



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월15일

(11) 등록번호 10-2203703

(24) 등록일자 2021년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 33/00 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-0115886

(22) 출원일자 2019년09월20일

심사청구일자 2019년09월20일

(56) 선행기술조사문헌

Biology and Chemistry, Vol. 5(4), pp 377~394 (2001)*

Alterations in the Expression and Activity of Endothelial NO Synthases in Aged Human Endothelial Cells. 학위논문 전남대학교 대학원. 조상욱. (2008)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

홍진기

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교

정혜중

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교

(74) 대리인

특허법인 플러스

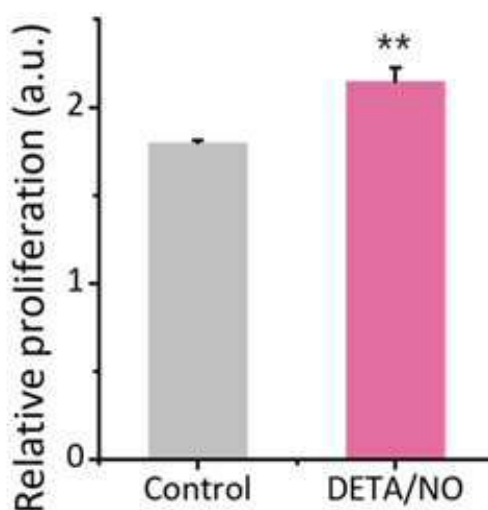
전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 세포노화 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

본 발명은 일산화질소의 방출 제어를 위한 세포노화 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법에 관한 것으로, 독성 잔류물이 없고 장시간 일산화질소를 방출할 수 있으며 생체적합성이 우수한 세포노화 억제용 조성물을 제공하며, 안정적으로 일산화질소 방출을 제어하여 세포노화 억제 효과를 극대화시킬 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61P 39/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

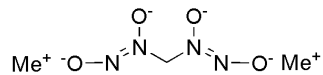
과제고유번호	2019-11-0125
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	전략공모
연구과제명	피부세포의 노화억제를 위한 산화질소 나노전달체 개발에 관한 연구(3/6)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

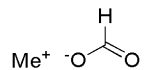
청구범위

청구항 1

하기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 결정체를 유효성분으로 포함하고,
상기 결정체는 중황비가 2 내지 20인 막대형 결정체가 상호 집합된 구형 결정체인, 항산화용 화장품 조성물:
[화학식1]



[화학식2]



상기 화학식1 및 화학식2에서,
Me는 서로 독립적으로 Na 또는 K이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 유효성분은,
상기 화학식1로 표시되는 화합물 대비 상기 화학식2로 표시되는 화합물의 몰비가 1:0.1 내지 1:2.0인 혼합물인,
항산화용 화장품 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서,
상기 유효성분의 농도는,
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인, 항산화용 화장품 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,
상기 유효성분은,
일산화질소 총 방출량이 1 내지 5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 인, 항산화용 화장품 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,
상기 유효성분은 일산화질소 총 방출량 기준으로,

1 내지 24시간의 반감기를 갖는 것인, 항산화용 화장료 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 유효성분은,

물과 반응하여 일산화질소를 방출하는 것인, 항산화용 화장료 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 조성물은,

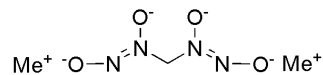
혈관내피세포의 세포사멸을 억제하는 것인, 항산화용 화장료 조성물.

청구항 10

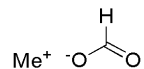
하기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 결정체를 유효성분으로 포함하고,

상기 결정체는 중형비가 2 내지 20인 막대형 결정체가 상호 접합된 구형 결정체인, 창상 치료용 또는 피부조직 재생용 약학적 조성물:

[화학식1]



[화학식2]



상기 화학식1 및 화학식2에서,

Me는 서로 독립적으로 Na 또는 K이다.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포노화 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법에 관한 것으로, 상세하게는 일산화질소의 방출 제어를 통한 세포노화 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 노화란 다양한 원인에 의해 시간이 흐름에 따라 생물의 신체기능이 퇴화되어 생명력이 감퇴되어 가는 현상이다. 세포노화는 세포가 분열할 수 있는 능력을 잃어버리는 것으로, 노화세포는 노화연관 분비표현형(senescence-associated secretory phenotype, SASP)을 분비하고 이는 다양한 질병의 발병과 진행에 기여하는 것으로 보고되었다.

[0003] 일산화질소(NO, nitric oxide)는 일반적으로 생체에서 세 가지 일산화질소 합성효소 이성질체에 의해서 L-아르기닌으로부터 생성되는 자유 라디칼이다. 이중, nNOS와 eNOS는 낮은 수준의 일산화질소를 생성하며, 이들은 세포의 신호전달을 조절하여 혈관확장, 신경전달, 상처치유 등의 정상적인 생리기능을 담당한다. 반면, 대식세포에 주로 존재하는 iNOS에 의해 과다 생성된 일산화질소는 퍼옥시나이트라이드와 같은 독성 물질로 전환될 수 있다. 이는 강력한 산화반응을 일으켜 세포를 손상시키고, 염증반응을 촉진하고 암, 동맥경화 등의 만성질환에 관

여한다 알려졌다.

[0004] 이와 같이, 일산화질소는 적용되는 부위와 목적에 따라서 필요한 일산화질소의 농도가 상이하므로 일산화질소를 생체에 적용할 때는 안전한 농도 또는 방출 시간 범위 내에서 특정 치료목적에 맞는 양의 일산화질소를 적용하는 것이 매우 중요하다.

[0005] 대표적으로 일산화질소를 방출하는 작용기인 다이아제니움다이올레이트기를 포함하는 다양한 양태의 일산화질소 제공자들은 과산화수소에 의한 세포손상을 방지하고, 세포를 보호한다는 결과들이 보고된 바 있다. 또한, 일산화질소가 활성산소종을 제거하고 세포의 산화적 스트레스를 완화시켜준다는 결과들도 보고되었다. 상기와 같은 결과들을 통해, 일산화질소가 세포노화를 방지하는 효과가 있다고 보고된 바도 있으나 그 메커니즘은 여전히 불분명하다. 이에, 일산화질소가 산화적 스트레스로 인한 세포노화를 방지하는 효과가 있는지 정확한 인비트로 모델을 통해서 파악하는 방법이 필요하다. 최근 세포 수준에서 일어나는 세포노화가 개체노화를 일으키는 주요 원인 중의 하나라는 것이 밝혀져, 인비트로 모델을 통해서 세포노화를 제어하는 것은 개체노화 및 노화세포로 인한 다양한 질병들에 대한 예방책 및 치료법을 마련할 수 있는 방법이 될 수 있을 것이다.

[0006] 이와 같은 배경하, 세포노화를 억제하기 위해 세포 내에서 일산화질소를 안정적으로 방출 제어할 수 있는 소재 및 이를 이용한 방법의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 새로운 양태의 일산화질소 제공자를 포함하는 세포노화 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 상세하게, 독성 잔류물이 없고 장시간 일산화질소를 방출할 수 있는 일산화질소 제공자를 포함하는 세포노화 억제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

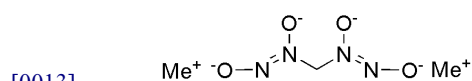
[0009] 상세하게, 방출량을 용이하게 조절하여 치료목적에 맞는 양의 일산화질소를 세포 내 제공할 수 있는 세포노화 억제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 상세하게, 생체 적합성이 우수하여 안정적으로 세포 내 일산화질소를 제공할 수 있는 일산화질소의 전달방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 이를 통해 세포노화를 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상술된 목적을 위해, 본 발명에서는 하기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 세포노화 억제용 조성물이 제공된다.

[0012] [화학식1]



[0014] [화학식2]



[0016] [상기 화학식1 및 화학식2에서,

[0017] Me는 서로 독립적으로 Li, Na, K, Cs, 또는 Rb이다.]

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 상기 화학식1로 표시되는 화합물 대비 상기 화학식2로 표시되는 화합물의 몰비가 1:0.1 내지 1:2.0인 혼합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 결정체일 수 있으며, 상기 결정체는 중형비가 2 내지 20인 막대형 결정체인 것일 수 있다.

- [0020] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 결정체로, 상기 결정체는 중형비가 2 내지 20인 막대형 결정체가 상호 집합된 구형 결정체인 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분의 농도는 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 일산화질소 총 방출량이 1 내지 $5\mu\text{mol}/\text{mg}$ 일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 일산화질소 총 방출량 기준으로, 1 내지 24시간의 반감기를 갖는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 물과 반응하여 일산화질소를 방출하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물은 혈관내피세포의 세포사멸을 억제하는 것일 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에서는 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 창상 치료용 또는 피부조직 재생용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0027] 또한, 본 발명에서는 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물과 물의 반응을 통한 일산화질소의 방출을 이용하는, 일산화질소의 전달방법이 제공된다. 이와 같은 일산화질소의 전달방법은 세포 내 일산화질소를 전달하여 세포노화를 억제하는 방법일 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따르면, 독성 잔류물이 없고 장시간 일산화질소를 방출할 수 있으며 생체적합성이 우수한 일산화질소 제공자로서, 다이아제니움다이올레이트기가 탄소에 결합된 새로운 양태의 화합물을 유효성분으로 포함하는 세포노화 억제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따르면, 일산화질소를 안정적으로 제공함은 물론 목적에 맞도록 제어할 수 있다. 또한, 일산화질소의 생산 능력을 잃어버린 노화세포에 적용되어 세포의 순기능을 부각함으로써, 세포노화 억제 효과를 극대화할 수 있다. 이에, 본 발명에 따르면, 세포노화를 제어함으로써 개체노화 및 노화세포로 인한 다양한 질병들에 대한 개선 및 치료를 위한 새로운 소재 및 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도1은 본 발명의 실시예1에 따른 세포노화 억제용 조성물을 이용한 세포노화 지연효과의 결과를 도시한 그래프이고,
- 도2는 본 발명의 실시예1에 따른 세포노화 억제용 조성물의 농도에 따른 인간 피부 섬유아세포의 생존율을 도시한 그래프이고,
- 도3은 본 발명의 실시예1에 따른 세포노화 억제용 조성물을 통해 방출되는 일산화질소를 실시간으로 분석한 그래프이고,
- 도4는 본 발명의 실시예2 내지 실시예7에서 제조된 결정체의 현미경 사진이고,
- 도5는 본 발명의 실시예2 내지 실시예7에서 제조된 결정체의 단위면적당 방출된 일산화질소의 총 방출량을 도시한 그래프이고,
- 도6은 본 발명의 실시예1에 따른 세포노화 억제용 조성물의 농도에 따른 인간 피부 섬유아세포의 이동에 미치는 영향을 24시간 동안 조사한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법에 대하여 이하 후술하나, 이때 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능

및 구성에 대한 설명은 생략한다.

- [0032] 본 명세서의 용어, "다이아제니움다이올레이트(diazeniumdiolate)기"는 노노에이트(NONOate)기와 등가의 의미를 가지며, 일반식 $RR'N-N(O)=NOR$ 로 나타낼 수 있다.
- [0033] 본 명세서의 용어, "낮은 수준의 일산화질소"는 노화세포에 적용되어 세포의 순기능을 부여할 수 있는 농도라면 제한되지 않으며, 구체적으로는 세포독성을 일으키지 않는 농도범위로 제공되는 일산화질소의 방출량을 의미하는 것일 수 있다.
- [0034] 상기에서 살핀 바와 같이, 낮은 수준의 일산화질소는 항산화능을 부여할 수 있다. 이에, 노화세포에 적정 수준의 일산화질소를 제공함으로써, 세포의 노화방지는 물론 세포의 재생에 이로움을 제공할 수 있다. 낮은 수준의 일산화질소는 일반적으로 세포에서 항상 생산되는 수준이므로 노화와 관련하여 거의 논의된 바 없었다. 반면, 염증이나 질병이 발생한 상황에서 일산화질소는 노화를 촉진하거나 질병을 악화시키는 부정적인 역할을 하기 때문에 제거해야할 존재로서 보고되었다. 그러나, 그러한 극단적인 상황으로 치닫기 이전에 일반적으로 세포가 노화되는 상황에서는 세포의 상태가 정상이 아니기 때문에 정상범위의 일산화질소를 생산하지 못하고 점점 더 노화세포를 많이 생성되게 되는 악순환이 반복되게 된다. 따라서, 일산화질소의 생산 능력을 잃어버린 노화세포에 대해 정상범위에서 크게 벗어나지 않는 일산화질소를 공급하면 세포가 활성화되고 활성산소종을 제거하는 등의 순기능이 부각되어 결국 노화를 방지할 수 있게 될 것이다.
- [0035] 이와 같은 배경하에서, 본 발명자들은 종래 알려진 일산화질소 제공자들을 대체할 수 있는 새로운 일산화질소 제공자를 고안하고, 이를 통해 세포 내에서 일산화질소를 안정적으로 방출할 수 있는 방법을 개발하여 본 발명을 제안한다. 구체적으로, 본 발명에 따른 일산화질소 제공자는 다이아제니움다이올레이트기가 탄소에 결합되어 보다 안정적으로 일산화질소를 방출할 수 있는 새로운 화합물을 포함한다.
- [0036] 본 발명에 따른 일산화질소 제공자는 물에 대한 용해도가 높으며, 생체온도와 pH조건에서 쉽게 분해되어 일산화질소를 방출할 수 있다. 또한, 장시간 일산화질소를 방출할 수 있으며 독성 잔류물을 발생시키지 않는다. 또한, 본 발명에 따른 일산화질소 제공자는 종래 N-다이아제니움다이올레이트기를 포함하는 일산화질소 제공자 대비 현저하게 향상된 반감기를 가져, 지속적이고 긴 방출 시간을 보인다. 이에, 목적하는 낮은 수준의 일산화질소를 제공하기에 적합하다.
- [0037] 또한, 생리적 환경에서의 용해도가 뛰어나기 때문에 나노입자를 도입한 종래 일산화질소 제공자가 가지는 분산성 및 응집현상으로 인한 한계점을 극복할 수 있다. 또한, 체내에서 용이하게 제거되어, 축적 및 잔여물로 인해 독성문제를 야기하지 않는다.
- [0038] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0039] 본 발명은 C-다이아제니움다이올레이트기를 포함하는 일산화질소 제공자를 포함하는 조성물을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물은 하기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 세포노화 억제용 조성물일 수 있다.
- [0040] [화학식1]
- [0041]
$$Me^+ \cdot O-N \equiv N-CH_2-N \equiv N-O^- \cdot Me^+$$
- [0042] [화학식2]
- [0043]
$$Me^+ \cdot O-C(=O)H$$
- [0044] [상기 화학식1 및 화학식2에서,
- [0045] Me는 서로 독립적으로 Li, Na, K, Cs, 또는 Rb이다.]
- [0046] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물은 긴 반감기를 갖는 C-다이아제니움다이올레이트기를 포함하는 일산화질소 제공자를 통해 장기간 동안 일산화질소를 방출할 수 있다. 이에, 다양한 양태로 목적하는 수준의 일산화질소를 용이하게 제공할 수 있다. 일 예로, 초기 방출량, 총 방출량, 방출 시간 등을 고려하여 적절하게 제어될 수 있으며, 목적하는 수준의 일산화질소를 안정적으로 제공할 수 있다. 또한, 과량의 일산화질

소가 순식간에 방출되어 바람직하지 못한 독성이 작용하는 것을 방지할 수 있다.

- [0047] 일 양태로, 상기 세포노화 억제용 조성물은 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물이 혼합된 혼합물을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다. 이때, 상기 혼합물은 합성시 사용되는 출발물질 및 조성에 따라 그 혼합비가 조절될 수 있고, 후첨되는 조성에 따라 그 혼합비가 조절될 수 있음은 물론이다. 이때, 상기 혼합비는 물비를 의미한다. 또한, 상기 세포노화 억제용 조성물은 서로 상이한 상기 화학식1로 표시되는 화합물 또는 서로 상이한 상기 화학식2로 표시되는 화합물 등이 적절하게 조합된 형태로 사용될 수 있음은 물론이다.
- [0048] 일 예로, 상기 유효성분은 상기 화학식1로 표시되는 화합물 대비 상기 화학식2로 표시되는 화합물의 물비가 1:0.1 내지 1:2.0인 혼합물을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 혼합물의 물비는 1:0.5 내지 1:1.5일 수 있으며, 보다 구체적으로는 1:0.7 내지 1:1.3일 수 있다.
- [0049] 일 예로, 상기 유효성분은 상온상압(25℃, 1기압) 하에서 물에 완전히 용해되지만, 메탄올, 에탄올 등의 저급 알코올계 용매에는 용해되지 않을 수 있다. 이때, 상기 용해는 흡광도 측정시 380 내지 600nm 영역에서 0.1이하의 평균 강도(uv absorbance, a.u.)를 나타내는 것을 의미하는 것일 수 있으며, 이는 육안으로도 투명하다 평가할 수 있는 정도를 의미한다. 또한, 이는 UV-vis 분광기 측정결과로, 이의 수치가 커질수록 불투명하다 평가한다.
- [0050] 일 예로, 상온상압 하에서 상기 유효성분을 포함하는 수용액(1mg/ml 농도, in H₂O)의 흡광도(T_{550nm})는 0.1이하의 평균 강도를 갖는 것일 수 있다.
- [0051] 일 예로, 상온상압 하에서 상기 유효성분을 포함하는 에탄올 용액(1mg/ml 농도, in EtOH)의 흡광도(T'_{550nm})는 0.9(a.u.)이상 의 평균 강도를 갖는 것일 수 있다.
- [0052] 일 양태로, 상기 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 결정체일 수 있으며, 상기 결정체는 종횡비(L/D)가 2 내지 20인 막대형 결정체인 것일 수 있다.
- [0053] 일 예로, 상기 막대형 결정체의 길이(L)는 1 내지 60 μ m일 수 있고, 너비(D)는 0.1 내지 10 μ m일 수 있다. 이때, 상기 길이는 항상 너비보다 크다(L>D).
- [0054] 일 예로, 상기 막대형 결정체의 종횡비는 2.0 내지 10.0일 수 있다.
- [0055] 일 예로, 상기 막대형 결정체의 종횡비는 2.5 내지 8.5일 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 막대형 결정체는 길이가 길어질수록 결정체의 개당 일산화질소의 방출량이 증가할 수 있다. 반대로, 상기 막대형 결정체의 길이가 짧아질수록 결정체의 개당 산화질소 방출량이 감소할 수 있다.
- [0057] 일 양태로, 상기 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 결정체로, 상기 결정체는 종횡비가 2 내지 20인 막대형 결정체가 상호 접합된 구형 결정체인 것일 수 있다.
- [0058] 일 예로, 상기 구형 결정체의 평균직경은 25 내지 200 μ m인 것일 수 있고, 구체적으로는 25 내지 100 μ m, 보다 구체적으로는 25 내지 50 μ m, 가장 구체적으로는 25 내지 35 μ m인 것일 수 있다.
- [0059] 상술한 막대형 결정체와 구형 결정체는, 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 조성물을 인간 피부 섬유아세포 배양액에 농도가 0.1 내지 20 mg/ml이 되도록 분산시키고 배양하여 수득된 것일 수 있다. 이때, 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 조성물의 농도에 따라 결정체의 형태를 용이하게 변경할 수 있다.
- [0060] 일 예로, 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 조성물의 농도가 6mg/ml미만인 경우, 막대형 결정체만을 단독으로 형성 할 수 있다.
- [0061] 일 예로, 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 포함하는 조성물의 농도가 6mg/ml이상인 경우, 구형 결정체가 형성되며 이의 농도가 증가할수록 구형 결정체가 증가하는 양상을 보인다.
- [0062] 또한, 상기 구형 결정체는 상기 막대형 결정체 대비 단위면적당 일산화질소 방출량이 놀랍도록 향상된 값을 가질 수 있다. 이에, 보다 적은 사용량으로도 목적하는 효과를 발휘할 수 있어 매우 경제적인 수 있다. 게다가, 상기 구형 결정체 역시도 긴 반감기 및 방출시간을 가져, 낮은 수준의 일산화질소를 오랜기간 안정적으로 제공할 수 있다.

- [0063] 또한, 일산화질소의 총 방출량은 물론 반감기에 따른 방출 시간을 적절하게 조절하기 위해, 상기 구형 결정체와 막대형 결정체를 혼합하여 사용할 수 있음은 물론, 상기 혼합물 형태로 사용되는 조성물과의 어떠한 조합도 가능하다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분의 농도는 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인 것일 수 있다. 하기 도2에 도시한 바와 같이, 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물은 상술한 농도 범위 내에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 또한, 상술한 농도 범위 내에서는 세포배양액만 처리한 대조군, 즉 음성대조군에 비해 높은 세포 생존율을 나타내어 세포의 생존 및 증식에 도움을 주는 것을 확인하였다. 즉, 상술된 농도 범위 내에서는 다양한 적용 양태로 사용 및 적용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 일산화질소 총 방출량이 1 내지 $5\mu\text{mol}/\text{mg}$ 일 수 있다.
- [0066] 일 예로, 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 경우, 일산화질소 총 방출량은 2.0 내지 $5.0\mu\text{mol}/\text{mg}$ 일 수 있다. 구체적으로, 상기 일산화질소 총 방출량은 2.5 내지 $4.5\mu\text{mol}/\text{mg}$, 보다 구체적으로 2.8 내지 $4.3\mu\text{mol}/\text{mg}$ 일 수 있다.
- [0067] 일 예로, 상기 막대형 결정체를 유효성분으로 포함하는 경우, 일산화질소 총 방출량은 2.5 내지 $3.0\mu\text{mol}/\text{mg}$ 일 수 있다.
- [0068] 일 예로, 상기 구형 결정체를 유효성분으로 포함하는 경우, 일산화질소 총 방출량은 2.0 내지 $3.5\mu\text{mol}/\text{mg}$ 일 수 있다. 상기 구형 결정체의 단위면적 당 일산화질소 방출량은 상기 막대형 결정체의 단위면적당 일산화질소 방출량에 비해 현저함을 보인다(도5 참조).
- [0069] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 일산화질소 총 방출량 기준으로, 1 내지 24시간의 반감기를 갖는 것일 수 있다. 종래 N-다이하제니움다이하레이트기를 포함하는 일산화질소 제공자의 반감기는 수분으로 매우 짧아, 실질적인 적용에 문제가 있었으나, 현저하게 향상된 반감기를 갖는 조성물을 포함하는 본 발명에 따르면 다양한 분야에 유리하게 적용할 수 있어 좋다.
- [0070] 일 예로, 상기 유효성분은 일산화질소 총 방출량 기준으로, 반감기가 5시간 이상일 수 있다.
- [0071] 일 예로, 상기 유효성분은 일산화질소 총 방출량 기준으로, 반감기가 8시간 이상일 수 있다.
- [0072] 일 예로, 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 경우, 반감기는 12 내지 24시간일 수 있다. 또한, 상기 일산화질소의 방출 시간은 최대 150분일 수 있다(하기 도3 참조).
- [0073] 일 예로, 상기 막대형 결정체를 유효성분으로 포함하는 경우, 반감기는 10 내지 20시간일 수 있다.
- [0074] 일 예로, 상기 구형 결정체를 유효성분으로 포함하는 경우, 반감기는 13 내지 185시간일 수 있다.
- [0075] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포노화 억제용 조성물에 있어서, 상기 유효성분은 물과 반응하여 일산화질소를 방출하는 것일 수 있다. 이때, 상기 유효성분은 pH가 낮아지면 분해되는 특성으로, 생체온도와 pH조건에서 효과적인 일산화질소의 방출을 제어할 수 있다.
- [0076] 일 예로, 상기 pH조건은 2.0 내지 6.0범위일 수 있다.
- [0077] 본 발명은 인비트로 상에서 세포노화를 방지하는 효과를 기반으로 항노화, 즉 항산화능을 평가하였다. 또한, 본 발명은 이의 결과로부터 개체노화 및 노화세포로 인한 다양한 질병들에 대한 개선 및 치료에 유효한 새로운 C-다이하제니움다이하레이트기를 포함하는 일산화질소 제공자를 포함하는 조성물 및 이의 용도를 제공한다.
- [0078] 일 예로, 상기 세포노화를 방지하는 효과는 자유 라디칼의 산화에 의한 노화세포 모델을 제조하고 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물을 처리하고, 다양한 평가방법을 통해 이의 결과를 비교하였다. 상기 평가방법의 일 예로는, 세포생존율을 통한 노화세포의 확인, 베타갈락토시다아제 염색을 통한 노화세포의 확인, hTERT 분석을 통한 노화세포의 확인 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 일 예로, 상기 세포노화 억제용 조성물은 혈관내피세포 (HUVEC, human umbilical vein endothelial cell) 의 세포사멸 억제용 조성물일 수 있다.
- [0080] 일 예로, 상기 세포노화 억제용 조성물은 피부 외용제 조성물로 제형화되는 것일 수 있다. 상기 피부 외용제 조성물은 목적에 따라 화장료 조성물 또는 약학 조성물일 수 있다.

- [0081] 일 예로, 상기 세포노화 억제용 조성물은 창상 치료용 또는 피부조직 재생용 약학적 조성물일 수 있다. 이때, 상기 창상은 화상, 열상, 표피창상, 궤양, 외상, 외과적 수술, 출산, 만성적 상처, 피부염에 의한 손상 등에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 또한, 상기 만성적 상처는 욕창 또는 압력성 궤양 등일 수 있고, 상기 피부염은 농가진, 간찰진, 모낭염 또는 습진 등일 수 있다.
- [0082] 일 예로, 상기 세포노화 억제용 조성물은 인비트로 상에서 세포노화 억제 정도를 평가하기 위한 지표로 활용될 수 있다.
- [0083] 또한, 본 발명은 상기 화학식1 및 화학식2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물과 물의 반응을 통한 일산화질소의 방출을 이용하는, 일산화질소의 전달방법을 제공한다. 이와 같은 일산화질소의 전달방법은 세포 내 치료량 수준의 일산화질소를 전달하여 세포노화를 억제하는 방법일 수 있다. 이때, 상기 치료량은 노화 세포 또는 비정상세포에 정상범위의 일산화질소를 제공할 수 있는 낮은 수준이거나 정상세포로 활성화되어 세포의 순기능을 발휘할 수 있도록 하는 낮은 수준의 일산화질소 방출량일 수 있으며, 세포 내 독성을 일으키지 않는 농도 수준일 수 있다.
- [0084] 또한, 본 발명은 상술한 바와 같은 일산화질소의 이로운 효과와 더불어 추가적인 약리 효과를 목적으로 사용할 수도 있다.
- [0085] 일 예로, 상기 창상 치료용 또는 피부조직 재생용 약학적 조성물에서와 같이, 항산화제, 소염제, 상처 치유 촉진 물질, 항박테리아제 등에서 선택되는 적어도 하나 이상의 물질과의 조합으로, 약물의 치료효과와 더불어 일산화질소의 치료효과를 부여할 수 있어 보다 바람직한 치료효과를 제공할 수 있다.
- [0086] 이하에서, 본 발명의 상세한 이해를 위하여 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법을 설명하며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적을 위한 것으로서 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0087] (평가방법)
- [0088] 1.노화지연효과 확인
- [0089] 1-1.세포 생존율을 통한 노화세포의 확인
- [0090] 실시예에서 제조된 조성물을 이용하여 노화세포의 세포 생존율을 분석하였다. 먼저, 세포노화 억제 효과에 대한 평가를 위해, 과산화수소를 이용하여 자유 라디칼의 산화반응으로 인한 세포 노화를 유도하여 노화세포를 제조하였다. 구체적으로, 과산화수소 100, 400, 800 μM 농도로 혈관내피세포에 24시간 처리한 후, 배지를 교체하여 3일간 배양하였다. 3일간 배양한 혈관내피세포에 CCK 시약을 처리하여 4시간 동안 인큐베이션을 한 후, 450 nm 에서 UV 흡광도를 측정하였다. 과산화수소의 농도가 높아짐에 따라, 세포의 생존율이 감소하였고, 100 μM 의 과산화수소를 처리한 경우에도 대조군(과산화수소 처리하지 않은 시료) 대비 과반의 세포가 사멸됨을 확인하였다. 세포가 노화되면 세포주기(cell cycle)가 지연되거나 멈추어서 세포의 증식이 느리게 일어나거나 세포가 사멸되게 된다. 따라서, 과산화수소를 처리한 세포의 생존율이 낮다는 것은 세포가 노화가 되었다는 것을 증명할 수 있는 결과 중 하나일 수 있다.
- [0091] 추가적인 실험을 반복하였을 때도 같은 경향성의 결과가 나타났으며, 세포의 생존율은 세포의 상태나 세포수에 따라 차이가 나는 것으로 확인되었다. 따라서, 이 실험결과를 기반으로 과산화수소의 농도를 100 μM 로 고정하고 세포의 상태에 따라 처리 시간을 8시간 내지 24시간으로 조절하여 세포의 사멸을 최소화하며 노화세포를 효율적으로 제조할 수 있다.
- [0092] 상기 방법으로 제조된 노화세포에 하기 실시예1 내지 실시예7의 세포노화 억제용 조성물 각각을 처리하고, 세포의 생존율을 확인하였다.
- [0093] 1-2.베타갈락토시다아제 염색을 통한 노화세포의 확인
- [0094] 세포가 노화되면 일반적으로 리소좀의 수와 크기가 증가하기 때문에, 세포 내부의 pH가 4 내지 4.5 정도로 감소하고 낮은 pH 환경으로 인해 베타갈락토시다아제의 활성도가 증가한다. 따라서, 노화세포의 이러한 특성을 이용하여 노화세포만을 염색할 수 있는데, X-gal이라는 시약이 활성화된 베타갈락토시다아제에 의해서 가수분해되어 파란색으로 변하게 되면서 염색이 되는 원리이다. 상기 세포 생존율을 통해서도 예상했듯이, 과산화수소의 농도가 높아질수록 더 많은 수의 염색된 세포들이 관찰되었다. 따라서, 과산화수소의 농도에 비례하여 노화세포가 더 많이 생성되고 세포 생존율과의 연관성을 확인하였다. 이에, 상기 방법으로 제조된 노화세포에 하기 실시예1

내지 실시예7의 세포노화 억제용 조성물 각각을 처리하고, 베타갈락토시다아제를 염색하여 세포를 관찰하였다.

[0095] 1-3.hTERT 분석을 통한 노화세포의 확인

[0096] 노화세포의 특성 중에 DNA의 텔로미어 부분이 짧아지는 현상이 있다. 이것은 세포가 노화될수록 텔로미어를 연장시키는 효소인 텔로머라아제의 활성도가 감소하기 때문이다. 따라서, 노화세포는 텔로머라아제의 활성도 비교를 통해서 보다 정확하게 확인이 가능하다. 텔로머라아제의 활성도를 확인하기 위해, 텔로머라아제의 catalytic subunit 중 하나인 텔로머라아제 역전사효소(Telomerase reverse transcriptase, hTERT)를 정량 분석하였다. 구체적으로, 과산화수소 100 μ M을 24시간 처리하여 노화된 세포와 처리하지 않은 세포를 각각 100 파이 디쉬에 준비하여 모두 떼어낸 후, PBS(phosphate buffered saline)로 1회 세척하여 펠렛 상태로 준비하였다. 그 후, 세포를 lysis 하여 RNA를 모두 추출하고 PCR을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 SyGreen 기반으로 RT-PCR을 진행하여 hTERT 부분만 증폭하여 정량화하였다. 또한, 상기 방법으로 제조된 노화세포에 하기 실시예1 내지 실시예7의 세포노화 억제용 조성물 각각을 처리하고, hTERT 분석을 실시하였다.

[0097] 2.세포이동 영향 평가

[0098] 실시예에서 제조된 조성물이 인간 피부 섬유아세포의 이동(migration)에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포이동(cell migration) 평가를 실시하였다. 구체적으로, 인간 피부 섬유아세포를 12 웰 플레이트에 웰 하나당 60,000 개씩 시딩하고, 24시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 세포배양액을 모두 제거한 후, 세럼이 포함되지 않은 배양액으로 교체하였다. 12시간 후, 눈금자와 200 μ l 피펫 팁을 이용하여 웰 중간에 세로로 창상(wound)을 형성하였다. 세포배양액을 모두 제거하고, 세럼이 포함된 세포배양액을 0.5ml씩 첨가하여 세척하였다. 세럼이 포함되지 않은 배양액에 여과하여 준비한 상기 실시예의 조성물 용액을 각 웰에 1ml 씩 첨가하였다. 현미경을 이용하여 창상의 위, 중간, 아래 세 곳을 촬영한 후 촬영지점을 표시하였다. 웰 플레이트를 24시간 동안 배양한 후, 표시된 위치를 현미경으로 촬영하여 24시간 전후의 세포 이동정도를 확인하였다. 세포배양액만 처리한 음성대조군과 상기 조성물의 농도에 따른 결과를 이미지J(ImageJ)로 세포면적을 계산하여 비교하였다.

[0099] (실시예1)

[0100] 바이알 내부의 에탄올 30ml에 농도 0.5M의 메탄올 기반 소듐메톡사이드를 첨가하여 40ml 용액을 제조하였다. 상기 용액을 교반기로 1분간 충분히 혼합한 후, 반응기에 주입하고 상기 반응기를 밀폐시켰다. 10기압의 아르곤 기체를 10분간 상기 반응기에 주입 후 배출하는 과정을 빠르게 3회 반복하여 상기 반응기 및 용액 내부의 기체를 모두 제거하였다. 이후 10기압의 일산화질소 기체를 상기 반응기에 주입한 후 상온에서 3일간 반응을 진행하였다. 3일 후, 일산화질소를 배출시킨 후 10기압의 아르곤 가스를 주입 후배출하는 과정을 3회 반복하여 미반응 일산화질소 기체를 제거하였다. 상기 용액 중에 흰색의 고체 부유물이 형성됨을 확인한 후, 상기 용액을 코니칼 튜브에 옮긴 다음 10,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 잔류한 흰색 펠렛에 차가운 에탄올을 40ml 첨가하여 분산시킨 후, 동일한 조건에서 원심분리하여 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 세척된 흰색 고체에서 에탄올을 최대한 제거한 후, 진공펌프를 연결하여 30분 이내로 건조한 후 진공포장하고 냉동보관하여 염 형태의 생성물을 수득하였다.

[0101] 상기 생성물은 두 가지 물질의 혼합물이며, 소듐메탄-1,1-비스-디아젠-N-옥사이드-N-하이드록실레이트(sodium methane-1,1-bis-(diazene-N-oxide-N'-hydroxylate))인 탄소에 결합된 다이아제니움다이올레이트기(C-diazeniumdiolate)를 포함하는 부분과 미네랄 부분인 소듐포르메이트(sodium formate)를 포함한다.

[0102] 상기 방법으로 수득된 생성물의 물성은 출원번호 10-2018-0136820 및 10-2018-0136820에 기재된 방법을 통해 분석을 수행하였다. 또한, 그 결과를 하기 표1에 도시하였다.

[0103] (실시예2 내지 실시예7)

[0104] 상기 실시예1에서 수득된 생성물의 농도가 15mg/ml가 되도록 세럼이 포함된 인간 피부 섬유아세포 배양액에 분산시킨 후, 0.45 μ m 필터를 이용하여 여과하였다. 희석을 통해 다양한 농도(2, 4, 6, 8, 10, 15mg/ml)의 세포배양액을 준비하였다. 상기 세포배양액을 24 웰 플레이트(well plate)의 각 웰에 상기 세포 배양액을 1ml씩 주입한 후 배양하였다. 24시간 후, 각 웰을 현미경으로 관찰하여 다양한 크기 및 형태의 결정체가 형성되었음을 확인하였다.

[0105] 상기 실시예2는 상기 실시예1에서 수득된 생성물의 농도가 2mg/ml인 경우이고, 상기 실시예3은 상기 실시예1에서 수득된 생성물의 농도가 4mg/ml인 경우이고, 상기 실시예4는 상기 실시예1에서 수득된 생성물의 농도가 6mg/ml인 경우이고, 상기 실시예5는 상기 실시예1에서 수득된 생성물의 농도가 8mg/ml인 경우이고, 상기 실시예6은

상기 실시예1에서 수득된 생성물의 농도가 10mg/ml인 경우이고, 상기 실시예7은 상기 실시예1에서 수득된 생성물의 농도가 15mg/ml인 경우에 해당한다.

[0106] 그 결과, 상기 배양액 내 상기 실시예1에서 수득된 생성물의 농도에 따라 결정체의 형태 및 크기가 상이함을 확인하였다(하기 도4 참조). 저 농도에서는 짧은 막대 형태의 결정체가 형성되고, 농도가 증가함에 따라 결정체의 길이가 길어지며, 고농도에서는 상기 막대 결정체들이 상호 집합되어 3차원의 구형 결정체를 형성함을 확인하였다. 상기 결정체는 물에 분산되지 않고 안정한 상태로 존재하여 추가적인 분석이 가능하였다.

[0107] 상기 방법으로 수득된 각 결정체의 물성은 출원번호 10-2018-0136820 및 10-2018-0136820에 기재된 방법을 통해 분석을 수행하였다. 또한, 그 결과를 하기 표1에 도시하였다.

[0108] (표1)

	실시예1	실시예2	실시예3	실시예4	실시예5	실시예6	실시예7	비교예1
반감기 (hr)	14.3	19.5	11.7	13.7	17.2	17.9	13.9	-
총 방출량 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	4.0	2.8	2.6	2.9	2.7	3.3	2.3	0.3
총 방출시간 (hr)	119	102.6	69.6	85.6	95.5	101.6	83.2	-
비교예1: 종래 N-다이아제니움다이올레이트기를 포함하는 물질 사용(DETA/NO, Diethylene triamine/nitric oxide adduct, Sigma Aldrich).								

[0109]

[0110] 일산화질소 방출 그래프를 기반으로, 일산화질소의 총 방출량, 반감기, 최대 방출량 및 총 방출시간 등을 분석하였다. 상기 표1에 도시한 바와 같이, 본 발명의 실시예에서 제조된 생성물, 즉 세포노화 억제용 조성물은 일산화질소 총 방출량이 최대 4.0 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 으로 확인되었다. 이와 같은 수치는 비교예1의 0.30 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 보다 다소 높은 수치일 수 있으나, 총 방출시간이 현저하게 증가함에 따라 일산화질소를 점진적으로 방출시킬 수 있어 보다 안정적인 일산화질소의 방출 거동을 구현할 수 있다는 측면에서 이점을 갖는다.

[0111] 또한, 하기 도5는 상기 실시예2 내지 실시예7로부터 수득된 각 결정체의 크기 및 형태에 따른 표면적을 계산하여, 각 결정체의 단위면적당 방출되는 일산화질소의 양을 상대적으로 비교한 것이다. 그 결과, 2 내지 6mg/ml 농도의 조성물로부터 형성된 막대형 결정체의 크기가 증가함에 따라, 또는 6mg/ml 농도 이상의 조성물로부터 형성된 구형 결정체를 형성함에 따라 단위면적당 방출량이 급격히 증가하는 것을 확인하였다.

[0112] 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물의 노화지연효과를 확인하였다. 구체적으로, 과산화수소를 이용하여 제조한 노화세포에 일산화질소를 방출하는 실시예를 처리한 결과, 처리하지 않은 대조군 대비 세포 생존율이 모든 평가방법을 통해 유의하게 증가함을 확인하였다. 또한, 하기 도1에 도시한 바와 같이, 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물인 실시예1을 처리한 경우, 대조군 대비 10%이상의 유의한 세포 증식이 일어남을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물로부터 방출된 일산화질소가 과산화수소에 의해 노화된 세포의 노화를 억제하거나 지연시켜, 세포의 사멸을 억제하고 증식을 촉진하는 것을 확인할 수 있다.

[0113] 또한, 하기 도2에 도시한 바와 같이, 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물인 실시예1의 경우, 조성물의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상일 때 독성이 확인된 반면, 상기 농도 미만에서는 음성대조군에 비해 높은 세포 생존율을 나타내어 세포의 생존 및 증식에 도움을 주는 것을 확인하였다.

[0114] 또한, 하기 도6에 도시한 바와 같이, 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물인 실시예1을 처리한 경우, 대조군 대비 창상 쪽으로 이동한 세포가 많음을 확인할 수 있다. 특히, 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 경우의 사진을 참고하면, 육안으로도 세포의 이동으로 인해 창상이 보다 많이 단혔음을 용이하게 확인할 수 있다. 이와 같은 결과로부터, 본 발명에 따른 세포노화 억제용 조성물은 창상 등에 의한 세포손상의 치료 또는 재생에 효과를 나타냄을 유추할 수 있다.

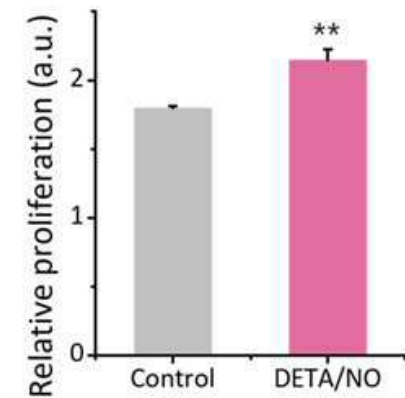
[0115] 또한, 하기 도4는 본 발명의 실시예에서 제조된 생성물, 즉 실시예1의 농도에 따라 형성된 결정체의 형상 및 크기를 현미경으로 촬영한 사진이다. 저농도(2, 4mg/ml)에서 형성된 막대형 결정체는 농도가 증가함에 따라 길이가 길어지고, 농도 6mg/ml에서부터는 막대형 결정체의 중간부분이 상호 집합되어 구형 결정체가 형성됨을 관찰할 수 있다. 또한, 8mg/ml 이상의 농도에서는 대다수의 결정체가 구형 결정체로 전환되고, 그 크기가 불균일하게 증가함을 확인할 수 있다. 구체적으로, 2 내지 6mg/ml 농도에서는 막대형 결정체가 존재하며, 그 길이가 26

μm 에서 $53\mu\text{m}$ 까지 증가하였다. 또한, 6mg/ml 농도에서부터 구형 결정체가 생성되며, 균일한 구형 결정체의 크기만 분석한 경우 농도에 무관하게 비슷한 크기를 나타내는 것을 확인하였다.

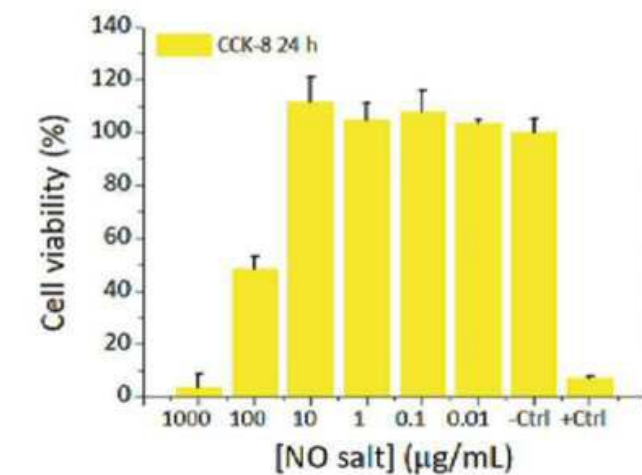
[0116] 이상에서 살펴본 바와 같이 본 발명의 실시예에 대해 상세히 기술되었지만, 본 발명이 속하는 기술분야에 있어서 통상의 지식을 가진 사람이라면, 첨부된 청구범위에 정의된 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명을 여러 가지로 변형하여 실시할 수 있을 것이다. 따라서 본 발명의 앞으로의 실시예들의 변경은 본 발명의 기술을 벗어날 수 없을 것이다.

도면

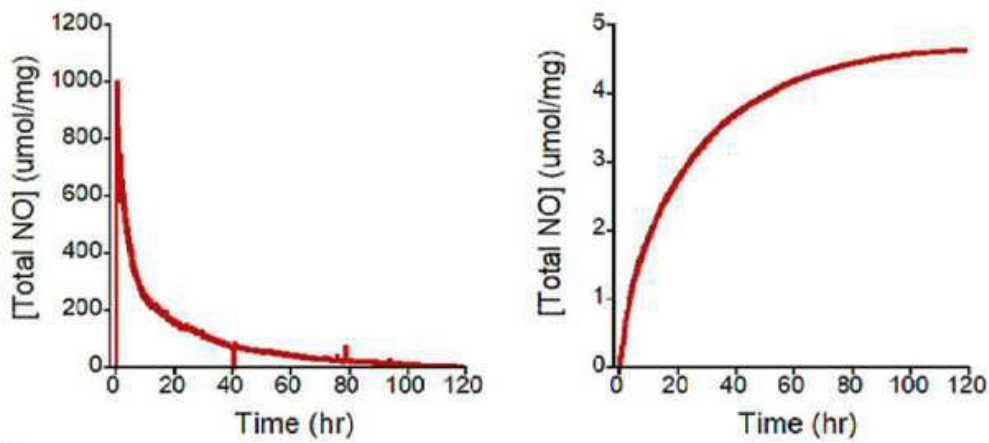
도면1



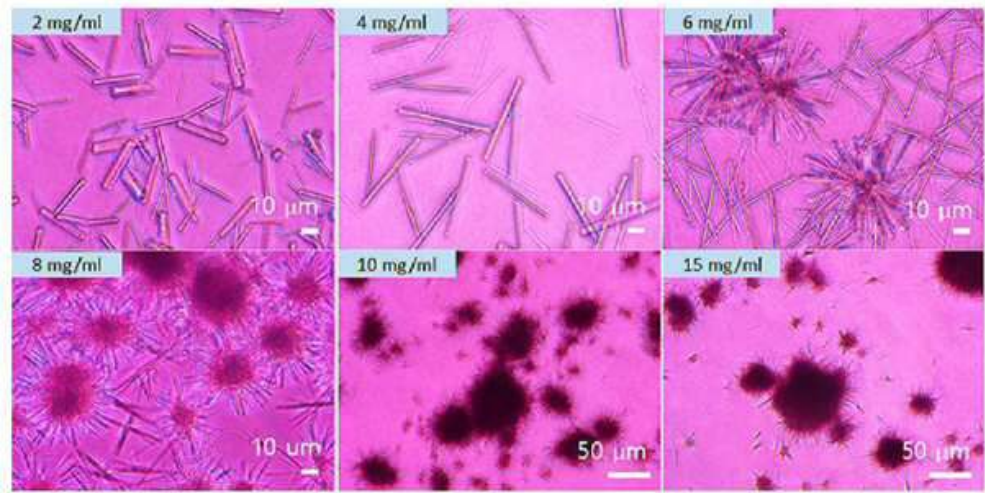
도면2



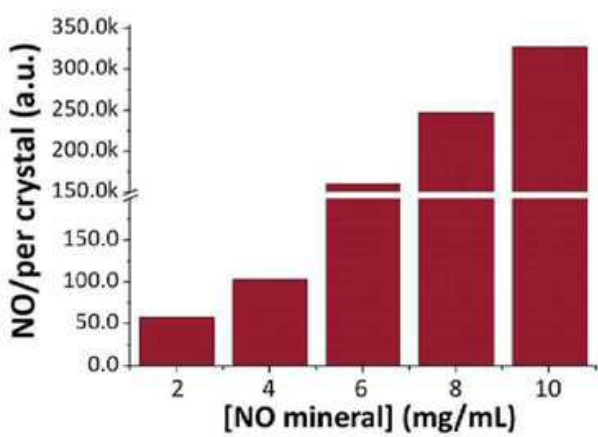
도면3



도면4



도면5



도면6

