), NO(Nitric oxide) 같은 염증 관련 인자가 관여되어 멜라노사이트(melanocyte) 내에서 멜라닌 생성을 활성화시키는 것은 잘 알려져 있다. 또한, 조직의 손상과 재생과정에서도 면역학적 매개체에 의해 과색소 침착이 수반된다는 보고도 있다.

[0005] 멜라닌 색소 합성을 구체적으로 살펴보면 멜라닌 세포(melanocytes)가 여러 요인에 의해 자극을 받으면 티로시나아제(tyrosinase)가 멜라노솜(melanosome)에서 멜라닌을 생성한다. 즉, 멜라닌 세포 내 티로신은 티로시나아제의 작용으로 도파(dopa)로 변하고, 이어 도파옥시다제(dopaoxidase)의 작용으로 도파퀴논(dopaquinone)으로 변환 후, 티로시나아제 관련 단백질 1(tyrosinase-related protein 1, 이하 TRP1이라고 함)과 티로시나아제 관련 단백질 2(tyrosinase-related protein 2, 이하 TRP2라고 함)의 작용에 의하여 멜라닌을 생성한다. 이러한 일련의 반응에서 티로시나아제는 멜라닌 색소 형성 과정의 속도-제한 반응을 활성화시키므로, 멜라닌 형성은 티로시나아제의 활성 및 발현에 의하여 1차적으로 제어된다. 또한, DOPA 크롬 상호변이효소로 알려진 TRP-2는 DOPA 크롬의 5,6-디하이드록시인돌-2-카르복실산(DHICA)로의 반응을 활성화시키고, TRP1은 DHICA를 카르복실인돌-퀴논으로 산화시킨다. 결과적으로 TRP1 및 TRP2는 불용성 색소인 멜라닌 형성의 최종단계인 중합반응에 관여한다. 이들 티로시나아제(tyrosinase), TRP1(tyrosinase-related protein 1), TRP2(tyrosinase-related protein 2)는 염증 매개물질에 의해 활성이 증가되어 멜라닌의 합성이 증가된다는 보고가 있다.

[0006] 현재 개발된 미백제로는 코지산, 알부틴, 글루타치온, 비타민 C 등이 있지만 소비자들이 만족할 만한 미백효과를 갖지 못하고 있으며, 피부 안전성 때문에 그 사용량이 제한적이다. 따라서 안정성이 검증된 천연물 소재를 이용하여 피부 미백에 효과적인 화장품 제품의 개발에 대한 요구가 증대하고 있다.

[0007] 한편, 아니스히습(*Agastache foeniculum*)은 높이 70~100cm 정도 자라는 다년초 또는 2년초다. 줄기는 네모지고 직립하며 가지는 갈라진다. 잎의 길이는 5~10cm로 난상 심장형으로 끝이 뾰족하다. 잎가에는 둔한 거치가 있고 엽병이 있다. 꽃은 7~9월에 피며 연보라색이다. 가지 끝과 원줄기 끝에 윤산화서로 달린다. 주로 꽃, 잎 또는 줄기를 이용하는 것으로 알려져 있다.

[0008] 꿀풀과의 히습과 닮았으며 잎에서 단맛의 아니스향이 나기 때문에 아니스히습이라고 한다. 풀의 모습이나 성질도 민트와 비슷하다. 어린 잎을 따서 만든 허브 차는 상쾌한 맛이 난다. 아메리카 원주민 사이에서는 기침을 멈추는 약으로 사용했다고 한다. 줄기 채 말려서 리스용 토대로 돌려 동계 색의 생화를 포인트로 꽂으면 이채로운 장식품을 만들 수 있다.

[0009] 한편, 한국등록특허 제2295904호에 개병풍 꽃 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1936294호에 애기수영 또는 산수국의 추출물을 유효성분으로 함유하는 주름개선 또는 피부 미백용 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물을 제공하고, 상기 아니스히습 추출물이 세포독성이 없는 농도에서 미백 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 아니스히습 추출물은 세포독성이 없는 농도에서 α -MSH에 의해 증가된 티로시나아제 활성 및 멜라닌 합성을 억제하고, 멜라닌 합성 관련 단백질의 발현을 억제하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 아니스히습 추출물의 B16F10 세포에 대한 세포독성을 확인한 결과이다.

도 2는 B16F10 세포에서, 아니스히습 추출물의 티로시나아제 활성 억제 효과를 확인한 결과이다. α -MSH를 처리하여 티로시나아제 활성을 유도하였다. 코지산(Kojic acid)은 양성 대조군이다. ###은 무처리군 대비 α -MSH 단독 처리군의 티로시나아제 활성이 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.001$ 이다. ***은 α -MSH 단독 처리군 대비 시료 처리군의 티로시나아제 활성이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.001$ 이다.

도 3은 B16F10 세포에서, 아니스히습 추출물 처리에 의한 세포 내 멜라닌 함량 변화를 확인한 결과이다. α -MSH를 처리하여 멜라닌 합성을 유도하였다. 코지산(Kojic acid)은 양성 대조군이다. ##은 무처리군 대비 α -MSH 단독 처리군의 멜라닌 함량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$ 이다. *, **은 α -MSH 단독 처리군 대비 시료 처리군의 멜라닌 함량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, *은 $p<0.05$, **은 $p<0.01$ 이다.

도 4는 B16F10 세포에서, 아니스히습 추출물의 멜라닌 합성 관련 단백질[TYR(tyrosinase), Trp1(tyrosinase related protein 1), PMEL fragment] 발현 억제 효과를 확인한 결과이다. α -MSH를 처리하여 멜라닌 합성 관련 단백질의 발현을 유도하였다.

도 5는 B16F10 세포에서, 아니스히습 추출물의 MITF(Microphthalmia-associated transcription factor) 단백질 및 인산화 MITF 단백질의 발현 억제 효과를 확인한 결과이다. α -MSH를 처리하여 멜라닌 생성을 유도하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에서 피부 미백 효과란, 자외선 노출, 호르몬 밸런스의 변화, 유전적 프로그램 등의 각종 요인에 의해 발생하는 거뭇한 피부나 기미, 주근깨, 다크서클을 개선 또는 방지하는 효과, 피부를 투명감 있는 아름다운 것으로 하거나, 투명감 있는 아름다운 피부를 유지하는 효과, 피부의 칙칙함을 경감하여 윤기·팽팽함을 증가시키는 효과 등을 의미한다.

[0018] 상기 추출물의 용매는 물, $C_1\sim C_4$ 의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물일 수 있고, 바람직하게는 에탄올이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 아니스히습 추출물은 아니스히습 씨앗 추출물이지만, 아니스히습의 어느 부위라도 사용할 수 있다.

[0020] 상기 조성물은 티로시나아제 활성 또는 멜라닌 합성을 저해하는 효과가 있다.

[0021] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있고, 보다 상세하게는, 스킨, 스킨 소프트너, 스킨토너, 아스트린 젤트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 아이 크림, 모이스처 크림, 핸드크림,

에센스, 영양에센스, 팩, 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디로션, 바디클렌저, 비누 또는 파우더의 화장품 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

- [0022] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로 히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조 에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0025] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 화장품 조성물은 상기 유효성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제 (foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나과 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 제형으로 제조할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 상기 건강기능성 식품은 바람직하게는, 이너뷰티(inner beauty) 식품 형태로 섭취함으로써 더욱 우수한 효과를 갖는 장점을 가진다. 상기 이너뷰티(inner beauty) 식품은 '먹는 화장품 또는 뷰티 식품'으로 일컬어지는 식품으로, 피부에 좋은 여러 가지 성분을 몸속으로 흡수시켜 피부 체질을 건강하게 바꾸는 식품을 지칭하며, 피부 타입에 맞는 화장품을 고르듯 피부 컨디션과 라이프스타일을 고려해 개개인에게 맞는 이너뷰티 식품을 선택하여 섭취할 수 있다. 더 바람직하게는 피부 미백 효과를 나타내는 화장품과 상기 유효성분을 포함하는 이너뷰티 식품을 혼용할 경우, 화장품만 사용하는 것에 비해 피부 미백 효과가 월등히 높아져 더욱 효과적으로 피부 미백 효과를 볼 수 있는 장점을 가진다.
- [0030] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0031] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0032] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.
- [0033] 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알

긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0034] 또한, 본 발명은 아니스히습 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 용어 "멜라닌 색소 과다 침착(hyperpigmentation)"은 피부 또는 손발톱의 특정 부위에서 멜라닌의 과도한 증가에 의해 다른 부위에 비해 검게 또는 어둡게 되는 것을 의미한다. 상기 멜라닌 색소 과다 침착 질환은 주근깨, 노인성 반점, 간반, 기미, 갈색 또는 흑점, 일광 색소반, 푸른흑피증(cyanic melasma), 약물 사용 후의 과다 색소 침착; 찰상, 화상 또는 피부염으로 인한 염증 후 과다 색소 침착; 또는 임신성 갈색반(gravidic chloasma) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0036] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있고, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0038] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0039] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0040] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며, 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0043] 이하, 제조예 및 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 제조예 및 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0045] 제조예 1. 아니스히습 추출물의 제조

[0046] 아니스히습 씨앗 100g을 에탄올 500mL에 침지시킨 후, 소니케이터(sonicator)를 이용해 상온에서 2시간 동안 추출하였다. 2시간 후, 이를 여과한 다음 추출 용액을 감압 농축하여 용매를 완전히 제거한 후, 미백 활성을 확인하기 위한 시료로 사용하였다.

[0048] **실시예 1. B16F10 세포에 대한 아니스히습 추출물의 세포독성 확인**

[0049] B16F10 마우스 멜라노마 세포(mouse melanoma cell) 라인은 ATCC(American Type of Culture Collection, USA)로부터 제공받았으며, 상기 세포는 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum) 및 1%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신(Sigma-Aldrich, USA)이 첨가된 DME(Dulbecco's Modified Eagle's) 배지를 사용하여, 37℃, 5% CO₂ 가습 배양기에서 배양되었다.

[0050] 아니스히습 추출물의 B16F10 세포주에 대한 세포독성을 확인하기 위해, 96웰 플레이트의 각 웰에 0.05×10^5 개의 세포를 분주한 후, 37℃, 5% CO₂ 가습 배양기에서 1일 동안 안정화시켰다. 그 후, DMSO에 용해한 아니스히습 추출물을 농도별로 처리한 후, 37℃, 5% CO₂ 가습 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후, 세포가 죽은 부분을 육안으로 확인하였고, MTT 용액(5μg/mL)을 각 웰당 200μL씩 첨가한 후, 1시간 30분 동안 반응시킨 다음 배지를 모두 제거하고, DMSO를 각 웰당 200μL씩 분주한 후, 암 조건의 실온에서 20분 동안 반응시켰다. 그 후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Bio-Rad)를 이용하여 655 및 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0051] 그 결과, 도 1에 개시된 바와 같이 3.125μg/mL에서 세포 생존율이 80%인 것을 확인하여, 이후 실험에서는 아니스히습 추출물을 3.125μg/mL 농도까지 사용하였다.

[0053] **실시예 2. B16F10 세포에서, 아니스히습 추출물의 티로시나아제(tyrosinase) 활성 억제 효과**

[0054] 티로시나아제(tyrosinase) 활성은 L-DOPA 산화(L-DOPA oxidation)로 측정하였다.

[0055] B16F10 세포를 6웰 플레이트의 각 웰에 1×10^5 개 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 상기 세포에 시료 및 α-MSH를 처리한 후, 48시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, PBS로 세척한 다음 1mL의 PBS를 이용하여 배양된 세포를 수확(2,000rpm, 5분, 4℃)하였다. 그 후, PBS를 제거한 다음 50μL의 1% 트리톤 X-100(Triton X-100) 용액을 첨가한 후, 얼음에서 30분 동안 용해시켰다. 그 후, 4℃, 12,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액(단백질 용액)을 획득한 다음 단백질을 정량하였고, 단백질이 40μg이 되도록 1% 트리톤 X-100에 희석하여 총 132μL를 제작한 후, L-DOPA(2mg/mL) 330μL를 넣고 혼합(vortexing)하였다. 이후, 혼합물을 140μL씩 96웰 플레이트의 각 웰에 옮기고 37℃ 암 조건에서 4시간 동안 반응시킨 후, 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 블랭크(Blank) 군은 1% 트리톤 X-100 40μL에 L-DOPA(2mg/mL) 100μL를 혼합한 후, 동일 조건하에 반응시켜, 흡광도를 측정하였다.

[0056] 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 본 발명의 아니스히습 추출물은 α-MSH 처리에 의해 증가된 티로시나아제 활성을 현저히 억제하였다.

[0058] **실시예 3. B16F10 세포에서, 아니스히습 추출물의 멜라닌 합성 억제 효과**

[0059] B16F10 세포를 6웰 플레이트의 각 웰에 1×10^5 개 분주하고, 24시간 동안 배양시킨 다음, 상기 세포에 시료 및 α-MSH를 처리하여 48시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, PBS로 세척한 다음 1mL의 PBS를 이용하여 배양된 상기 세포를 수확(2,000rpm, 5분, 4℃)하였다. 그 후, PBS를 제거한 다음 펠렛 사진을 촬영한 후, 건조 오븐(65℃)에서 1일 동안 건조하였다. 이후, 건조된 펠렛에 1M NaOH를 70μL씩 분주한 후, 다시 건조 오븐(65℃)에서 16시간 동안 건조한 다음 21℃, 13,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층의 DNA 층을 제거한 다음 96웰 플레이트의 각 웰에 55μL씩 분주한 후(블랭크=1M NaOH 55μL), 415nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0060] 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 본 발명의 아니스히습 추출물은 α-MSH 처리에 의해 증가된 세포 내 멜라닌 함량을 유의적으로 감소시켰다.

[0062] **실시예 4. B16F10 세포에서, 아니스히습 추출물의 멜라닌 합성 관련 단백질 발현 억제 효과**

[0063] B16F10 세포를 6웰 플레이트의 각 웰에 1×10^5 개 분주하고, 24시간 동안 배양시킨 다음, 상기 세포에 시료 및 α-MSH를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 후, PBS로 세척한 다음 1mL의 PBS를 이용하여 배양된 상기 세포를 수확(2,000rpm, 5분, 4℃)하였다. 그 후, PBS를 제거한 다음 50μL의 CETi 단백질 용해 버퍼를 첨가한 후, 30분 동안 얼음에서 반응시켰다. 그 후, 4℃, 12,000rpm으로 40분 동안 원심분리한 후, 상층액을 취한 다음 단백

질을 정량하였다.

[0064] 상기 단백질은 동량 로딩한 후, 10~15% SDS-PAGE 상에서 분리한 다음, PVDF 멤브레인(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 트랜스퍼(transfer)하였다. 그 후, 상기 멤브레인은 0.1% 트윈 20을 함유하는 TBS(tris-buffer saline)에 1시간 동안 5% 스킵 밀크(skim milk)와 함께 반응시킨 후, 일차 항체(primary antibody)와 4℃에서 1일 동안 반응시켰다. 티로시나아제(TYR)에 대한 1차 항체는 라이프 스파 바이오(LifeSpan bio, LS-C192923), TRP1(tyrosinase related protein 1)은 산타쿠르즈(Santa Cruz, sc-393942), PMEL17/gp100 항체는 abcam(abcam, ab37078)으로부터 구매하였으며, 신호 감지(Signal detection)는 향상된 화학발광(chemiluminescence, Bio-Rad)을 통해 확인하였다.

[0065] 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 α -MSH 처리에 의해 증가된 멜라닌 합성 관련 단백질의 발현이 아니스히습 추출물 처리에 의해 감소하였다.

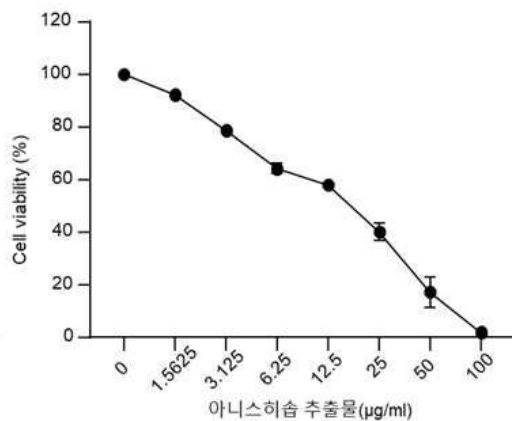
[0067] 실시예 5. B16F10 세포에서, 아니스히습 추출물의 MITF(Microphthalmia-associated transcription factor) 단백질 발현 억제 및 MITF의 인산화 억제 효과

[0068] 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 단백질을 추출한 후, 웨스턴 블랏을 통해 MITF 단백질의 발현 및 인산화 변화를 확인하였다.

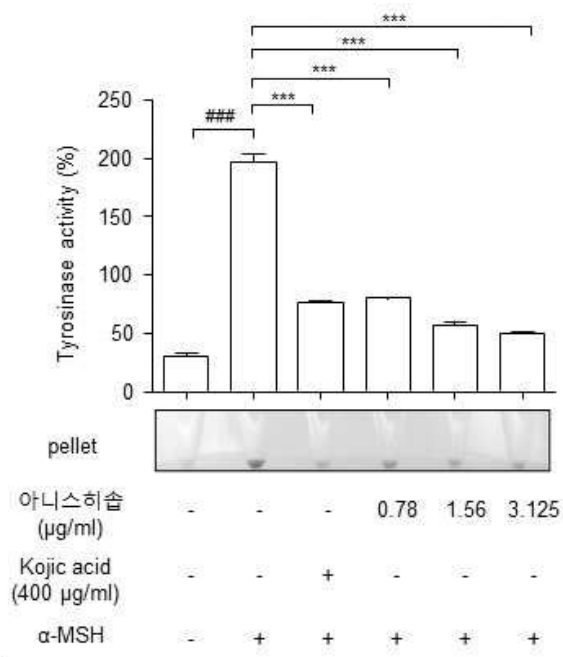
[0069] 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 α -MSH 처리에 의해 증가된 MITF 단백질 발현 및 MITF 단백질의 인산화 정도가 아니스히습 추출물 처리에 의해 감소하였다.

도면

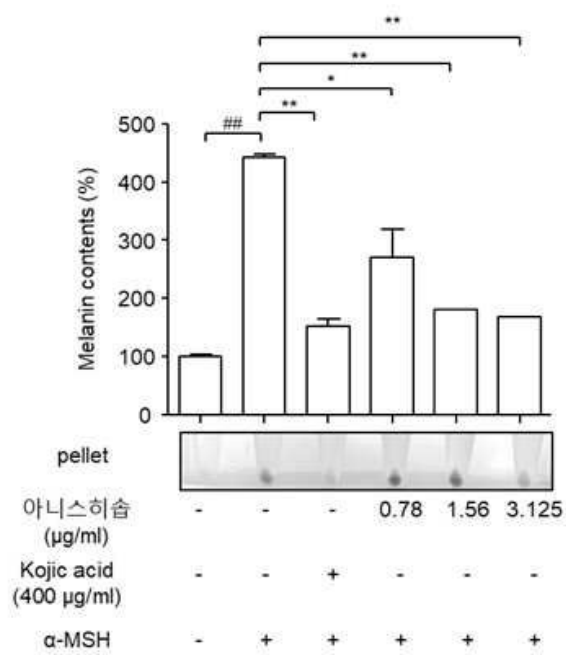
도면1



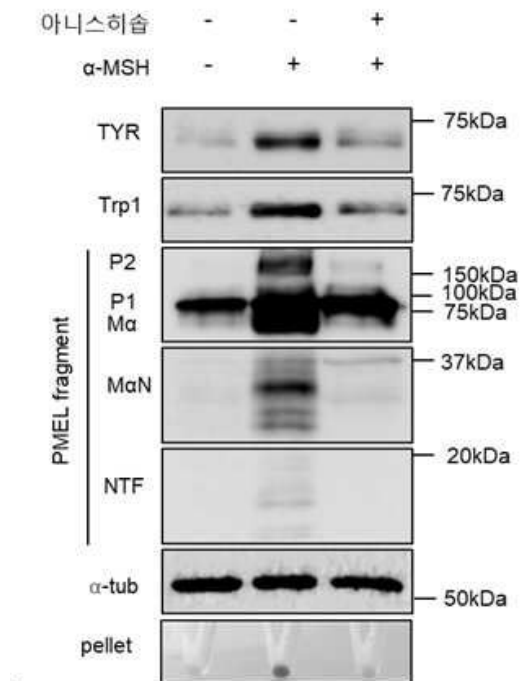
도면2



도면3



도면4



도면5

