



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0098049
(43) 공개일자 2022년07월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/706 (2006.01) A61K 8/60 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61P 17/16 (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/706 (2013.01)
A61K 8/60 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7022241(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년10월30일
심사청구일자 2022년06월29일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7026414
원출원일자(국제) 2014년10월30일
심사청구일자 2021년08월19일
- (85) 번역문제출일자 2022년06월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/063260
- (87) 국제공개번호 WO 2015/066382
국제공개일자 2015년05월07일
- (30) 우선권주장
61/897,713 2013년10월30일 미국(US)

- (71) 출원인
크로마텍스 아이엔씨.
미국, 캘리포니아 92618, 어바인, 슈트 쥐, 10005
뮤어랜즈
- (72) 발명자
데렌-르위스, 앤
미국, 캘리포니아 92618, 어바인, 슈트 쥐, 10005
뮤어랜즈 블러바드
로네무스, 트로이
미국, 캘리포니아 92691, 26991 모로 아즐 미션
비에요
- (74) 대리인
허용특

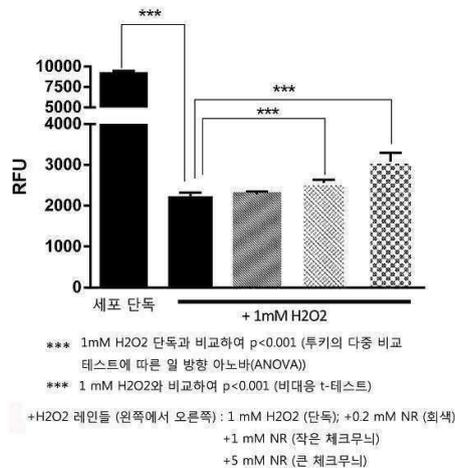
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 피부 질환 치료에서의 국소적 사용을 위한 니코틴아미드 리보사이드 조성물

(57) 요약

니코틴아미드 리보사이드(NR)를 함유하는 조성물이 제공된다. NR을 함유하는 조성물은 피부 및 피부 질환의 관리 또는 치료에 사용된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 니코틴아미드 리보사이드를 포함하는 약학적 조성물 및 화장료 조성물에 관한 것이다. 추가 실시형태에서, 본 발명은 세포 및 조직 생존을 개선하기 위하여 세포 및 조직에서 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드(NAD+)의 세포내 수준의 증가를 촉진하는데 니코틴아미드 리보사이드를 사용하는 방법에 관한 것이다. 치료를 필요로 하는 개인에게 유효량의 화합물 니코틴아미드 리보사이드, 또는 그 염을 국소적으로 투여하는 것을 포함하는, 개인의 노화의 증상 및 징후 또는 피부 주름을 치료하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 17/16 (2018.01)

A61P 17/18 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

니코틴아미드 리보사이드 화합물 또는 그 염을 포함하는, 개인의 피부에서 UV-매개 DNA 손상의 예방 또는 치료용 화학보호 조성물로서,

조성물은 국소적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 화학보호 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 조성물은 사이클로부테인-피리미딘 이합체 (CPDs) 또는 6-4 광생성물질 (64 pps)의 형성에 의해 나타낸 DNA 손상을 10% 이상 감소시키는 것을 특징으로 하는, 화학보호 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 화학보호 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 니코틴아미드 리보사이드 화합물은 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 아세테이트, 아스코베이트, 벤조에이트, 카보네이트, 시트레이트, 카바메이트, 포메이트, 글루코네이트, 락테이트, 메틸 브로마이드, 메틸 설페이트, 나이트레이트, 포스페이트, 디포스페이트, 숙시네이트, 설페이트, 및 트리플루오로아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된 염인 것을 특징으로 하는, 화학보호 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 니코틴아미드 리보사이드 화합물은 클로라이드 염인 것을 특징으로 하는, 화학보호 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 니코틴아미드 리보사이드 화합물 또는 그 염은 조성물 총 중량 대비 0.01 중량% 내지 50 중량%의 범위인 것을 특징으로 하는, 화학보호 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 니코틴아미드 리보사이드 화합물 또는 그 염은 조성물 총 중량 대비 0.1 중량% 내지 10 중량%의 범위인 것을 특징으로 하는, 화학보호 조성물.

청구항 8

니코틴아미드 리보사이드 화합물 또는 그 염을 포함하는, 개인의 피부에서 산화적 손상에 의한 노화의 징후 또는 증상, 또는 피부 주름의 예방 또는 개선용 세포보호 조성물로서,

조성물은 국소적으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 세포보호 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 조성물은 산화적 손상에 의한 세포 사멸을 10% 이상 감소시키는 것을 특징으로 하는, 세포보호 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서, 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포보호 조성물.

청구항 11

제 8항에 있어서, 니코틴아미드 리보사이드 화합물은 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 아

세테이트, 아스코베이트, 벤조에이트, 카보네이트, 시트레이트, 카바메이트, 포메이트, 글루코네이트, 락테이트, 메틸 브로마이드, 메틸 설페이트, 나이트레이트, 포스페이트, 디포스페이트, 숙시네이트, 설페이트, 및 트리플루오로아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된 염인 것을 특징으로 하는, 세포보호 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 니코틴아미드 리보사이드 화합물은 클로라이드 염인 것을 특징으로 하는, 세포보호 조성물.

청구항 13

제 8항에 있어서, 니코틴아미드 리보사이드 화합물 또는 그 염은 조성물 총 중량 대비 0.01 중량% 내지 50 중량%의 범위인 것을 특징으로 하는, 세포보호 조성물.

청구항 14

제 8항에 있어서, 니코틴아미드 리보사이드 화합물 또는 그 염은 조성물 총 중량 대비 0.1 중량% 내지 10 중량%의 범위인 것을 특징으로 하는, 세포보호 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 니코틴아미드 리보사이드(nicotinamide riboside, NR)를 포함하는 조성물은 피부 및 피부 질환의 관리 또는 치료에서 사용될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 본 발명은 니코틴아미드 리보사이드를 함유하는 약학적 조성물 및 화장품 조성물에 관한 것이다. 추가 실시형태들에서, 본 발명은 세포 및 조직 생존율 및 전체 세포 및 조직 건강을 개선하기 위하여, 세포 및 조직에서 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드(NAD+)의 세포내 수준의 증가를 촉진하기 위해 니코틴아미드 리보사이드를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] NAD+를 이용하는 효소들은 DNA 수선 과정에 도움이 된다. 구체적으로, 폴리 (ADP-리보오스) 폴리머라아제 (PARPs), 특히 PARP-1은 DNA 가닥 파손에 의해 활성화되고 DNA 수선에 영향을 미친다. PARPs는 아데노신 디포스페이트 리보오스(ADPR) 공여자로서 NAD+를 소비하고 히스톤 및 PARP 그 자체와 같은 핵 단백질 위에 폴리 (ADP-리보오스)를 합성한다. PARP 활성이 DNA 수선을 용이하게 하지만, PARP의 과활성은 세포성 NAD+의 상당한 소모를 야기할 수 있고, 이는 세포 괴사를 일으킨다. NAD+ 대사의 유전독성(genotoxicity)에 대한 명확한 민감도 때문에 세포 생존을 개선하기 위한 수단으로서의 PARP의 억제에 대한 약학적 연구가 이루어졌다. 많은 보고들은 PARP 억제가 유전독성에 중독되는 세포들에서 NAD+ 농도를 증가시키고, 결과적으로 세포 괴사를 감소시킨다는 것을 보여 주었다. 그럼에도 불구하고, 독성에 기인한 세포 사멸은 여전히 발생하는데, 그것은 아마도 세포들이 유전독성에 의해 활성화된 세포자살 경로(apoptotic pathway)를 완성할 수 있기 때문일 것이다. 따라서, 심지어 PARP를 억제하더라도, DNA/거대분자 손상의 결과에 의해 여전히 상당한 세포 사멸이 있다. 이러한 결과는 유전독성에서의 NAD+ 대사의 개선이 세포 생존 개선에는 부분적으로 영향을 미칠 수 있지만 세포자살 민감도를 조절하는 다른 플레이어들, 예를 들어 서투인(sirtuin)이 또한 유전독소에 대한 세포 반응에서 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 암시한다.

[0003] 조직에서 화학적 및 방사선 독성의 영향을 결정하는 생리학적 및 생화학적 메커니즘은 복잡하고, 증거들은 NAD+ 대사가 세포 스트레스 반응 경로에서 중요한 플레이어라는 것을 가리킨다. 예를 들면, 니코틴아미드/니코틴산 모노뉴클레오타이드 과발현을 통한, NAD+ 대사의 상향조절은, 뉴런 축삭 변성을 방지하는 것으로 나타났고, 약학적으로 사용되는 니코틴아미드는 최근에 태아 알코올 증후군 및 태아 국소 빈혈의 모델에서 뉴런 보호를 제공하는 것으로 나타났다. 이러한 보호 효과는 상향조절된 NAD+ 생합성에 원인이 있을 수 있고, 이것은 유전독성 스트레스 동안에 고갈의 영향 하에 있는 이용가능한 NAD+ 풀(pool)을 증가시킨다. 이러한 NAD+의 고갈은 PARP 효소들에 의해 매개되고, PARP 효소들은 DNA 손상에 의해 활성화되고 세포성 NAD+를 고갈시킬 수 있고, 이것은 괴사성 사멸을 초래한다. 상향조절 NAD+ 생합성과 협력하여 작용할 수 있는, 향상된 세포 보호의 또 다른 메커니즘은 서투인 효소에 의해 조절되는 세포 보호 전사 프로그램의 활성화이다.

[0004] NAD+ 및 서투인과 연관된 세포 및 조직 보호의 예시들은, SIRT1이 트라우마 및 유전독성과 관련된 신경세포보호를 위해 요구된다는 발견을 포함한다. SIRT1은 또한 감소된 NFKB 신호(signaling)를 통해 아밀로이드-베타의 소

교세포-의존성 독성을 감소시킬 수 있다. SIRT1 및 증가된 NAD⁺ 농도는 알츠하이머 질환의 모델에서 신경세포 보호를 제공한다. 서투인은 스트레스 반응 경로를 상향조절하는 단백질 탈아세틸화효소 및 ADP-리보실전달효소 활성을 갖는 NAD⁺ 의존성 효소이다. 증거는 SIRT1이 열량 제한에 의해 상향조절되고 인간에서 p53 및 Ku70 작용의 하향조절을 통해 세포자살에 대한 보호를 세포들에 제공한다는 것을 보여준다. 또한, SIRT1은 MnSOD와 같은, 활성 산소종(ROS) 해독에 참여하는 단백질의 FOXO-의존성 전사를 상향조절한다. 서투인 SIRT6는 DNA 수선 경로에 참여하고 게놈 안정성을 유지하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 니코틴아미드 리보사이드를 포함하는 니코티닐 리보사이드와 관련하여, 다양한 용도가 여기에 참조로 포함되어 있는 미국특허 제8,106,184호에서 제안되어 있다.

[0005] UV-매개 DNA 손상

[0006] 자외선(UV) 광은 노화부터 암에 이르기까지 수많은 피부 질환의 진전에서 필수적인 역할을 한다. 수십 년에 걸친 상당한 증거는 UV 조사가 복수의 독립적인 세포성 반응들을 촉발한다는 것을 결정적으로 보여주었다. UV 조사는 피부에 침투하여 거기에서 단백질, 지질 및 DNA에 의해 흡수되고, 세포 구조 및 세포 기능의 점진적인 저하(deterioration)를 초래하는 일련의 이벤트를 야기한다(Valacchi, et al., "Cutaneous responses to environmental stressors," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2012) 1271: 75-81). DNA는 생명의 기본 구성(building block)이고 그것의 안정성은 모든 살아있는 세포들의 적절한 작용을 위해서 가장 중요하다. UV 조사는 돌연변이성 및 세포독성 DNA 병변들-특히 사이클로부테인-피리미딘 이합체(CPDs) 및 6-4 광생성물질(64 pps)-을 유도함으로써 광범위한 세포 질환들을 야기할 수 있는 가장 강력한 (그리고 일반적인) 환경 인자들 중 하나이다(Narayanan, et al., "Ultraviolet radiation and skin cancer," *Int. J. Dermatol.* (2010) 49: 978-86). UV-매개 DNA 손상이 증식성 세포 질환들의 과정에서의 초기 이벤트라는 것에 주목하는 것은 중요하다. 2가지의 주요 UV-유도 DNA 손상의 형태는 CPDs와 64pp(그것들의 듀어 이성질체들(Dewer isomers)와 함께)이다(Sinha, R.P. and Hader, D.P., "UV-induced DNA damage and repair: a review," *Photochem. Photobiol. Sci.* (2002) 1: 225-36; and Rastogi, et al., "Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair," *J. Nucleic Acids* (2010) 2010: 592980). 이들 풍부한 DNA 병변들은, 수선되지 않는다면, DNA 복제에 관여할 수 있고, 그 다음에 DNA에서 돌연변이를 일으킬 수 있다. 따라서, 이들 병변은 (잠재적으로 증식성 질환들을 일으키는) 돌연변이원성일 수 있고/있거나 (세포 사멸을 일으키는) 세포독성일 수 있다. 64pp는 CPDs 빈도의 약 1/3 정도로 발생하지만, 좀더 돌연변이성이다(Sinha & Hader, 2002). 일 실시형태에서, 이들 UV-매개 DNA 부가물을 방지하는 것은, 노화부터 암까지, 몇몇 증식성 질환의 발생을 예방하는데 있어 중요하다.

[0007] UV-매개 장벽기능 손실

[0008] 기관과 외부환경 사이에서 수분-불투과성 장벽을 유지하는 것은 피부의 필수적인 기능이다. 이러한 장벽기능은 탈수-기관의 사멸을 야기할 수 있음-를 방지한다(Jiang, S.J., et al., "Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient," *Exp. Dermatol.* (2007) 16: 985-992). UV 광은 용량 의존적 방식으로 상피 세포의 피부장벽 기능을 파괴하는 것으로 알려져 있다(Haratake, A., et al., "UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response" *J. Invest. Dermatol.* (1997) 108: 769-775; 및 이전 인용). 피부장벽 기능장애는, 피부 수화도의 측정인 경피 수분 손실(Transepidermal Water Loss, TEWL)을 측정하여 바로 산출될 수 있다(Oba, C., et al., "Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice," *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* (2013) 29: 204-11; 및 이전 인용).

[0009] 그러므로, 몇몇 인간 피부 질환들에 대한 화학예방성 작용제가 건강한 인간 피부를 유지하는 것을 돕는데 있어서 직접적인 UV-매개 피부장벽기능 손실, DNA 손상, 또는 산화적 손상을 억제하거나 예방하는데 효과적일 것이라는 가설이 세워진다.

[0010] 건강한 인간 피부의 유지 면에서 국소 피부 관리 조성물에 니코틴아미드 리보사이드, 또는 그 염을 사용하기 위한 방법이 발견될 수 있다면, 이것은 본 기술분야에 유용한 기여를 할 것이다. 또한, 건강한 인간 피부를 유지하는 면에서 화장품 또는 약용 화장품 조성물에 니코틴아미드 리보사이드, 또는 그 염을 사용하기 위한 방법이 발견될 수 있다면, 이것은 본 기술분야에 유용한 기여를 할 것이다.

발명의 내용

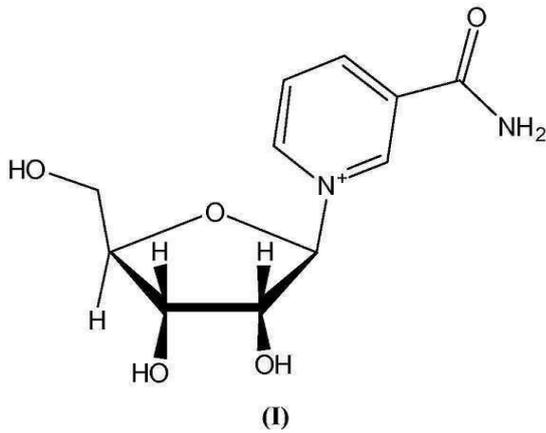
해결하려는 과제

- [0011] 피부 관리 조성물은 니코틴아미드 리보사이드, 또는 그 염을 포함하고, 선택적으로 스틸베노이드(예, 프테로스틸벤(pterostilbene)), 커큐민, 펩타이드, 레티놀, 살리실산, 벤조일 페록사이드, 비타민 C(L-아스코르브산), 안토시아닌, 또는 그것들의 조합물에서 선택된 화합물과 조합되어 포함된다.
- [0012] 일 실시형태에서, 니코틴아미드 리보사이드는 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 포메이트, 아세테이트, 아스코베이트, 벤조에이트, 카보네이트, 시트레이트, 카바메이트, 포메이트, 글루코네이트, 락테이트, 메틸 브로마이드, 메틸 설페이트, 나이트레이트, 포스페이트, 디포스페이트, 숙시네이트, 설페이트, 또는 트리플루오로아세테이트에서 선택된 염 형태이다.
- [0013] 치료를 필요로 하는 개인에게 유효량의 화합물 니코틴아미드 리보사이드, 또는 그 염을 국소적으로 투여하는 것을 포함하는, 개인의 노화 또는 피부 주름의 징후 또는 증상을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0014] 치료를 필요로 하는 개인에게 치료 유효량의 화합물 니코틴아미드 리보사이드, 또는 그 염을 국소적으로 투여하는 것을 포함하는, 개인의 피부의 UV-매개 DNA 손상을 치료 또는 예방하기 위한 화학보호(chemoprotective) 방법이 제공된다.
- [0015] 치료를 필요로 하는 개인에게 치료 유효량의 화합물 니코틴아미드 리보사이드, 또는 그 염을 국소적으로 투여하는 것을 포함하는, 개인의 피부의 산화적 손상을 치료 또는 예방하기 위한 세포보호 방법이 제공된다.
- [0016] 치료를 필요로 하는 개인에게 치료 유효량의 화합물 니코틴아미드 리보사이드, 또는 그 염을 국소적으로 투여하는 것을 포함하는, 개인의 피부의 상처 치료 또는 복구하기 위한 방법이 제공되고, 여기에서 피부 내의 피부 세포들은 증가된 운동성 및/또는 증식성을 갖는다.

과제의 해결 수단

- [0017] 특정 실시형태에서, 니코틴아미드 리보사이드(NR), 또는 그 염은 NAD⁺ 활성을 증가시킬 수 있다. NAD⁺가 SIRT1의 기질로서 작용할 수 있기 때문에 증가하는 NAD⁺ 활성은 서투린 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 또한 여겨진다. 이러한 작용제는 NAD⁺ 또는 NADH, NAD⁺의 전구체, NAD⁺ 회수 경로(salvage pathway)에서의 중간체 또는 NAD⁺를 생성하는 물질-예를 들어 니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 아데닐릴전이효소(NMNAT) 또는 니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 아데닐릴전이효소를 인코딩하는 핵산-을 포함할 수 있다. 니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 아데닐릴전이효소는 NMNAT1 단백질일 수 있다. 다른 유용한 NAD⁺ 전구체는 니코틴아미드 및 니코틴산을 포함한다. 여기에 참조로 포함된, 밀브랜트(Milbrandt) 등의 미국특허 제7,776,326호는 NAD 생합성 경로를 상세하게 기술한다.
- [0018] 일 실시형태에서, 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염을 세포와 접촉시켜서, 세포의 수명을 연장시키고, 세포의 증식 능력(capacity)을 연장시키고, 세포의 노화를 늦추고, 세포의 생존을 촉진하고, 세포에서 세포성 노화를 지연시키고, 열량 제한의 효과를 모방하고, 스트레스에 대한 세포의 내성을 증가시키고, 또는 세포의 세포자살을 예방하는 방법을 제공한다. 예시적인 실시형태에서, 상기 방법들은 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염을 피부 세포들과 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0019] 또 다른 실시형태에서, 장시간 동안 보존하려는 세포들은 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염으로 처리될 수 있다. 세포들은 현탁액(예, 혈액 세포, 혈청, 생물학적 성장 배지 등) 내에 또는 조직들이나 기관들 내에 존재할 수 있다. 예를 들면, 수혈 목적으로 개인으로부터 수집된 혈액은, 더 장시간 동안 혈액 세포들을 보존하기 위하여, 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염으로 처리될 수 있다. 추가로, 법의학적으로 사용되는 혈액은 또한 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염을 사용하여 보존될 수 있다.
- [0020] 세포들의 수명을 연장하거나 세포자살로부터 보호하기 위하여 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염을 이용하여 치료, 또는 보호될 수 있는 특정 세포들은 피부 세포들, 예를 들어 케라티노사이트, 멜라노사이트, 표피 세포, 상피 세포, 수지상(랑게르한스) 세포, 기저 세포, 편평상피 세포, 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 모낭 등을 포함한다.
- [0021] 세포들의 수명을 연장하거나 세포 자살로부터 보호하기 위하여 처리될 수 있는 다른 세포들은 생산용, 소비용 또는 식품용 세포, 예컨대 비-인간 포유동물 유래 세포(예를 들어 쇠고기) 또는 식물 세포(예를 들어 채소)를 포함한다.

[0022] 니코틴아미드 리보사이드(NR)는 구조식(I)을 갖는 피리디늄 화합물이다:



[0023]

[0024] 구조식(I)의 화합물은 염 반대이온, 예를 들어 할라이드(클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드 등을 포함함), 포메이트, 아세테이트, 아스코베이트, 벤조에이트, 카보네이트, 시트레이트, 카바메이트, 포메이트, 글루코네이트, 락테이트, 메틸 브로마이드, 메틸 설페이트, 나이트레이트, 포스페이트, 디포스페이트, 숙시네이트, 설페이트, 트리플루오로아세테이트, 베실레이트, 토실레이트, 트리플레이트, 메실레이트 등을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 레밍턴의 약학 과학의 최신판(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA), S. 버지(Berge) 등의 논문(*J. Pharmaceut. Sci.* (1977) 66:1-19 (그리고 거기에서 언급된 참조문헌들)), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J. Swarbrick, Ed., Vol. 13, pp. 453-499 (New York: Marcel Dekker, Inc., 1996)에 수록된 L.D. 바일리(Bighley) 등의 책 챕터 "Salt Forms of Drugs and Absorption"(그리고 거기에서 언급된 참조문헌들)이 참조되고; 모두 여기에서 참조로 포함된다.

[0025] 클로라이드 염으로서, 니코틴아미드 리보사이드(NR)는 크로마텍스사 (ChromaDex Inc. Irvine, California)의 니아겐(NIAGEN)TM으로 상업적으로 구입가능하다.

[0026] 단독으로 또는 NR과 조합하여, 국소 적용을 위한 다른 유용한 화합물은 니코틴산 리보사이드(NAR), 1,4-디하이드로 환원 NR 또는 NAR(즉, 환원된 니코틴아미드 리보사이드(NRH) 또는 환원된 니코틴산 리보사이드(NARH)) 등을 포함한다.

[0027] 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염은 또한 포유동물, 식물, 곤충 및 미생물의 발달 및 성장 단계 동안, 예컨대 발달 및/또는 성장 과정을 변경, 지연, 또는 촉진하기 위하여 적용될 수 있다.

[0028] 유효량의 NR을 이용하여, 자외선(UV)에 의해 야기된 피부의 DAN 손상을 억제 또는 예방하거나, 산화적 손상을 억제 또는 예방하기 위한 화학보호 방법이 개발되었다. 피부에서 차후의 UV-매개 DNA 손상, 또는 산화적 손상을 예방하기 위하여 개인에게 투여하기 적절한 프테로스틸벤을 함유하는 약학적 및 기능성 식품 조성물이 기술된다.

[0029] 또 다른 실시형태에서, 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염은, 예를 들어 고휘 조직 이식편, 기관 이식물, 세포 현탁액, 줄기 세포, 골수 세포 등을 포함하는 이식 또는 세포 치료에 유용한 세포들을 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 세포들 또는 조직은 자가이식편, 동종이식편, 동계이식편 또는 이종이식편일 수 있다. 세포들 또는 조직은 대상으로의 투여/이식(implantation) 이전에, 투여/이식과 함께, 및/또는 투여/이식 이후에, 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염으로 처리될 수 있다. 세포들 및 조직은, 공여자 개체로부터 세포를 제거하기 전에, 공여자 개체로부터 세포들 또는 조직을 생체 외(ex vivo) 제거한 후에, 또는 수용자(recipient)에게 이식한 후에, 처리될 수 있다. 예를 들면, 공여자 또는 수용자 개체는 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염으로 전신적으로 처리되거나, 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염으로 국부적으로 처리된 세포들/조직의 대상을 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포들 또는 조직(또는 공여자/수용자 개체들)은 이식 생존율을 연장하기에 유용한 하나 이상의 추가 치료제, 예를 들어 면역억제제, 사이토카인, 혈관생성인자(angiogenic factor) 등으로 처리될 수 있다.

[0030] 추가의 다른 실시형태에서, 세포들은, 예컨대 그것들의 수명을 연장시키거나 세포자살을 예방하기 위하여, 생체 내 NAD⁺ 수준을 증가시키는 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염으로 처리될 수 있다. 예를 들면, 주요 실시형

태에서, 피부는 세포내 NAD⁺ 수준을 증가시키는 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염으로 피부 또는 상피 세포들을 처리하여 노화(예, 주름 발생, 탄력의 손실 등)로부터 보호될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 피부는 세포내 NAD⁺ 수준을 증가시키는 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염을 포함하는 약학적 조성물 또는 화장품 조성물과 접촉된다. 여기에서 기술된 방법에 따라 치료될 수 있는 예시적인 피부 고통 또는 피부 질환은 염증, 태양 손상 또는 자연 노화와 관련되거나 그것들에 의해 야기된 질환 또는 질병을 포함한다. 예를 들면, 조성물은 접촉성 피부염(자극성 접촉 피부염 및 알레르기성 접촉 피부염을 포함함), 아토피 피부염(알레르기성 습진으로도 알려짐), 광선각화증(actinic keratosis), 각화 질환(습진을 포함함), 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa diseases)(펜피구스(penfigus)를 포함함), 박리성 피부염, 지루성 피부염, 홍반(다형성 홍반 및 결절성 홍반을 포함함), 태양 또는 다른 광원에 의한 손상, 원판상 루프스 홍반(discoid lupus erythematosus), 피부근염(dermatomyositis), 건선(psoriasis), 피부암 및 자연 노화의 효과의 예방 또는 치료에서 유용성이 찾아진다. 또 다른 실시형태에서, 세포내 NAD⁺ 수준을 증가시키는 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염은, 치료를 촉진하기 위하여, 예를 들면, 1도, 2도, 또는 3도 화상 및/또는 열적, 화학적 또는 전기적 화상을 포함하는, 상처 및/또는 화상 치료에 사용될 수 있다. 제제는, 바람직한 결과를 가져오는데 효과적인 투여 방법에 따라서, 추가로 여기에서 기술된 바, 연고, 로션, 크림, 미세에멀전, 젤, 용액 등으로서 피부 또는 점막 조직에 국소적으로 투여될 수 있다.

[0031] 세포내 NAD⁺ 수준을 증가시키는 하나 이상의 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염을 포함하는 국소 제제는 또한, 예방적, 예컨대 화학예방적, 조성물로서 사용될 수 있다. 화학예방적 방법에 사용되는 경우, 민감한 피부는 특정 개인에서 어떠한 보이는 증상 전에 처리된다.

[0032] 국소 제제는 생체 내 NAD⁺ 수준을 증가시킬 수 있는 다른 NAD⁺ 전구체 또는 화합물, 예를 들어 제한되지 않지만 니코틴아미드 및 니코틴산을 포함할 수 있다.

[0033] 국소 조성물에서 NR 또는 그 염의 유용한 범위는 조성물 총 중량 대비 약 0.001 중량% 내지 약 50 중량%를 포함한다. NR의 또 다른 적절한 범위는 조성물 총 중량 대비 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량%이다. NR의 또 다른 적절한 범위는 조성물 총 중량 대비 약 0.5 중량% 내지 약 5 중량%이다.

[0034] NR의 구강 제제가 고려된다. NR의 유용한 치료 용량은, 제한되지 않지만, 인간 개인에서 약 1 mg 내지 약 5,000 mg 범위일 수 있다. 또 다른 적절한 용량 범위는 약 5 mg 내지 약 500 mg이다. 또 다른 적절한 용량 범위는 약 50 mg 내지 약 500 mg이다. NR은 약학적으로 또는 기능성 식품으로 적절한 담체를 각각 포함하는, 약학적 또는 기능성 식품 조성물로서 경구용으로 또는 국소용으로 제제화될 수 있다. NR을 함유하는 약학적 조성물의 일 실시형태에서, NR의 적절한 수준은 조성물 총 중량 대비 약 0.01 중량% 내지 약 50 중량% 범위일 수 있다. NR을 함유하는 약학적 조성물의 또 다른 실시형태에서, NR의 적절한 수준은 조성물 총 중량 대비 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량% 범위일 수 있다.

[0035] 인간 피부는 하부 진피층(진피) 위에 놓인 상부 상피층(상피)를 포함한다. 상피는 일차적으로 케라티노사이트로 이루어지고, 이것은 바닥에서 발달하여 상부로 이동하고, 그리고 끊임없이 교체된다. 오래된 죽은 세포들이 벗겨지면, 그것들이 교체되고, 그리하여 이 층은 끊임없이 스스로 새롭게 된다. 상피는 또한 층의 하부 근처에 일반적으로 위치하는, 멜라노사이트를 함유하고, 이것은 피부 색상에 기여하고, 또한 UV-보호를 제공하는, 멜라닌 색소를 생산한다. 상피는 또한 수지상(랑게르한스) 세포를 함유하고, 이것은 면역계에 참여하고, 층의 하부에서 발견되는 기저 세포이다. 상피는 또한 편평상피 세포를 포함한다. 상피층 및 진피층은 또한 줄기 세포와 모낭을 함유한다. 포유동물에서, 멜라노사이트는 또한 다른 조직들 중에서 뇌, 눈, 귀 및 심장에 분포되어 있다.

[0036] 기술된 피부 세포들은 UV 광-유도 손상, DNA 손상 및 발암에 민감하다. 또한 정상 노화는 주름의 형성, 검버섯, 피부 탄력 손실, 및 표면 주름, 거친 깊은 주름, 확대된 모공, 광손상, 비늘모양(scaliness), 얇은 조각(flakiness), 건조, 피부 늘어짐(sagging), 눈 주변 피부의 붓기, 아래턱 주변 피부의 붓기, 피부 단단함(firmness)의 손실, 피부 당김(tightness)의 손실, 장벽기능 손실, 변형으로 인한 피부 반동(skin recoil)의 손실, 변색, 얼룩, 창백함, 과색소침착, 각화증, 과각화증, 탄력섬유증 또는 콜라겐 파쇄, 및 셀룰라이트, 또는 이들의 조합을 포함하는 노화의 다른 징후들에 기여한다.

[0037] 그러므로, 실시형태에서, NR 또는 그 염은 다음과 같이 사용될 수 있다: 표면 주름, 거친 깊은 주름, 확대된 모공, 검버섯, 광손상, 비늘모양, 얇은 조각, 건조, 피부 늘어짐, 눈 주변 피부의 붓기, 아래턱 주변 피부의 붓기, 피부 탄력의 손실, 피부 단단함의 손실, 피부 당김의 손실, 장벽기능 손실, 변형으로 인한 피부 반동의 손실, 변색, 얼룩, 창백함, 과색소침착, 각화증, 과각화증, 탄력섬유증 또는 콜라겐 파쇄, 및 셀룰라이트, 또는 이들의 조합을 포함하는 노화의 증상들을 개선하기 위하여 사용될 수 있다.

- [0038] NR 또는 그 염은 하나 이상의 스틸베노이드와 조합하여 사용될 수 있다. 예시적인 스틸베노이드 화합물은, 혈액에서 약 105분의 반감기($t_{1/2}$)를 갖는 경구로 생체 이용가능한 화합물인 프테로스틸벤 (3,5-디메톡시-4'-하이드록시-트랜스-스틸벤)이다. 프테로스틸벤은 니코틴아미드 리보사이드 또는 그 염과 조합하여 피부 질환을 치료하기 위한 유용한 화합물이다.
- [0039] 선택적으로, NR 또는 그 염은 프테로스틸벤과 조합하여, 추가로 커큐민과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0040] 선택적으로 NR 또는 그 염은 펩타이드, 레티놀, 살리실산, 벤조일 페록사이드, 비타민 C(L-아스코르브산), 안토시아닌 또는 이들의 조합물을 포함하는 하나 이상의 화합물과 조합하여 사용될 수 있다. 한 가지 유용한 안토시아닌은 시아니딘-3-글루코사이드("C3G")이다.
- [0041] 본 발명의 화장료 또는 약용 화장료 조성물은 기능성 식품으로 허용가능한 담체와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 제제들에서 활성 성분들은 1 중량% 내지 99 중량%로, 또는 달리는 0.1 중량% 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있다. "기능성 식품으로 허용가능한 담체"는 제제의 다른 성분들과 양립할 수 있고 사용자에게 해롭지 않은 임의의 담체, 희석제 또는 부형제를 의미한다. 유용한 부형제는 미세결정성 셀룰로오스, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 임의의 적절한 당(예, 만니톨, 자일리톨)을 포함하고, 화장료 용도로는 오일계가 바람직하다.
- [0042] 본 발명의 국소 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 제제에서 활성 성분들은 1 중량% 내지 99 중량%로, 또는 달리는 0.1 중량% 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있다. "약학적으로 허용되는 담체"는 제제의 다른 성분들과 양립할 수 있고 사용자에게 해롭지 않은 임의의 담체, 희석제 또는 부형제를 의미한다.
- [0043] 특정 실시형태에 따르면, 여기에서 기술된 화장료 및/또는 국소 약학적 조성물은 참조로서 여기에 포함되는 문헌[L.V. Allen, Jr., et al., *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 9th Ed., pp. 272-293 (Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2011)]에 기술된 바와 같은 연고, 크림, 로션, 겔 또는 다른 경피 전달 시스템의 형태로 제공될 수 있다.
- [0044] 여기에서 기술된 바, 연고는 거기에 포함되거나 용해된 하나 이상의 활성 성분들을 갖는 연고 기재(즉, 제제의 다른 성분들과 함께 용융되고 일정하게 교반하면서 냉각되어 굳은 조제를 형성함)를 포함하는 반 고형 조제를 가리킨다. 연고 기재는; 유지성(oleaginous) 또는 탄소수소 기재(예, 바셀린 또는 바셀린/왁스 조합); 수용액의 혼합을 허용하여 유중수형(water-in-oil) 에멀전(예, 친수성 바셀린)을 형성하거나 또는 수용액의 추가 양의 혼합을 허용하는 유중수형 에멀전(예, 라놀린)인 흡수 기재; 물 또는 수용액에 희석될 수 있는 수중유형(oil-in-water) 에멀전인 수분 제거가능 기재(예, 친수성 연고, USP); 또는 유지성 성분들을 함유하지 않는 수용성 기재(예, 600 미만의 평균 분자량을 갖는 PEG들과 1,000 초과와 평균 분자량을 갖는 PEG를 조합한 폴리에틸렌글리콜(PEG) 제제); 등의 형태일 수 있다.
- [0045] 여기에서 기술된 바, 크림은 유중수형 에멀전 또는 수중유형 에멀전 중 하나 또는 또 다른 형태의 수세성(water-washable) 기재에 용해되거나 분산된 하나 이상의 활성 작용제 또는 의학적 작용제를 함유하는 반고형 조제를 가리킨다. 일반적으로, 크림은 그것이 피부와 같은 표면에 쉽게 도포/확산되는 것 및 그것이 처리된 표면으로부터 쉽게 제거되는 것에 의해 연고와는 구별된다.
- [0046] 여기에서 기술된 바, 로션은 수성 비히클 중의 고형 물질의 현탁액을 가리킨다. 일반적으로, 로션은 기름기 없는(non-greasy) 특징과 연고, 크림 및 겔보다 향상된 피부의 넓은 면적에 걸친 퍼짐성을 갖는다.
- [0047] 여기에서 기술된 바, 겔은 겔화제를 추가하여 젤리 모양으로 만들어진 수성 액체 비히클 중의 작은 분자들 및/또는 큰 분자들의 분산물을 포함하는 반고형계를 가리킨다. 적절한 겔화제는, 제한되지 않지만, 합성 거대 분자(예, 카보머 폴리머), 셀룰로오스 유도체(예, 카복시메틸셀룰로오스 및/또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스), 및 천연 검(예, 트라가칸트 검, 카라기난 등)을 포함한다. 겔 조제는 가시적인 경계나 2-상(phase)의 겔 없이 액체 비히클 전체에 걸쳐서 활성 또는 의학적 성분들이 균일하게 분산되어 있는 단일 상 겔의 형태일 수 있고, 여기에서 활성 또는 의학적 성분들의 응집이나 작은 구별되는 입자들은 액체 비히클 내에 분산된다.
- [0048] 경피 조제는 침투 촉진제와 조합되어 있는 연고, 크림 또는 겔에서 형성될 수 있고 활성 또는 의학적 성분을 전신적으로 전달하도록 설계된다. 침투 촉진제는 예를 들면, 다른 것들 중에서 디메틸 설펝사이드, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 글리세린, PEG, 우레아, 디메틸 아세트아미드, 소듐 라우릴 설펝사이드, 폴록사머, 스펠, 트윈, 레시틴, 및/또는 테르펜을 포함한다.

- [0049] 화장료 및/또는 국소 약학적 조성물로서 사용하기 위한 다른 적절한 반 고형 형태는 페이스트(연고보다는 뽀뽀하게 만들어진 고형 물질을 대부분 함유하는 조제) 및 글리세로젤라틴(젤라틴, 글리세린, 물, 및 활성 또는 의학적 성분을 함유하는 플라스틱 덩어리)을 포함한다.
- [0050] 다른 실시형태에서 국소 및/또는 화장료 조성물은 여기에 참조로 포함된 문헌[*Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms*, B. Nickerson, Ed. (New York: Springer, 2011)]에 기술된 용량 형태에 따라 제조될 수 있다.
- [0051] 프테로스티벤은, 예를 들면 인간 환자에게, 약 10 mg 내지 약 250 mg의 매일의 국소 용량으로 제공될 수 있다. 또 다른 적절한 국소 용량 범위는 매일 약 50 mg 내지 약 150 mg이다. 또 다른 적절한 국소 용량 범위는 매일 약 50 mg 내지 약 100 mg이다. 특히 적절한 용량은 매일 투여되는 약 100 mg이다.
- [0052] 투여 경로
- [0053] 화합물들은 제한되지 않지만, 경구, 설하, 구강, 안구, 폐, 직장, 및 비경구 투여, 또는 경구 또는 비강 스프레이(예, 분무된 증기, 액적, 또는 고형 입자 의 흡입)를 포함하는, 임의의 경로로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 동맥내, 복강내, 비강내, 질내, 방광내(예, 방광(bladder)), 피부내, 경피, 국소, 또는 피하 투여를 포함한다. 본 발명의 범위 내에는 또한, 나중에 전신적으로 또는 국소적으로 약물이 방출되게 되는, 제어된 제제에서 환자의 신체에 NR을 서서히 주입하는 것이 고려된다. 예를 들면, 약물은 순환계로 제어 방출되기 위하여 데포(depot)에 위치될 수 있다.
- [0054] 상기에서 기술된 방법들은 이어지는 실시예와 관련하여 추가로 설명될 수 있다. 실시예 각각에서, NR 또는 그 염이 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1은 성장 억제된 조건 하에서(1% 소 태아 혈청, FBS) 1mM H₂O₂; 대조군, +0.2 mM NR; +1 mM NR; 및 +5 mM NR로 배양된 인간 유포피(epidermoid) A431 세포들의 산화적 손상 보호 분석을 도시한다. 살아있는 세포들은 반사형광 단위(RFU)로 나타낸다.
- 도 2는 정상 성장 조건 하에서(10% FBS) 1mM H₂O₂; 대조군, +0.04 mM NR; +0.2 mM NR; 및 +1 mM NR로 배양된 도 1의 실험을 도시한다.
- 도 3은 세포 배지(대조군); +1 mM NR; 및 +5 mM NR로 미리 처리되고; 이어서 모든 샘플들은 10 J/m²에서 UV-C 조사에 노출시킨 인간 유포피 A431 세포들의 UV 손상 분석을 도시한다. UV-유도 DNA 손상은 사이클로부테인 피리미딘 이합체(CPD) 수준으로 반영된다.
- 도 4a는 1% FBS로 배양된(0 시간) 마우스 NIH 3T3 섬유아세포들의 첫 번째 스크래치 상처 치료 분석을 나타내는 40 배(40X) 확대 현미경 사진이다.
- 도 4b는 세포 이동을 통한 갭 봉합(gap closure)을 보여주는 1% FBS로 배양된(24 시간) 도 4a의 스크래치 상처 치료 분석을 나타내는 40 배(40X) 확대 현미경 사진이다.
- 도 5a는 5% FBS 대조군으로 배양된(0 시간) 마우스 NIH 3T3 섬유아세포들의 첫 번째 스크래치 상처 치료 분석을 나타내는 40 배 확대 현미경 사진이다.
- 도 5b는 세포 이동을 통한 갭 봉합을 보여주는 5% FBS 대조군으로 배양된(24 시간) 도 5a의 스크래치 상처 치료 분석을 나타내는 40 배 확대 현미경 사진이다.
- 도 6a는 1% FBS + 1 mM NR로 배양된(0 시간) 마우스 NIH 3T3 섬유아세포들의 두 번째 스크래치 상처 치료 분석을 나타내는 40 배 확대 현미경 사진이다.
- 도 6b는 세포 이동을 통한 갭 봉합을 보여주는 1% FBS + 1 mM NR로 배양된(24 시간) 도 6a의 스크래치 상처 치료 분석을 나타내는 40 배 확대 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0056] 실시예 1

- [0057] 일 실시형태에서, NR은 화합물들 및/또는 약학적 제품들의 경피 전달을 위한 비히클로서 사용된다.
- [0058] 또 다른 실시형태에서, NR은 다음과 같이 사용된다: 표면 주름, 거친 깊은 주름, 확대된 모공, 검버섯, 광손상, 비늘모양, 얇은 조각, 건조, 피부 늘어짐, 눈 주변 피부의 붓기, 아래턱 주변 피부의 붓기, 피부 탄력의 손실, 피부 단단함의 손실, 피부 당김의 손실, 장벽기능 손실, 변형으로 인한 피부 반동의 손실, 변색, 얼룩, 창백함, 과색소침착, 각화증, 과각화증, 탄력섬유증 또는 콜라겐 파쇄, 및 셀룰라이트, 또는 이들의 조합을 포함하는 노화의 증상을 개선하기 위하여 사용된다.
- [0059] 또 다른 실시형태에서, NR은 주사비(rosacea), 피부염, 건선, 여드름, 및 UV 유도 손상(예를 들면, 일광화상을 포함함), 또는 이들의 조합을 포함하는 피부 손상을 치료하는 방법에서 사용된다.
- [0060] 또 다른 실시형태에서, NR은 노화의 증상을 예방하는데 도움이 되는 산화적 스트레스의 효과를 감소시키는데 사용된다.
- [0062] 실시예 2
- [0063] 일 실시형태에서, NR은 프테로스티벤과 조합하여, 선택적으로 커큐민과 추가로 조합하여 사용된다.
- [0064] 이 실시예에서, NR 함유 조합물은, 예를 들면 피부 백화(skin lightening), 염증, 및 일광 화상으로 인한 발적을 포함하는 UV/방사선으로 인한 손상 및 노화의 증상에 영향을 미치는 UV 유도 염증 조절제로서 작용한다.
- [0065] 추가로, 또 다른 실시형태에서, NR 함유 조합물은 다음과 관련된 발적 및 염증을 치료하는데 사용될 수 있다: 여드름, 주사비, 건선, 방사선 피부병, 및 상처 치료.
- [0066] 또 다른 실시형태에서, NR 함유 조합물은 다음과 같이 사용된다: 표면 주름, 거친 깊은 주름, 확대된 모공, 검버섯, 광손상, 비늘모양, 얇은 조각, 건조, 피부 늘어짐, 눈 주변 피부의 붓기, 아래턱 주변 피부의 붓기, 피부 탄력의 손실, 피부 단단함의 손실, 피부 당김의 손실, 장벽기능 손실, 변형으로 인한 피부 반동의 손실, 변색, 얼룩, 창백함, 과색소침착, 각화증, 과각화증 및 탄력섬유증 또는 콜라겐 파쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 노화의 증상들을 개선하기 위하여 사용된다.
- [0067] 또 다른 실시형태에서, NR 함유 조합물은 다음으로서 사용된다: 피부의 DNA를 수선하기 위하여, 피부의 DNA 수선을 개선하기 위하여, 및/또는 DNA-수선 과정을 강력하게 개선하기 위하여 사용된다.
- [0069] 실시예 3
- [0070] 실시형태에서, NR은 하나 이상의 스틸베노이드(즉, 스틸벤 화합물)과 조합하여 사용된다. 스틸베노이드의 예시는 비록 상이한 용도를 위한 것이지만 조셉 (Joseph) 등의 US2009/0069444에서 논의된다(여기에서 참조로서 포함됨).
- [0071] 이 실시예에서, 하나 이상의 스틸베노이드를 갖는 NR 함유 조합물은, 예를 들면 피부 백화, 염증, 여드름 및 주사비를 포함하는 UV/방사선으로 인한 손상 및 노화의 증상에 영향을 미치는 UV 유도 염증 조절제로서 작용한다.
- [0072] 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 스틸베노이드를 갖는 NR 함유 조합물은 다음과 같이 사용된다: 표면 주름, 거친 깊은 주름, 확대된 모공, 검버섯, 광손상, 비늘모양, 얇은 조각, 건조, 피부 늘어짐, 눈 주변 피부의 붓기, 아래턱 주변 피부의 붓기, 피부 탄력의 손실, 피부 단단함의 손실, 피부 당김의 손실, 장벽기능 손실, 변형으로 인한 피부 반동의 손실, 변색, 얼룩, 창백함, 과색소침착, 각화증, 과각화증 및 탄력섬유증 또는 콜라겐 파쇄, 또는 이들의 조합을 포함하는 노화의 증상들을 개선하기 위하여 사용된다.
- [0073] 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 스틸베노이드를 갖는 NR 함유 조합물은 다음과 같이 사용된다: 피부의 DNA를 수선하기 위하여, 피부의 DNA 수선을 개선하기 위하여, 및/또는 DNA-수선 과정을 강력하게 개선하기 위하여 사용된다.
- [0075] 실시예 4
- [0076] 일 실시형태에서, NR은 화합물 및/또는 약학적 제품 또는 조제의 경피 전달을 개선하기 위한 하나 이상의 펩타

이드와 조합하여 사용된다.

[0078] 실시예 5

[0079] 일 실시형태에서, NR은 여드름, 주사비, 각화증, 건선, 피부염 등에서 선택된 피부 질환을 치료하기 위하여 하나 이상의 레티놀, 살리실산, 벤조일 페록사이드, 또는 비타민 C(L-아스코르브산)과 조합하여 사용된다.

[0080] 이어지는 프로토콜에서, NR은 클로라이드 염(NIAGEN™)으로서 사용된다.

[0082] 실시예 A

[0083] 인간 피부 세포에서 산화적 손상을 예방하는 NR 처리

[0084] A431 인간 상피 세포(ATCC # CRL1555)를 배양 추천서에 따라서 T75 플라스크 중의 10% FBS 및 1% PenStrep으로 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 80% 초과 용합(confluency)에 이를 때까지 배지는 2~3일마다 교체되었다. 세포들이 추출될 때까지 세포들을 0.25% 트립신 EDTA 용액으로 2~3분 동안 트립신화하였다. 분석을 위한 추가 성장 및 증대를 위하여 1:3의 비율로 세포들을 계대배양하였다. 세포들을 트립신화하고 5,000 또는 15,000개 세포 밀도까지 계수하고 96-웰 투명 바닥 검정 플레이트에 100 μ L 배지/웰로 접종하였다. 플레이트 주변부의 바깥쪽 웰들은 접종하지 않고 남겨두었고, 대신에 배양하는 동안 가장자리 효과를 감소시키기 위하여 배지로 채웠다. 세포들이 부착되었는지 확인하기 위하여 37°C/5% CO₂의 습식 배양기에서 플레이트를 하룻밤 배양하였다. 8 시간에 배지 보충과 함께 또는 1% FBS를 사용한 성장 동조 조건(growth synchronized conditions) 하에서 24 시간 동안 사전 처리(과산화수소 없이) 하에서 또는 37°C/5% CO₂의 습식 배양기에서 20 시간의 배양을 위한 1mM 과산화수소와 함께 배지에 니코틴아미드 리보사이드 클로라이드(NR 클로라이드)를 지시된 최종 분석 농도로 추가하였다. 각 농도는 6회 반복하여 시험되었다. 적절한 대조군들: 화합물과 과산화수소 없는 세포들(세포독성 없음: 음성 대조군), 화합물은 없지만 1 mM 과산화수소가 존재하는 세포들(양성 대조군), 알라마 블루(Alamar blue) 단독을 갖는 웰들(블랭크)이 각 분석에서 유지되었다.

[0085] 세포 생존율(cell viability)을 그래프화하였고 데이터를 음성(미처리 대조군) 세포들에 대하여 주어진 분석 조건 하의 1 mM H₂O₂에 대한 세포독성 퍼센트로 또는 양성(1 mM H₂O₂) 대조군에 대하여 계산된 시험 화합물의 존재에서 세포보호 퍼센트로 나타내었다.

[0086] 성장 동조 샘플들에서, 음성 대조군에 대한 양성 대조군의 비교는 H₂O₂ 처리 후 75% 세포독성을 나타낸 반면에, 0.2 mM, 1 mM, 및 5 mM의 NR 클로라이드로 처리한 것은 대조군과 비교하여 각각 2%, 15%, 및 38% 세포보호를 나타내었다(도 1 참조).

[0087] 정상 성장 샘플들에서, 음성 대조군에 대한 양성 대조군의 비교는 H₂O₂ 처리 후 53% 세포독성을 나타낸 반면에, 0.04 mM, 0.2 mM, 및 1 mM의 NR 클로라이드로 처리한 것은 대조군과 비교하여 각각 -1%, 8%, 및 23% 세포보호를 나타내었다(도 2 참조).

[0088] 결론적으로, NR의 존재는, 심지어 성장 억제된 조건에서, 산화적 손상 매개 세포 사멸을 10~40%까지 감소시킨다는 것을 관찰하였다. 추가로 NR 클로라이드의 처리는 산화적 손상-매개 세포 사멸을 적어도 약 10% 이상 감소시키는 효과가 있을 것이라고 예상된다.

[0089] 실시예 B

[0090] 인간 피부 세포에서 유해한 UV-C-매개 손상을 예방하는 NR 처리

[0091] A431 세포주를 10% FBS를 함유하는 배양 배지 2ml 중에 4x10⁵ 세포/웰의 접종 밀도로 6-웰 플레이트에 접종하였다. 세포들을 대조군으로서 미처리 상태로 남겨두거나, 37°C에서 5% CO₂를 함유하는 완전한 습식 대기 하에서 2 시간 동안 배지에서 상이한 농도의 NR 클로라이드(5 mM 및 1 mM)로 처리하였다. 배양 후, 배양 배지를 PBS로 교체하였고, 세포들을 10 J/m² UVC 조사에 노출시켰다. UVC 노출 후 즉시 개별 대조군들과 함께 플레이트들을 회수하였다(음성 대조군은 UV-C 노출하지 않은 세포들인 한편, 양성대조군은 UV-C 노출 세포들을 미처리한 것이었다). 각 조건에서의 세포로부터 DNA를 추출하였고, NanoDrop으로 정량화하였다. 이어서 DNA 샘플들을 100 ng/웰

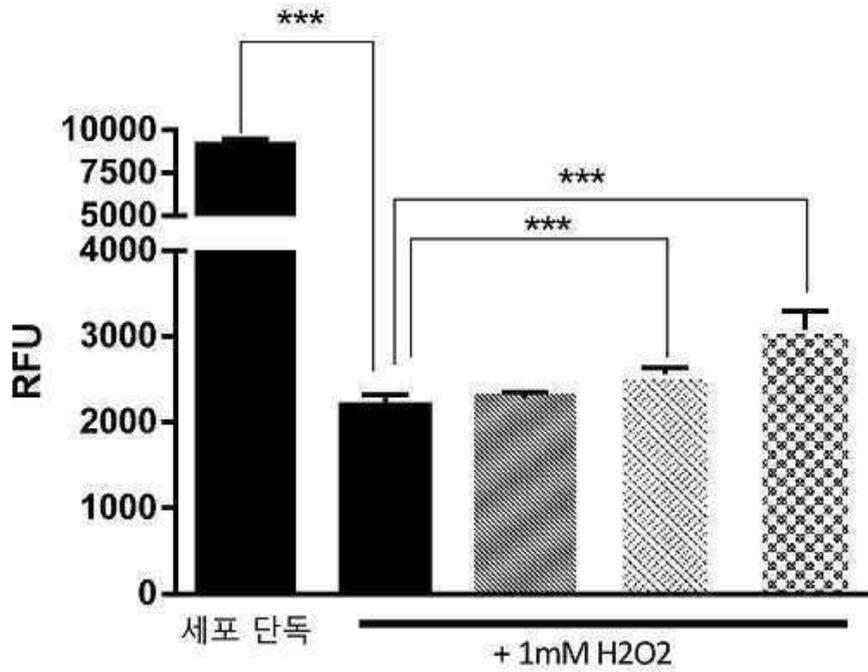
농도로 ELISA 플레이트에 첨가하였고 사이클로부테인 피리미딘 이합체(CPD)의 양을 제조사의 프로토콜에 따라 CPD-DNA 추정 키트(OxiSelect™, Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 DNA 샘플에서 추정하였다.

- [0092] UV-유도 DNA 손상은 사이클로부테인 피리미딘 이합체(CPD) 수준으로 반영된다: 1.2 µg/ml DAN 대조군; +1 mM NR 클로라이드(대조군 대비(vs.) -32%); +5 mM NR 클로라이드(대조군 대비 -34%); 2.1 µg/ml DNA 대조군; +1 mM NR 클로라이드(대조군 대비 -41%); +5 mM NR 클로라이드(대조군 대비 -50%): 도 3 참조.
- [0093] 결론적으로, NR은 처리되지 않은 UV-노출 대조군과 비교하여 CPD의 양을 32% 내지 50% 범위에서 감소시키는데 효과적이었다는 것이 관찰되었다. NR 클로라이드를 이용한 처리가 CPD 수준을 적어도 약 10% 이상 감소시키는데 효과적일 것이라고 추가로 기대된다.
- [0094] 실시예 C1(대조군 실험)
- [0095] 마우스 피부 세포에서 세포 성장 및 이동을 촉진하는 NR 처리
- [0096] NIH 3T3 섬유아세포를 ATCC (#CRL-1658™)로부터 얻었고, 37°C에서 5% CO₂를 함유하는 완전한 습식 대기 하에서 10% 소태아혈청(FBS), 4 mM L-글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)에서 배양하였다. 실험을 위해, 트립신/EDTA를 이용하여 세포들을 하부융합 단일층(subconfluent monolayers)으로부터 수집하였다. 세포 생존율은 트립판 블루 염료 배제 염색을 이용하여 95% 만큼 더 높았다. 연구는 1% FBS를 함유하는 DMEM 배지 중에서 4~7회 계대배양(passage) 세포들을 이용하여 수행되었다. 미처리 세포들(1% FBS)은 음성 대조군으로 이용되었다. NIH 3T3 섬유아세포에서 상처 봉합에 대한 니코틴아미드 리보사이드 클로라이드(NR 클로라이드)의 효과가 조사되었다.
- [0097] 세포 생존율은 세포 적정 블루(cell titer blue, Promega)로 측정하였고, 상처 봉합은 사이토셀렉트™ 상처 치료 분석 키트(CytoSelect™ Wound Healing Assay Kit, Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA)로 측정하였다. 모든 조건들은 3개의 독립적이고 제어된 실험들로서 수행되었다. 요약하면, 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지 중의 NIH 3T3 섬유아세포들(2.5x10⁵/500 µl)을, 그것들의 상처 영역(field)이 24시간 동안 동일한 방향으로 정렬된 상태에서, 각 웰에 처리된 삽입물들을 함유하는 24-웰 조직 배양 플레이트들에 접종하여, 세포들이 부착되어 약 70~80% 융합(confluence)에 도달하게 하였다. 24시간 후, 웰들로부터 삽입물들을 제거하고 세포들을 건드리지 않으면서 배지를 주의하여 흡입하였고, 이어서 시험 배지(1% FBS를 함유하는 DMEM)로 웰들을 세척하여 죽은 세포들 및 파편들을 제거하였다. 세척 후(post washing), 세포들을 24 시간 동안 1% FBS를 함유하는 배지에서 서로 다른 농도의 시험 화합물들로 처리하는 한편, 제조사의 지시에 따라 상처 영역에서의 NIH3T3 세포의 이동을 광학 현미경 하에서 시각적 검사에 의해 조사하였다. 상처 영역의 중심부에 초점을 맞춘 대표 이미지를 사진으로 찍었다. 상처 봉합의 현미경 이미지를 "Image J" 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 상처 봉합에 대한 시험 화합물의 효과는 "제로 분(min)" 및 화합물 처리 후 24 시간에서 1% FBS 대조군 웰과 비교하였다. 5% FBS를 갖는 DMEM을 양성 대조군으로 사용하였다. 생성된 상처 영역(융합 영역)이 없는 웰의 세포들의 밀도를 100% 상처 봉합으로 사용하였다. 현미경 관찰과는 별도로, 한정된 상처 영역의 전체 표면적의 측정을 위하여 "이미지 J" 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석하였다. 상처 영역으로 이동된 세포들의 표면적을 "0" 시간에서 상처의 총 표면적으로부터 24 시간 후 표면적을 빼서 계산하였다. 봉합 퍼센트(%)는 총 표면적에 대한 이동된 세포 표면적의 비율로서 계산한 반면, 갭 봉합(%)은 처리된 시험 샘플에서 대조군인 미처리 샘플의 존재시 봉합 퍼센트를 빼서 결정하였다.
- [0098] 도 5 및 4에서 각각 나타난 바와 같이, 갭 봉합은 24 시간 배양 후 1% FBS 존재 시에 20%인 것과 비교하여 5% FBS 존재 시에 51%인 것이 관찰되었다.
- [0099] 실시예 C2(NR 용량 반응)
- [0100] 마우스 피부 세포들에서 세포 성장 및 이동을 촉진하는 NR 처리
- [0101] 실시예 C1에 기술된 것과 동일한 실험 조건을 사용하여, 상처 봉합에 대한 배지 중 니코틴아미드 리보사이드 클로라이드(1 mM 및 0.2 mM)의 효과를 사이토셀렉트™ 상처 치료 분석 키트를 이용하여 조사하였다.
- [0102] 갭 봉합은 24 시간 배양 후 1% FBS 단독 존재 시에 20%인 것(실시예 C1)과 비교하여 1 mM NR 클로라이드 + 1% FBS 존재시에 46%였다; 도 6 참조. 따라서, (1% FBS에서) NR 존재 시의 세포 운동성을 가리키는 갭 봉합은 실시예 C1의 대조군으로서 5% FBS와 비슷하였다(comparable). 더욱이, 13% 갭 봉합은 0.2 mM NR(+1% FBS)의 존재 시에 관찰되었고, 용량 반응적인 효과를 나타내었다.

- [0103] 포유동물의 조직 상처는 조직을 수선하기 위하여 복잡하고 정돈된 일련의 이벤트들을 거친다. 수선을 위한 2 가지의 핵심 요소는 세포 운동성과 증식이다. 여기에서 나타낸 데이터는 NR이 포유동물의 피부 세포의 "상처"로의 세포 운동성 및 증식을 촉진한다는 것을 명확하게 보여준다.
- [0104] 실시예 D
- [0105] 인간 피부 세포에서 유해한 UV-매개 손상을 예방하는 NR 처리
- [0106] 이 실시예에서 니코틴아미드 리보사이드(NR)는 피부의 건강한 장벽기능을 유지하는데 도움을 주기 위해 사용된다. 장벽기능은 피부의 가장 중요한 기능이다. 피부는 태양 자외선(UV) 조사를 포함하는 환경 노출에 대한 인체의 첫 번째이자 최고의 방어이다. UV 광에의 노출은 많은 피부 질환들의 진전에서 핵심 인자이다. 피부에 대한 UV-매개 손상의 중심 요소는 장벽기능의 손실이다.
- [0107] 여기에서 기술된 바 치료 용량으로 국소 NR의 도포는 UV-매개 장벽기능 손실을 예방하는 것으로 예상된다. NR이 UV-매개 피부 장벽기능 손실을 예방하는 한 가지 방식은 공지된 경피 수분 손실(TEWL)에서 UV-매개 증가를 예방하는 것에 의한다. 추가로, NR의 경구 투여는 피부의 건강한 장벽기능 유지에 효과적일 것으로 기대된다.
- [0108] 예를 들면, 피부 장벽 기능장애는 경피 수분 손실(TEWL)을 측정하여 직접 평가될 수 있고, 이것은 피부 수화도(hydration)의 측정이다((Oba, C., et al., "Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice," *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* (2013) 29: 204-11; 및 여기서 인용된 문헌들; Jiang, S.J., et al., "Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient," *Exp. Dermatol.* (2007) 16: 985-992); 및 Haratake, A., et al., "UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response" *J. Invest. Dermatol.* (1997) 108: 769-775).
- [0109] 현재 청구된 발명을 기술하는 맥락(특히 청구항의 맥락)에서 용어 "a", "an", "the" 및 유사 참조들의 사용은, 여기에서 달리 표시되지 않는 한 또는 문맥에 의해 명확하게 모순되지 않는 한, 단수 및 복수 양자를 포함하는 것으로 구성되는 것이다. 여기에서 값의 범위들의 열거는, 여기에서 달리 언급되지 않는 한, 범위 내에 있는 각각의 분리된 값을 개별적으로 가리키는 간편한 방법으로 단순히 제공하고자 하는 것이고, 각각의 분리된 값은 여기에서 개별적으로 언급되는 것처럼 명세서에 포함된다. 용어 "약(about)"의 사용은 약 ±10% 범위에서 언급된 값의 위 또는 아래의 값을 기술하려는 것이다; 다른 실시형태에서, 값들은 약 ±5% 범위에서 언급된 값의 위 또는 아래의 값의 범위일 수 있다; 다른 실시형태에서, 값들은 약 ±2% 범위에서 언급된 값의 위 또는 아래의 값의 범위일 수 있다; 다른 실시형태에서, 값들은 약 ±1% 범위에서 언급된 값의 위 또는 아래의 값의 범위일 수 있다. 상기한 범위들은 문맥에 의해 명확해 질 수 있고, 추가의 한정은 암시하지 않는다. 여기에서 기술된 모든 방법들은, 여기에서 달리 지시되지 않는 한 또는 문맥에 의해 명확하게 모순되지 않는 한, 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 여기에서 제공된 임의의 및 모든 실시예들, 또는 예시적인 언어(예, "예를 들어(such as)")의 사용은 단순히 발명을 더 명확하게 하려는 것이고 달리 청구되지 않는 한 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 명세서에서 어떠한 용어도 임의의 청구되지 않는 요소가 본 발명의 실시예 필수적인 것을 가리키는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0110] 상기 명세서에서 이 발명은 그것의 특정 실시형태들과 관련하여 기술되고, 많은 세부점들은 설명을 위하여 제시되지만, 본 발명은 추가 실시형태를 허용할 수 있고 여기에서 기술된 세부점들 중 어떤 것이 본 발명의 기본 원리에서 벗어나지 않으면서 변경될 수 있다는 것은 본 기술분야의 통상의 지식을 가진 자들에게는 명확할 것이다.
- [0111] 여기에서 인용된 모든 참조문헌들은 전체가 참조로 포함된다. 본 발명은 그것의 정신 또는 필수 속성들에서 벗어나지 않으면서 다른 특정 형태로 구현될 수 있고 따라서 본 발명의 범위를 가리키는 바와 같이, 상기 명세서보다는 첨부되는 청구항이 참조되어야 한다.

도면

도면1

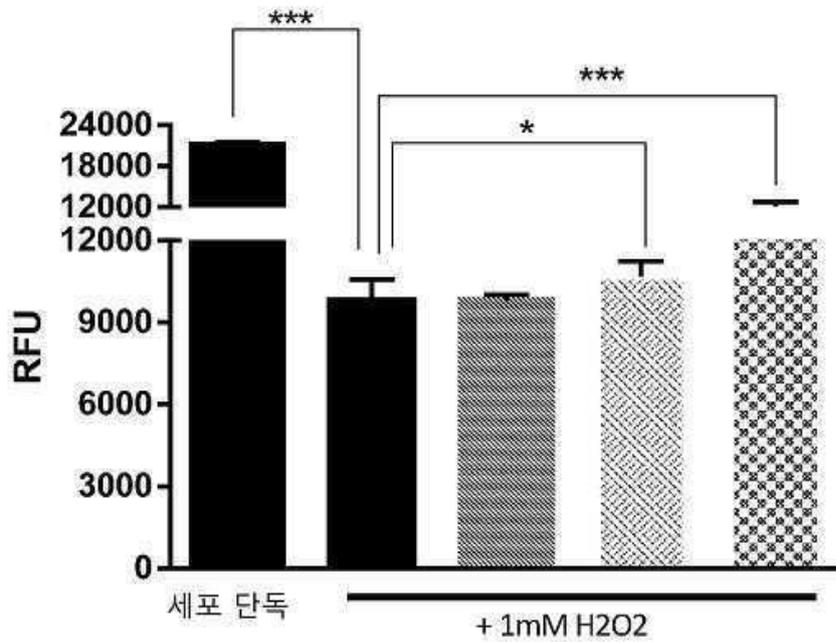


*** 1mM H₂O₂ 단독과 비교하여 p<0.001 (투키의 다중 비교 테스트에 따른 일 방향 아노바(ANOVA))

*** 1 mM H₂O₂와 비교하여 p<0.001 (비대응 t-테스트)

+H₂O₂ 레인들 (왼쪽에서 오른쪽) : 1 mM H₂O₂ (단독); +0.2 mM NR (회색)
 +1 mM NR (작은 체크무늬)
 +5 mM NR (큰 체크무늬)

도면2

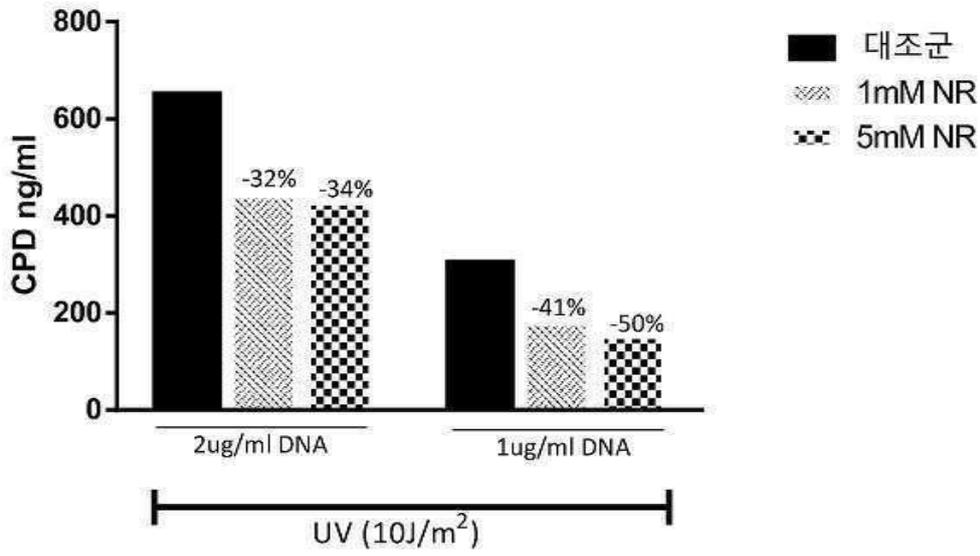


*** 1mM H₂O₂ 단독과 비교하여 p<0.001 (투키의 다중 비교 테스트에 따른 일 방향 아노바(ANOVA))

* 1 mM H₂O₂ 단독과 비교하여 p<0.05 (비대응 t-테스트)

+H₂O₂ 레인들 (왼쪽에서 오른쪽) : 1 mM H₂O₂ (단독); +0.04 mM NR (회색)
 +0.2 mM NR (작은 체크무늬)
 +1 mM NR (큰 체크무늬)

도면3



UV 노출된 대조군 대비 보호 %
막대 위에 나타냄

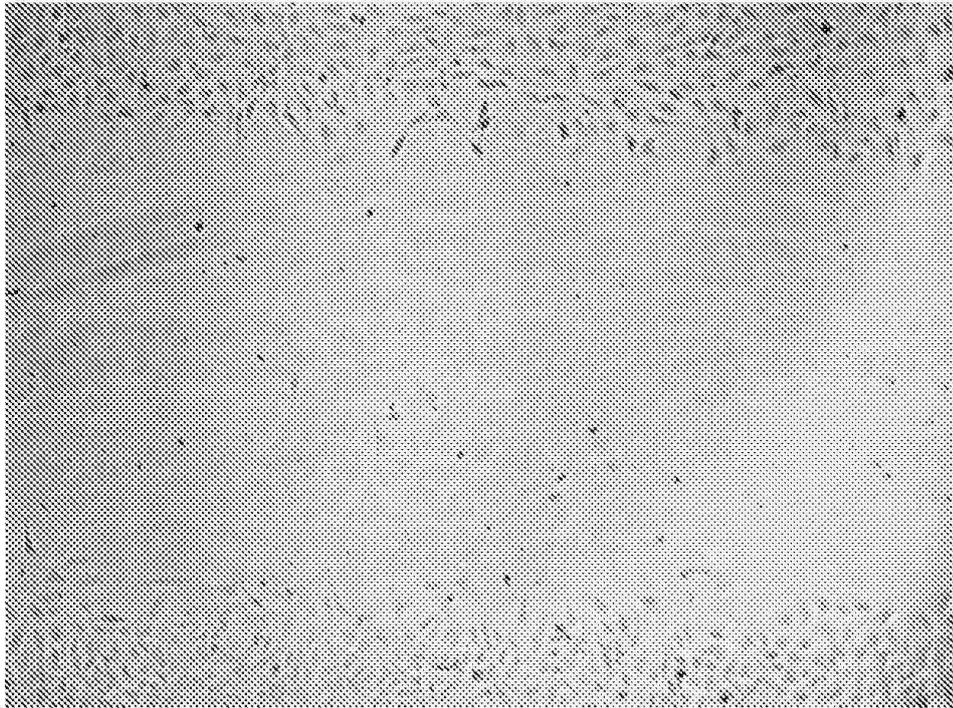
도면4a



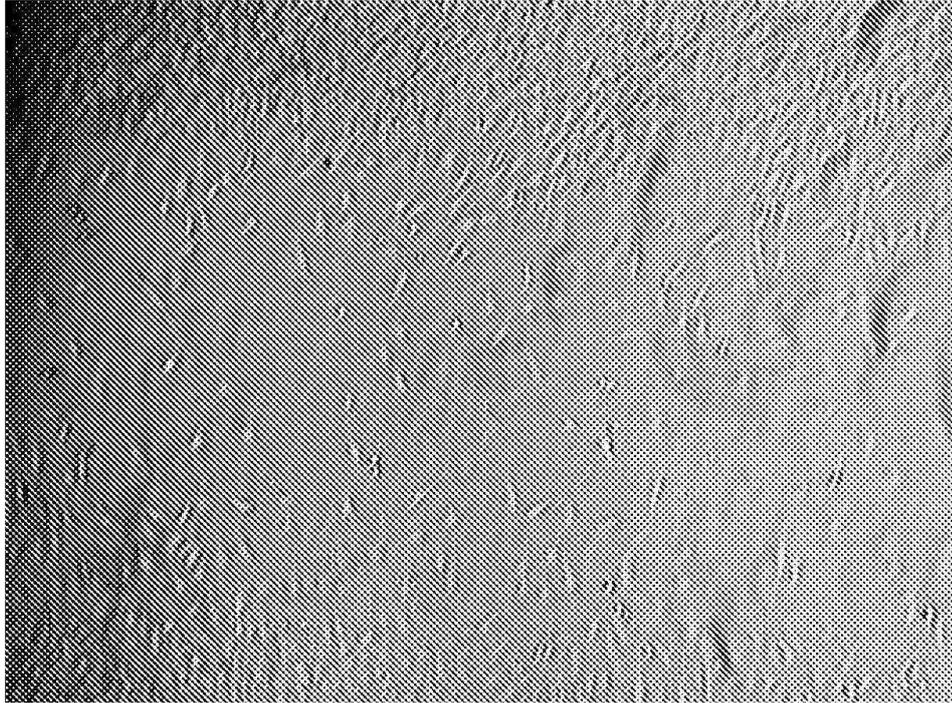
도면4b



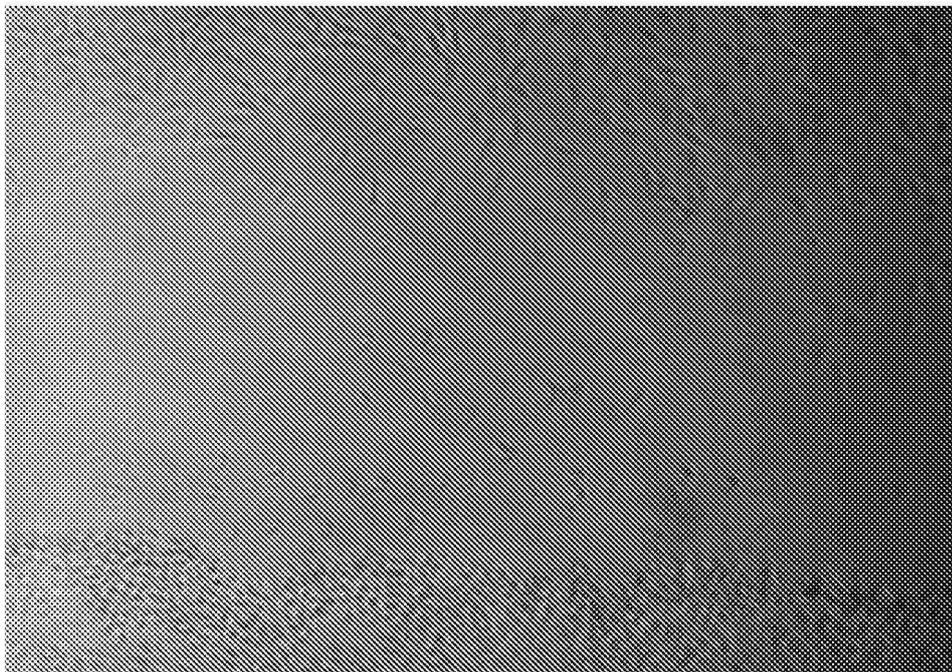
도면5a



도면5b



도면6a



도면6b

