



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월11일
(11) 등록번호 10-2264006
(24) 등록일자 2021년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 8/36 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0114647
(22) 출원일자 2020년09월08일
심사청구일자 2020년09월08일
(56) 선행기술조사문헌
JP2000119133 A*
JP2018058800 A*
KR1020190100791 A
KR1020120131948 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)티이엔
경기도 용인시 기흥구 동백중앙로16번길 16-4,
601호~611호(중동, 에이스동백타워2단지)
(72) 발명자
신증진
경기도 용인시 기흥구 흥덕3로 20, 1205동 702호
(영덕동, 흥덕마을 신동아파밀리에)
최동식
경기도 광주시 오포읍 상태길68번길 17-9, 105동
101호 (동심 9차)
(74) 대리인
특허법인아이피센트

전체 청구항 수 : 총 5 항

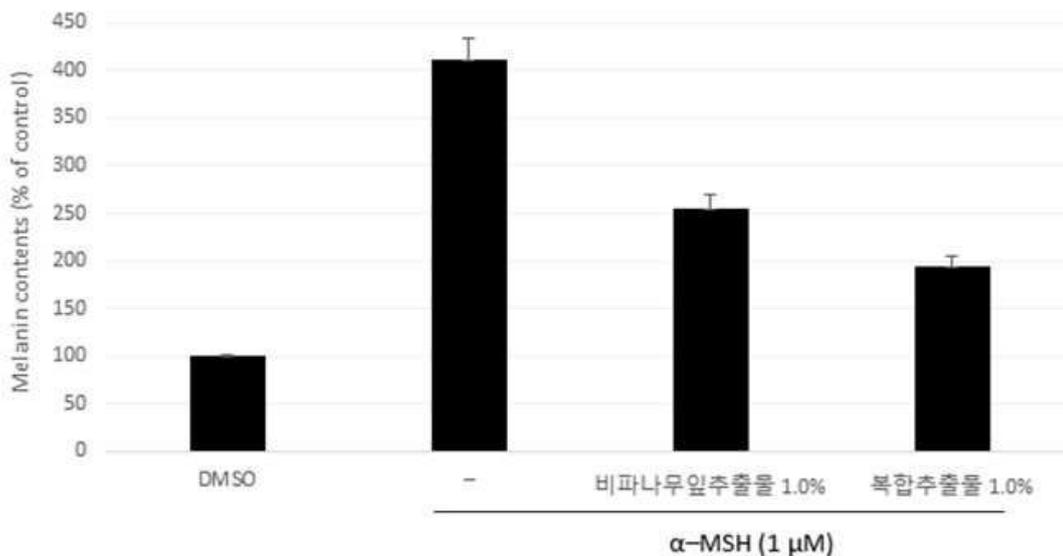
심사관 : 박지한

(54) 발명의 명칭 멜라닌 생성 억제 및 분해 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 비파나무 잎 및 스피어민트의 추출물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 멜라닌 생성 억제 및 분해 촉진 효과가 우수하여, 화장품, 식품, 의약품 등 다양한 분야에 적용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

- A61K 8/36* (2013.01)
- A61Q 19/00* (2013.01)
- A61Q 19/02* (2013.01)
- A23V 2002/00* (2013.01)
- A23V 2200/318* (2013.01)
- A23V 2250/30* (2013.01)
- A61K 2800/5922* (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

우르솔산을 함유하는 비파나무 잎 및 스피어민트의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 멜라닌 분해 촉진용 조성물로서,

상기 조성물은 기 생성된 멜라닌을 오토파지에 의해 분해하는 것인, 멜라닌 분해 촉진용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 복합 추출물은 물, 알코올, 또는 이들의 혼합물 중에서 선택된 용매를 이용하여 수득된 것을 특징으로 하는, 멜라닌 분해 촉진용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 화장료 조성물인 것을 특징으로 하는, 멜라닌 분해 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는, 멜라닌 분해 촉진용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 피부암, 잡티, 기미, 주근깨, 검버섯, 흑색종, 일광흑색증, 노인성 색소반, 반점, 유전적 요인의 과색소침착, 또는 대사 또는 약물 관련 기원의 과색소침착 중에서 선택되는 피부색소침착 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물인 것을 특징으로 하는, 멜라닌 분해 촉진용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비파나무 잎 및 스피어민트의 추출물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 멜라닌 생성 억제 및 분해 촉진 효과가 우수하여, 화장품, 식품, 의약품 등 다양한 분야에 적용될 수 있다.

[0002] 멜라닌 분해 촉진용

배경 기술

[0003] 인간의 피부는 노화 과정에서 다양한 물리화학적 변화가 일어나며, 노화는 그 원인에 따라 내적인 노화 (intrinsic aging)와 광노화(photo-aging)로 크게 구분될 수 있다. 자외선, 스트레스, 질병 상태, 환경인자, 상처, 나이가 들어감 등에 따라 자유라디칼이 활성화되어 피부 노화가 야기될 수 있으며, 이런 상태가 심화될

경우 생체 내에 존재하는 항산화 방어망을 파괴하고 세포 및 조직을 손상시키는데 이를 수 있다. 즉, 피부의 주요 구성물질인 지질, 단백질, 다당류, 핵산 등이 산화되어 피부세포 및 조직이 파괴됨에 따라, 피부 노화가 더 심해지게 된다. 특히, 단백질의 산화는 피부의 결합조직인 콜라겐, 히알루론산, 엘라스틴, 프로테오글리칸, 피브로넥틴 등이 절단되어 심한 과다 염증반응을 일으키고 피부 탄력을 저하시키며, 이것이 더 심해질 경우 DNA 변이에 의해 돌연변이, 암 유발, 면역기능 저하를 야기한다.

[0004] 피부의 노화 과정에서 색소 침착에 의한 피부 변화가 수반되며, 이때 피부색에 영향을 주는 색소에는 멜라닌, 멜라조이드, 카로틴, 헤모글로빈 등이 있다. 이중 가장 중요한 것은 멜라닌으로, 멜라닌의 생합성에 영향을 미치는 요인은 자외선과 체내 호르몬 분비 정도이다. 멜라닌은 특별한 최대 흡수 파장이 없으며 전 영역의 빛을 흡수한다. 또한, 멜라닌은 활성산소종을 제거하는 기능이 탁월하나, 때로는 멜라닌 자체가 활성산소를 발생시키기도 하며, 멜라닌 구조 내의 카테콜이나 퀴논에 의하여 다른 물질을 환원시키거나 산화시키고, 멜라닌 자체가 자유라디칼의 성질을 나타내기도 한다. 따라서, 멜라닌은 UV를 흡수하는 역할을 통해 피부세포를 UV에 의한 손상으로부터 보호하는 역할도 하지만, 멜라닌형성(melanogenesis)이 과도하게 진행되면 멜라닌이 피부에 과다 침착하여 기미, 주근깨, 흑색종과 같은 피부색소침착 질환을 야기하므로, 멜라닌의 양의 균형을 적정 수준으로 유지하는 것이 요구된다.

[0005] 따라서, 멜라닌을 효과적으로 조절할 수 있는 물질을 찾아내기 위하여, 약학, 화장품학, 식품 등 다양한 분야에서 연구가 활발히 진행 중이다. 그러나, 현재까지 연구된 결과는 멜라닌의 생합성 과정에 있어서 멜라닌의 생성을 저해하는 효능, 즉 예방학적 효능을 나타내는 물질에 대한 것들이 대부분이다. 반면, 기 생성된 멜라닌을 효율적으로 분해할 수 있는 물질, 즉 예방적인 효능에 그치지 않고 치료적인 효능도 나타낼 수 있는 물질에 대해서는 미충족 수요가 크게 존재한다.

[0006] 오토파지(autophagy)는 세포 내에서 손상되거나 불필요하게 된 구성요소 또는 세포 소기관을 분해하여 에너지원으로 재생산하는 과정을 일반적으로 지칭한다. 세포 내에서 더 이상 필요없게 된 단백질 또는 세포 구성성분들은 오토파지 활성이 증가됨에 따라 오토파고솜(autophagosome) 막으로 둘러싸여 자가소포체를 형성한다. 여기에 리소좀이 융합한 후, 리소좀 내의 가수분해효소가 자가소포체 내의 물질을 분해하여 방출한다. 이와 같이 방출된 산물은 새로운 세포 소기관을 생성할 때 사용된다.

[0007] 최근 오토파지에 대한 관심이 높아지면서 다양한 연구가 진행되고 있으며, 피부 노화 과정에서 중요한 역할을 하는 멜라닌이 오토파지에 의해 분해될 수 있다는 점에 대해서도 보고되고 있다. 이에 따라, 멜라노사이트에서 기 생성된 멜라닌을 오토파지에 의해 효과적으로 분해할 수 있는 물질에 대한 필요성이 매우 높다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 본 발명자들은 오랜 기간 동안 연구한 결과, 비파나무 잎 및 스피어민트의 추출물이 멜라닌 생성 억제 효과 뿐만 아니라 멜라닌 분해 촉진 효과가 현저하게 우수하다는 점을 실험적으로 입증하여, 본 발명에 이르게 되었다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일구현예에 따르면, 비파나무 잎 및 스피어민트의 추출물을 포함하는 멜라닌 생성 억제 및 멜라닌 분해 촉진용 조성물이 제공된다.

[0010] 상기 비파나무는 장미목 장미과에 속하며, 그 잎을 비파엽이라고 지칭하고 그 종자를 비파인이라고 지칭한다. 학명은 Eriobotrya Japonica이며, 한국, 일본, 중국 등에 분포한다. 비파나무 잎은 INCI(화장품 원료에 대한 국제 명명법; International Nomenclature Cosmetic Ingredient) 및 CFDA(중국 식품 및 약품 관리총구; Chinese Food and Drug Administration)에 등록되어 있다.

[0011] 상기 스피어민트는 박하속에 속하며, 학명은 Mentha Viridis, Mentha spicata 또는 Spearmint이며, 유럽과 아시아 등에 분포한다. 스피어민트는 INCI(화장품 원료에 대한 국제 명명법; International Nomenclature Cosmetic Ingredient) 및 CFDA(중국 식품 및 약품 관리총구; Chinese Food and Drug Administration)에 등록되어 있다.

[0012] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 비파나무 및 스피어민트는 재배한 것, 채취한 것 또는 시판되는 것 등이 제한

없이 사용될 수 있다.

- [0013] 본 발명에 사용되는 용어 "원물"은 원료가 되는 물질로서, 추출하기 이전의 원료 물질을 가리킨다.
- [0014] 본 발명에 사용되는 용어 "추출물"은 생약을 적절한 추출용매로 추출하여 수득한 결과물을 의미하는데, 여기에는 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물 또는 정제물, 또는 분획물이 포함되는 것으로 해석된다. 바람직하게는, 비과나무 잎 및 스피어민트의 복합물을 추출함으로써, 예를 들어 비과나무 잎 및 스피어민트 지상부가 건조된 형태의 조합물을 추출함으로써, 본 발명에 따른 조성물의 유효성분을 수득할 수 있다.
- [0015] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 일반적인 추출방법을 이용하여 제조할 수 있으며, 예를 들어 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출, 고온가압 추출 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 따른 추출물을 제조하기 위해 사용되는 추출용매로는 물; 메탄올, 에탄올, 프로필알코올, 부틸알코올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올; 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 다가알코올; 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 벤젠, 헥산, 디에틸에테르, 디클로로메탄 등의 탄화수소계 용매; 또는 이들의 혼합 형태가 포함될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 알코올이 추출용매로 사용될 수 있으며, 특히 바람직하게는 70% 에탄올이 사용될 수 있다. 상기 추출용매는 복합물의 건조 중량에 대해 약 4 내지 50배의 양으로 사용될 수 있다.
- [0017] 바람직하게는, 본 발명의 조성물의 제조방법에 있어서 복합 추출물은 a) 비과나무 잎과 스피어민트를 70% 에탄올로 환류 추출하는 단계에 따라 수득할 수 있다. 예를 들어, a) 단계에서, 4℃ 내지 80℃의 온도에서 1 내지 24 시간 동안 70% 에탄올을 사용하여 비과나무 잎과 스피어민트를 추출할 수 있다.
- [0018] 선택적으로, 상기 a) 단계에 앞서, 비과나무 잎과 스피어민트의 원물을 세척하고 건조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0019] 선택적으로, b) 여과하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 b) 단계에서, 1.0 ~ 0.2 μm 필터로 여과할 수 있다.
- [0020] 선택적으로, c) 감압 농축하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0021] 선택적으로, d) 여과액 또는 농축액을 분획하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0022] 선택적으로, e) 오픈 컬럼 크로마토그래피를 통해 분획물을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 a), b), c), d) 또는 e) 단계에서 수득된 복합 추출물은 본 발명에 따른 조성물의 유효성분으로 포함될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또다른 구현예에 따르면, 비과나무 잎 및 스피어민트의 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물이 제공된다.
- [0026] 본 발명에 따른 화장료 조성물에 유효성분으로서 포함되는 추출물의 함량은 사용 목적, 사용 기간, 제형 종류, 투여 경로, 대상체의 피부 상태, 대상체의 멜라닌 축적 정도 등 다양한 요인을 고려하여 적절하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 복합 추출물의 함량은 화장료 조성물 전체 중량을 기준으로 0.0001 내지 10 중량%, 예컨대 0.001 내지 5 중량%일 수 있다.
- [0027] 상기 비과나무 잎 및 스피어민트는 복합 추출물의 전체 중량을 기준으로 각각 2 내지 98 중량%일 수 있다. 바람직하게는, 상기 비과나무 잎 및 스피어민트의 복합 추출물은 비과나무 잎 50.0 ~ 98.0 중량부 및 스피어민트 2.0 ~ 50.0 중량부를 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 통상적으로 알려진 제조방법을 이용하여, 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형 등의 형태로 제조될 수 있다. 이때, 본 발명의 화장료 조성물은 패치류, 연고류, 피부접착용 겔류, 크림류, 팩류, 화장수류, 에센스류, 스프레이류, 마스크류, 파운데이션류, 메이크업베이스류, 세정제류, 수(W)형, 유(O)형, 실리콘(S)형, 수중유(O/W)형, 유중수(W/O)형, 실리콘중수(W/S)형, 수중실리콘(S/W)형, 고체상, 액상 등의 다양한 제형으로 제조될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 화장료 제조방법이 적용될 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 효능 증진을 위해 상기 추출물 이외에 추가 성분을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 추가 성분은 추출물의 효능을 상쇄시키거나 감소시키지 않는다면 제한이 없다. 선택적으로, 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제, 담체 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택적으로, 화장품 기능을 부가하거

나 증대시키기 위하여 전형적으로 사용되는 성분들이 또한 추가될 수 있다. 예를 들면, 안정화제, 유화제, 점증제, 보습제, 액정 막강화제, pH 조절제, 향균제, 수용성 고분자, 피막제, 금속 이온 봉쇄제, 아미노산, 유기 아민, 고분자 에멀션, pH 조절제, 피부 영양제, 산화 방지제, 산화 방지조제, 방부제, 향료 등에서 선택되는 하나 이상의 수성 첨가제; 및 유지류, 왁스류, 탄화 수소유, 고급 지방산유, 고급 알콜, 합성 에스테르유 및 실리콘 유 등에서 선택되는 하나 이상의 유성 첨가제 동일 수 있다.

- [0031] 본 발명의 또다른 구현예에 따르면, 비과나무 잎 및 스피어민트의 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물이 제공된다.
- [0032] 상기 식품은 건강기능성 식품일 수 있다. 상기 용어 "건강기능성 식품"이란, 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환제 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 의미한다. 여기서 "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0033] 본 발명에 따른 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물은 천연 식물 추출물을 유효성분으로서 포함하므로, 장기 복용 시 일반적으로 발생할 수 있는 부작용 또는 내성이 없다. 따라서, 본 발명에 따른 식품 조성물은 단독으로 사용하는 것도 가능할 뿐만 아니라, 멜라닌 생성 억제 및 멜라닌 분해 효과를 극대화하기 위한 목적으로 본 발명에 따른 화장료 조성물, 약학 조성물, 및/또는 다른 조성물 또는 다른 요법과 동시에 또는 순차적으로 사용하는 것도 가능하다.
- [0034] 본 발명에 따른 식품 조성물에 유효성분으로서 포함되는 추출물의 함량은 사용 목적, 사용 기간, 대상체의 피부 상태 또는 멜라닌 축적 정도, 원하는 효과 발생 시기 등에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 복합 추출물의 함량은 식품 조성물 전체 중량을 기준으로 0.0001 내지 100 중량%, 예컨대 0.001 내지 10 중량%일 수 있다.
- [0035] 상기 비과나무 잎 및 스피어민트는 복합 추출물의 전체 중량을 기준으로 각각 2 내지 98 중량%일 수 있다. 바람직하게는, 상기 비과나무 잎 및 스피어민트의 복합 추출물은 비과나무 잎 50.0 ~ 98.0 중량부 및 스피어민트 2.0 ~ 50.0 중량부를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 식품 조성물은 효능 증진을 위해 유효성분 외에 추가 성분을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 추가 성분은 복합 추출물의 효능을 상쇄시키거나 감소시키지 않는 한, 기 생성된 멜라닌의 분해를 억제하는 효과를 나타내는 성분 또는 제제, 멜라닌의 생성을 차단 또는 억제하는 효과를 나타내는 성분 또는 제제 동일 수 있다.
- [0037] 상기 식품 조성물은 환제, 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상 등의 제형일 수 있다. 또한, 상기 식품의 종류는 특별한 제한되지 않는다. 상기 식품 조성물이 첨가될 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품에 사용되는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스 와 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제, 또는 사카린, 아스파르트마과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또다른 구현예에 따르면, 비과나무 잎 및 스피어민트의 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0041] 상기 약학 조성물은 피부색소침착 질환의 치료 또는 예방용으로 제공될 수 있다. 멜라닌은 UV를 흡수하는 역할을 통해 피부세포를 UV에 의한 손상으로부터 보호하는 역할을 하므로, 인간에게 필수적인 성분이다. 본 발명에서 사용되는 용어 "피부색소침착 질환"이란, 멜라닌 색소와 같은 피부색소가 적정 수준보다 과다 생성됨에 따라 피부에 침착되어 야기되는 질환을 의미한다. 예를 들어, 피부암, 잡티, 기미, 주근깨, 검버섯, 흑색종, 일광흑색증(solar tignes), 노인성 색소반, 반점, 유전적 요인의 과색소침착, 대사 또는 약물 관련 기원의 과색소침착 등이 포함될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 피부색소침착 질환의 증상이 호전되

거나 완치되는 모든 행위를 의미한다. 또한, 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 피부색소침착 질환의 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명에 따른 약학 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태, 연령, 성별 등에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 친남성 추출물은 약학 조성물 전체 중량을 기준으로 약 0.0001 내지 100 중량%의 양으로 포함될 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 약학 조성물은 의약품의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제는 예를 들어 락토오스, 텍스트로오스, 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 또는 광물유일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명에 따른 약학 조성물은 경구 투여 제형일 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 당업자에게 잘 알려진 기술을 이용하여 국소 투여를 위한 적합한 투여 제형으로 제형화될 수 있고, 상기 제형은 외용제, 발포정, 좌제 등을 포함할 수 있다. 일구현예에서, 본 발명의 약학 조성물은 상기 추출물을 당해 기술분야에서 잘 알려지고 일반적으로 사용되는 기제(base)와 혼합하여 외용제로 제형화될 수 있다. 상기 외용제는 에멀전, 겔, 연고, 크림, 패치, 리니먼트, 파우더, 에어로졸, 스프레이, 로션, 세럼, 페이스트, 폼, 점적제, 현탁액 또는 팅크 등일 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 대상체에게 투여된다. 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 환자의 연령, 성별, 체중, 투여 경로, 질병의 정도 등에 따라 0.1 내지 100 mg/kg을 일일 1회 내지 수 회 투여할 수 있으며, 상기 범위에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에 대해서는 하기의 실시예와 본 명세서에 첨부된 도면에 기초하여 보다 상세하게 설명될 것이나, 이는 본 발명의 권리범위를 제한하려는 것이 아니다. 또한, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 취지를 해하지 않는 범위 내에서 본 발명에 대해 다양한 변형 및 수정을 가할 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0048] 본 발명에 따른 복합 추출물을 포함하는 조성물은 피부 내 오토파지 활성을 유의적으로 증진시킬 수 있으며, 이에 따라 기 생성된 멜라닌의 분해를 촉진하는 것이 가능하다. 또한, 멜라닌의 과생성을 유의적으로 억제할 수 있다.

[0049] 특히, 기 생성된 멜라닌의 분해 속도가 빠르므로, 과다 생성된 멜라닌으로 인해 발생하는 상태 또는 질환의 개선 또는 치료 효과를 신속하게 나타낼 수 있다. 따라서, 미용 효과를 조기에 얻고자 하는 대상체, 또는 멜라닌 과다침착으로 인한 질환을 앓고 있는 환자에게 유용하다.

[0050] 더욱이, 본 발명에 따른 조성물에 유효성분으로서 포함되는 복합 추출물은 후술하는 시험에서 멜라닌을 독성 없이 분해한다는 것이 입증되었는바, 인체에 대한 안전성이 보장된다.

[0051] 이와 같은 본 발명의 조성물은 멜라닌 분해가 필요한 다양한 분야에 적용될 수 있는바, 화장품의 형태로 제공될 수도 있으며, 또다르게는 기능성 식품 또는 식품보충제의 형태로 제공될 수도 있으며, 의약품의 형태로 제공될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 B16F1 흑색종에 대해 비파나무 잎 단일 추출물과 본 발명의 복합 추출물을 처리하였을 때 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 B16F1 흑색종에 대해 비파나무 잎 단일 추출물과 본 발명의 복합 추출물을 처리하였을 때 멜라닌 생성 억제 활성을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 B16F1 흑색종에 대해 본 발명의 복합 추출물의 정제 공정을 통해 수득한 우르솔산을 처리하였을 때 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내 그래프이다.
- 도 4는 B16F1/GFP-LC3 흑색종에 대해 본 발명의 복합 추출물의 정제 공정을 통해 수득한 우르솔산을 처리하였을 때 오토파지 팩터(Autophagy factor) 활성을 나타내는 형광염색 현미경 사진, 및 녹색 형광 강도를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하에서 본 발명의 이해를 돕기 위해 구체적인 예를 들어 설명하기로 한다. 그러나, 하기의 실시예가 본 발명을 한정하는 것으로 해석되어서는 안 되며, 본 발명의 범위 내에서 당업자의 통상적인 변화가 가능하다.

[0055] **실시예 1**

[0056] 비파나무 잎 및 스피어민트를 시판되는 것을 구매하여 본 실험에 사용하였다. 비파나무 잎 및 스피어민트를 포함하는 원물 5kg(총 중량)은 다음과 같은 조성비로 준비하였다: 비파나무 잎 4.0kg (80.0 중량%), 스피어민트 1.0kg (20.0 중량%). 상기 원물에 10배 부피의 70% 에탄올을 첨가하여 80℃에서 3시간 동안 추출하고, 냉각 및 여과를 수행하고 농축건조하였다. 이에 따라 수득된 생성물을 후술하는 시험예에 사용하였다.

[0058] **비교예 1**

[0059] 상기 실시예 1처럼 준비한 비파나무 잎 5kg(총 중량)에 10배 부피의 70% 에탄올을 첨가하여 80℃에서 3시간 동안 추출하고, 냉각 및 여과 후 농축건조하였다. 이에 따라 수득된 생성물을 후술하는 시험예에 사용하였다.

[0061] **시험예 1: B16F1 흑색종에 대한 세포 독성**

[0062] 상기 실시예 1의 복합 추출물과 비교예 1의 비파나무 잎 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 세포생존율(cell viability)을 측정하였다.

[0063] 구체적으로, B16F1 흑색종(melanoma) 세포를 96-웰 플레이트에 6×10^3 cells/well이 되도록 분주하였다. 세포를 배양하기 위한 배지로서 10% FBS 및 1% Penicillin-Streptomycin(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 첨가된 DMEM 배지를 사용하였다. 그 후, 37℃에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 하루 동안 배양하였다. 배지 상등액을 모두 제거한 후, α -MSH 1 μ M와 1% 농도의 시료가 처리된 배양배지를 첨가하고, 37℃에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 24 시간 동안 배양하였다.

[0064] MTS(Promega, G3581, Cell titer 96 Aqueous One Solution) 20 μ l를 첨가하고, 37℃에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 반응시킨 후, Envision(Perkin-Elmer, A485-MTS assay 96-well)을 이용하여 세포수를 측정하였다.

[0065] 실험 결과를 나타낸 도 1에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 따른 추출물은 0.5 ~ 1.0%의 사용량을 B16F1 흑색종 세포에 처리하였을 때, DMSO를 사용한 음성대조군에 비해 세포생존율의 유의적인 차이가 없었으며, 90% 이상의 세포생존율을 나타내었다.

[0066] 따라서, 본 발명에 따른 추출물은 고농도로 사용하더라도 B16F1 흑색종 세포의 생존율에 대해 영향을 미치지 않는다. 이는 본 발명에 따른 추출물이 정상세포에 대한 독성과 같이 예상하지 못한 부작용을 나타내지 않는다는 것을 의미한다.

[0068] **시험예 2. B16F1 흑색종 세포 내의 멜라닌 생성 저해**

[0069] B16F1 흑색종 세포를 6-웰 플레이트에 6×10^4 cells/well이 되도록 분주하였다. 세포를 배양하기 위한 배지로서 10% FBS 및 1% Penicillin-Streptomycin(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 첨가된 DMEM 배지를 사용하였다. 그 후, 37℃에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 하루 동안 배양하였다. 배지 상등액을 모두 제거한 후, α -MSH 1 μ M이

처리된 배양배지를 첨가하고, 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다. 여기서, α-MSH는 α-멜라노사이트 자극 호르몬(α-melanocyte stimulating hormone)을 가리키는 것으로서, 멜라닌 생성을 유도하는 물질이다. 그 후, 1% 농도의 시료를 배양배지를 첨가하고, 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 Trypsinisation을 통해 세포를 회수하고, Solubilisation buffer에서 100°C에서 30분 동안 처리하여 용해하여, 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

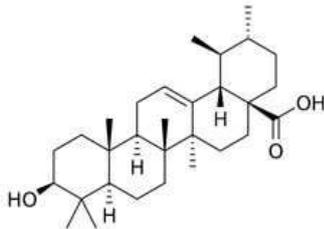
[0070] 실험 결과를 나타낸 도 2에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에 따른 복합추출물은 비파나무 잎 단일 추출물에 비해 멜라닌 생성성을 유의적으로 더 높은 수준으로 저해한다. 비파나무 잎 단일 추출물도 멜라닌 생성 억제 효과가 우수하지만, 비파나무 잎과 스피어민트 복합 추출물은 멜라닌 생성 억제 효과가 유의적으로 더 우수하며, 이는 멜라닌 생성 저해에 따른 증진된 미백 효과를 나타내는 것이다.

[0072] **시험예 3. 복합 추출물 내 우르솔산의 동정**

[0073] 실시예 1처럼 준비한 원물에 10배 부피의 70% 에탄올을 첨가하여 80°C에서 3시간 동안 추출하고, 냉각 및 여과 후 농축건조하여 1kg을 수득하였다.

[0074] 생성된 추출물을 물에 현탁하고, 핵산, 에틸 아세테이트, n-부탄올 순으로 연속적으로 분획하였다. 상기 복합추출물의 에틸 아세테이트 분획층을 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 상기 농축액을 실리카겔(230-400메쉬, 머크)로 충전시킨 컬럼 크로마토그래피에 주입하여 클로로포름 3ℓ를 첨가한 후, 클로로포름:메탄올을 49:1, 19:1, 9:1, 4:1, 1:1 비율의 전개 용매에 순차적으로 용출시키고, 용출된 분획 중에서 1번째 분획물을 수득하였다.

[0075] 상기 1번째 분획물을 디클로로메탄:메탄올(1:1)을 이동상으로 역상실리카겔(ODS-A, RP-18)로 충전시킨 컬럼크로마토그래피를 수행하였다. Sephadex LH-20을 충전시킨 컬럼크로마토그래피를 수행하여, 백색 고체 23mg을 수득하였다. 이에 따라 수득된 백색 고체는 하기 화학구조를 갖는 우르솔산이라는 점이 동정되었으며, HPLC-DAD를 통해 우르솔산의 순도가 89.50%라는 것이 확인되었다:



[0076] **시험예 4. B16F1 흑색종에서 멜라닌 생성 억제**

[0079] 본 시험예에서는, 본 발명의 복합 추출물 내에 함유되어 있는 우르솔산이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

[0080] B16F1 흑색종 세포를 6x10⁴ cells/well이 되도록 6-웰 플레이트에 분주하고, 1μM의 α-MSH가 포함된 DMEM 배지를 공급하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 예비배양하였다. 24시간 후, 상기 시험예 3에서 수득된 우르솔산을 2가지 농도(5μM, 10μM)로 처리하고 48시간 동안 배양하였다.

[0081] 이어서, 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, 트립신을 처리하여 세포를 마이크로튜브에 회수하였다. 회수된 세포는 10% DMSO가 함유된 1N NaOH를 첨가한 후, 100°C 항온조에서 30분 동안 세포내 멜라닌을 용해하였다. ELISA 리더를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 내 멜라닌 함량을 하기 식에 따라 계산하였다.

[0082] 멜라닌 생성율(%) = (대조군의 반응 흡광도 - 추출물의 세포배양액 반응 흡광도/대조군의 반응 흡광도) x 100

[0083] 그 결과를 나타낸 도 3에서 볼 수 있듯이, 본 발명의 복합 추출물에서 수득한 우르솔산은 멜라닌 생성 저해 효과를 농도 의존적으로 나타낸다는 것이 확인되었다.

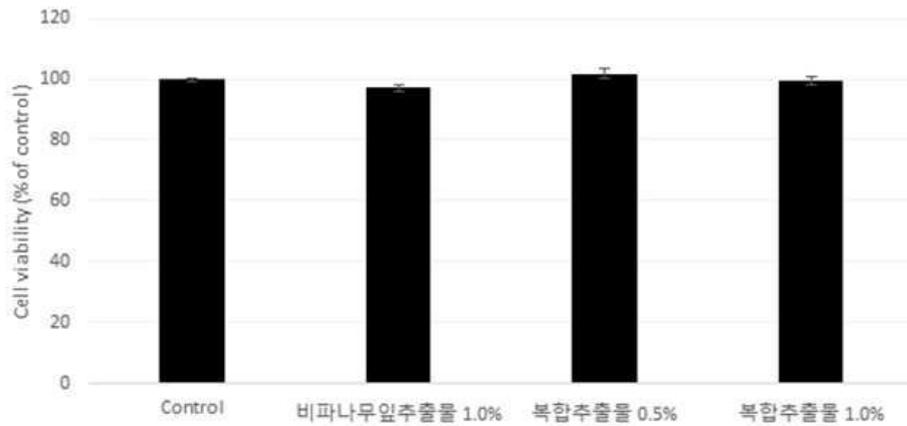
[0085] **시험예 5. B16F1 흑색종에서 멜라노파지 활성화에 의한 멜라노솨 분해**

[0086] 우르솔산은 암 세포에서 오토파지를 유도한다는 것이 보고된 바 있다(Luo J, Hu YL, Wang H. Ursolic acid inhibits breast cancer growth by inhibiting proliferation, inducing autophagy and apoptosis, and suppressing inflammatory responses via the PI3K/AKT and NF-κB signaling pathways in vitro. Exp Ther Med. 2017;14:3623-3631).

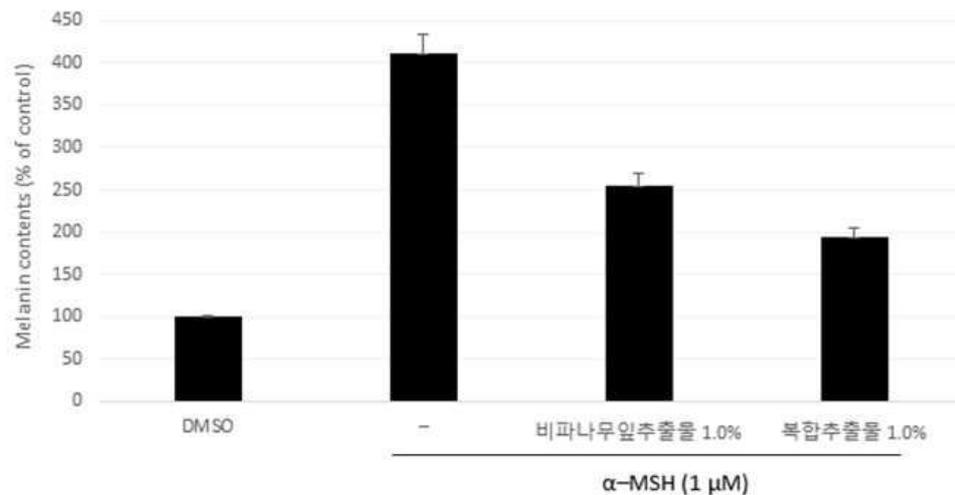
- [0087] 본 시험예에서는 본 발명에 따른 우르솔산이 B16F1 흑색종 세포에서 오토파지를 유도하는지 확인하고자 하였다.
- [0088] 오토파지 활성 마커로 사용되는 LC3 단백질에 GFP 형광 단백질을 tagging하여, B16F1 흑색종 세포주로부터 GFP-LC3 세포주(B16F1/GFP-LC3)를 획득하였다. 이어서, 상기 시험예 3에서 취득된 우르솔산을 2가지 농도(5 μM, 10 μM)로 B16F1/GFP-LC3 세포주에 처리하였다.
- [0089] 오토파지 활성 기작 동안, LC3 I 단백질은 LC3 II 단백질로 변환되어 자식포 활성화에 관여한다. 즉, LC3 I 단백질이 LC3 II 단백질로 전환되면서 오토파고솜(autophagosome)이 형성되어 형광을 띄는 구형 베지클(vesicle)이 생성되며, 이에 따라 형광값이 증폭된다. 오토파고솜 막으로 둘러싸인 형태의 세포 형광 이미지와 세기를 도 4에 나타내었다. 형광세기 값이 높을수록 기 생성된 멜라닌이 오토파지 과정에서 형성되는 오토파고솜에 의해 개별 아미노산으로 더 많이 분해되었다는 것을 의미한다.
- [0090] 도 4에서 보여지는 바와 같이, 우르솔산은 멜라닌 세포 모델의 오토파지 활성을 증가시킨다는 것이 입증되었다.

도면

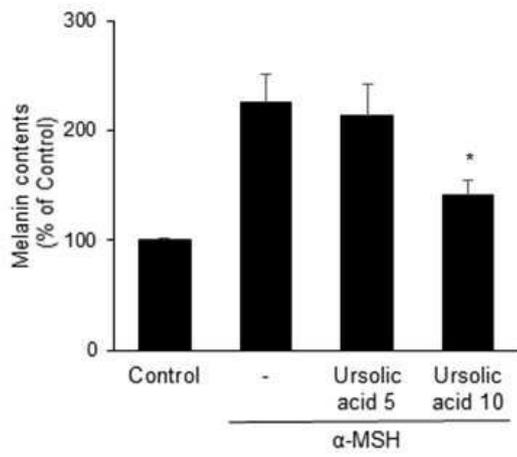
도면1



도면2



도면3



도면4

