



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0103432
(43) 공개일자 2025년07월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/155 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 27/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/155 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0168803
(22) 출원일자 2024년11월22일
심사청구일자 2024년11월22일
- (30) 우선권주장
1020230195597 2023년12월28일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)
- (72) 발명자
조성일
광주광역시 서구 풍암2로 66 금호타운 202동 1204호
- (74) 대리인
기율특허법인

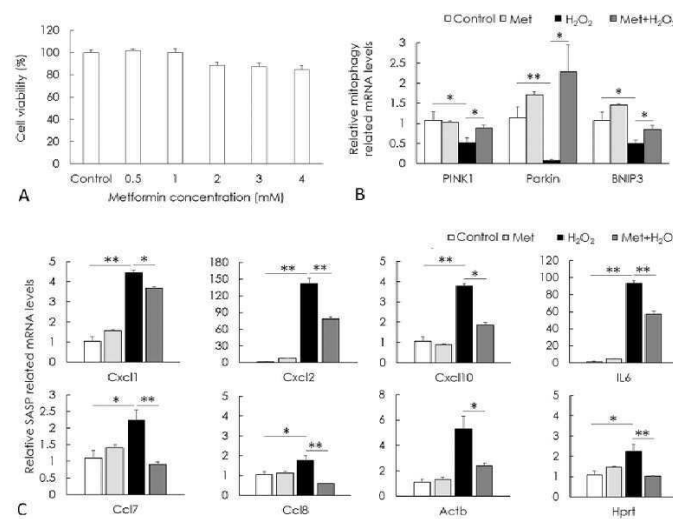
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 노화성 난청의 예방용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 그 염을 포함함으로써, 노화성 난청을 효과적으로 예방/억제할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 27/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711184109
과제번호	2022R1A2C1005091
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	마이토파지 유도제를 이용한 청각기의 노화 억제 및 노화성 난청 예방 약제 개발
과제수행기관명	조선대학
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

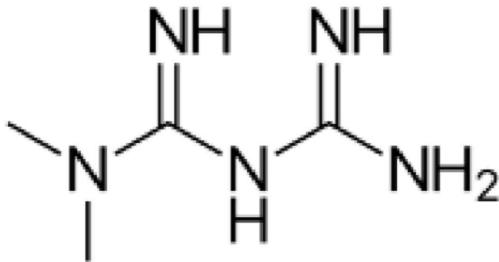
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 노화성 난청의 예방용 약학 조성물:

[화학식 1]



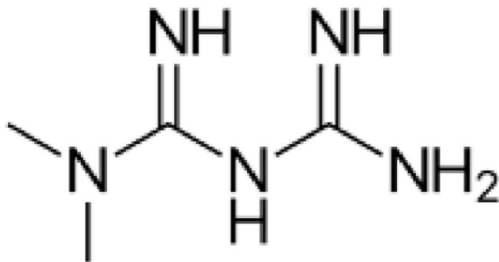
청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 노화성 난청은 감각성 난청인 노화성 난청의 예방용 약학 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 노화성 난청의 예방용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 노화성 난청은 감각성 난청인 노화성 난청의 예방용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 노화성 난청의 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 노화성 난청(Age-related hearing loss, ARHL)은 노인 인구에서 가장 흔한 감각 장애로, 전 세계 인구의 약

33%가 이 질환을 겪고 있다. 노화성 난청은 연령이 증가함에 따라 점진적으로 진행되는 양측성, 비가역적 청력 손실을 특징으로 한다.

[0004] 노화성 난청의 주요 병리학적 특징은 내이 구조물, 특히 와우의 유모세포, 와우혈관선 및 청신경의 퇴행성 변화이다. 특히 와우 내 유모세포의 손실은 노화성 난청의 발생과 높은 상관관계를 보인다. 이러한 퇴행성 변화의 주요 원인으로는 미토콘드리아 기능 장애, 미토콘드리아 DNA 손상, 활성산소종(ROS)의 축적 등이 알려져 있다.

[0005] 청각 시스템은 지속적인 소리 전달을 위해 높은 에너지를 필요로 하며, 이는 미토콘드리아에서 생성되는 ATP에 의존한다. 노화된 청각 기관에서는 손상된 미토콘드리아의 축적으로 인해 ATP 생성이 감소하고, 이는 청각 경로의 세포 손상을 초래하여 결과적으로 난청을 유발한다.

[0006] 미토콘드리아의 품질 관리를 위해서는 손상된 미토콘드리아의 제거가 매우 중요하며, 이는 마이토파지(mitophagy)라는 과정을 통해 이루어진다. 그러나 노화된 기관에서는 마이토파지가 점진적으로 감소하는 것으로 알려져 있다. 마이토파지의 감소는 손상된 미토콘드리아의 축적을 초래하며, 이는 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 다양한 신경퇴행성 질환의 발병에 기여하는 것으로 보고되어 있다.

[0007] 현재까지 노화성 난청의 치료는 주로 보청기나 인공와우 등의 보조기기에 의존하고 있으며, 이는 근본적인 치료나 예방법이 되지 못한다. 약물을 통한 치료 연구도 진행되고 있으나, 대부분 증상 완화에 초점이 맞춰져 있어 질환의 진행을 막거나 예방하는 효과적인 치료법은 아직 개발되지 않은 실정이다.

[0008] 따라서, 노화성 난청의 주요 원인인 미토콘드리아 기능 장애를 개선하고, 마이토파지를 촉진하여 청각 세포의 노화를 예방할 수 있는 새로운 약학 조성물의 개발이 시급히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2019-0028345호

발명의 내용

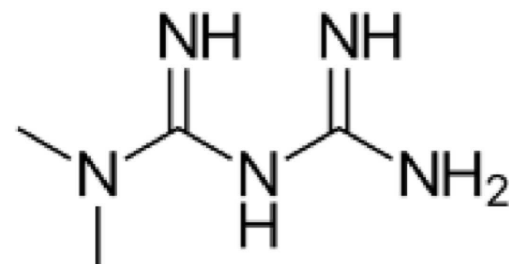
해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 노화성 난청을 효과적으로 예방/억제할 수 있는 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 1. 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 노화성 난청의 예방용 약학 조성물:

[0014] [화학식 1]

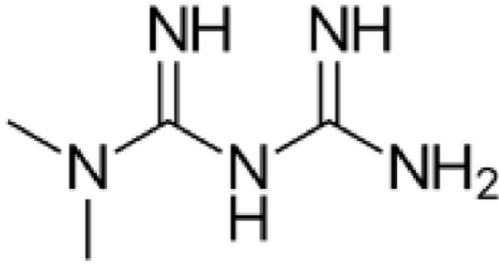


[0015]

[0016] 2. 위 1에 있어서, 상기 노화성 난청은 감각성 난청인 노화성 난청의 예방용 약학 조성물.

[0017] 3. 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 노화성 난청의 예방용 건강기능식품:

[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020]

4. 위 3에 있어서, 상기 노화성 난청은 감각성 난청인 노화성 난청의 예방용 건강기능식품.

발명의 효과

[0022]

본 발명의 약학 조성물은 다음과 같은 효과를 갖는다:

[0023]

첫째, 청각세포에서 미토콘드리아를 효과적으로 유도하여 손상된 미토콘드리아의 제거를 촉진한다.

[0024]

둘째, 청각세포의 노화 관련 지표들을 현저히 감소시킨다.

[0025]

셋째, 미토콘드리아의 기능을 전반적으로 개선시키고 ATP 생성을 증가시킨다.

[0026]

넷째, 동물실험에서 노화성 난청의 진행을 효과적으로 지연시키는 것이 확인되었다.

[0027]

다섯째, 이미 임상적으로 검증된 성분을 사용하여 약물로서 안전성이 확보되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0029]

도 1. Metformin이 HEI-OC1 세포의 세포 생존율 및 mitophagy와 노화 관련 유전자 발현에 미치는 효과

(A) HEI-OC1 세포를 각각의 농도의 metformin으로 24시간 처리하였다. Metformin 농도 0.5 및 1 mM은 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. (B) HEI-OC1 세포를 1 mM metformin으로 2시간 사전 처리한 후, 2 mM H2O2를 처리하거나 처리하지 않고 1시간 동안 노출한 후, 배양액에서 5일간 배양하였다. Metformin 사전 처리는 H2O2 처리가 HEI-OC1 세포에서 억제하는 PINK1, Parkin 및 BNIP3를 포함한 mitophagy 관련 mRNA를 유의미하게 상향 조절하였다. (C) Metformin 사전 처리는 H2O2 처리가 상향 조절하는 Cxcl1, Cxcl2, Cxcl10, IL6, Ccl7, Ccl8, Actb 및 Hprt를 포함한 노화 관련 분비 표현형(SASP) mRNA를 유의미하게 하향 조절하였다. 데이터는 다섯 번 독립적으로 수행된 실험 결과의 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다(Met, metformin; * p <0.05, ** p <0.01).

도 2. Metformin이 HEI-OC1 세포의 노화 및 mitophagy에 미치는 효과

(A) HEI-OC1 세포를 0.5 및 1 mM metformin으로 2시간 사전 처리한 후, 2 mM H2O2를 처리하거나 처리하지 않고 1시간 동안 노출한 후, 배양액에서 5일간 배양하였다. Metformin 사전 처리는 H2O2 처리가 증가시키는 노화 관련 p53 및 p21의 수준을 유의미하게 감소시켰으며, H2O2 처리가 감소시키는 PINK1, Parkin 및 BNIP3를 포함한 mitophagy 관련 단백질을 유의미하게 증가시켰다. (B) Mitophagy는 mitophagy 염료 및 lyso 염료의 면역형광 분석을 통해 조사되었다. (C) Metformin 사전 처리는 H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포에서 감소하는 mitophagy 염료와 lyso 염료의 공위치(co-localization)를 유의미하게 증가시켰다. (D) 노화된 세포는 노화 관련 베타 갈락토시다아제(β -gal) 염색을 사용하여 조사되었다. (E) H2O2로 유도된 HEI-OC1 세포의 β -gal 양성 세포는 metformin 사전 처리에 의해 유의미하게 감소하였다. 데이터는 다섯 번 독립적으로 수행된 실험 결과의 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다(Met, metformin; * p <0.05, ** p <0.01).

도 3. HEI-OC1 세포에서 산화적 인산화(OXPHOS) 단백질 및 효소 발현의 변화

(A) HEI-OC1 세포를 1 mM metformin으로 2시간 사전 처리한 후, 2 mM H2O2를 처리하거나 처리하지 않고 1시간 동안 노출한 후, 배양액에서 5일간 배양하였다. 모든 OXPHOS 복합체 I, II, III, IV 및 V는 H2O2로 유도된 노화 세포에서 감소하였다. Metformin 사전 처리는 H2O2로 유도된 노화 세포와 비교하여 모든 OXPHOS 복합체의 단백질 수준을 유의미하게 증가시켰다. (B) 미토콘드리아 OXPHOS 복합체의 효소 활성을 조사한 결과 Metformin 사전 처리는 H2O2로 유도된 노화 세포와 비교하여 모든 OXPHOS 복합체의 미토콘드리아 효소 수준을 유의미하게 증가

시켰다. 데이터는 다섯 번 독립적으로 수행된 실험 결과의 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다(Met, metformin; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

도 4. HEI-OC1 세포에서 미토콘드리아 상태와 기능에 대한 metformin의 효과

(A) HEI-OC1 세포를 1 mM metformin으로 2시간 사전 처리한 후, 2 mM H2O2를 처리하거나 처리하지 않고 1시간 동안 노출한 후, 배양액에서 5일간 배양하였다. 미토콘드리아 막 전위는 JC-1 염료의 유세포 분석을 통해 조사되었다. 적색 대비 녹색 형광의 비율은 미토콘드리아 막 전위를 나타낸다. (B) Metformin 사전 처리는 H2O2 처리 후 적색 대비 녹색 형광 비율을 유의미하게 증가시켰다. (C) Metformin 사전 처리 그룹에서 미토콘드리아 DNA의 완전성은 H2O2 처리 그룹보다 유의미하게 높았다. (D) H2O2 처리된 세포에서 metformin 사전 처리는 ATP 함량을 유의미하게 증가시켰다. 데이터는 다섯 번 독립적으로 수행된 실험 결과의 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다(Met, metformin; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

도 5. 와우 explant에서 노화 및 mitophagy에 대한 metformin의 효과

(A) 와우 explant를 1 mM metformin으로 2시간 사전 처리한 후, 0.5 mM H2O2를 처리하거나 처리하지 않고 5시간 동안 노출한 후, 배양액에서 3일간 배양하였다. Metformin 사전 처리는 H2O2 처리가 증가시키는 노화 관련 p53 및 p21의 수준을 유의미하게 감소시켰으며, H2O2 처리가 감소시키는 PINK1, Parkin 및 BNIP3를 포함한 mitophagy 관련 단백질을 유의미하게 증가시켰다. (B) 노화된 세포는 노화 관련 베타 갈락토시다아제(β -gal) 염색을 사용하여 조사되었다. H2O2로 유도된 와우 explant의 β -gal 양성 세포는 metformin 사전 처리에 의해 유의미하게 감소하였다. (C) 와우 explant에서 산화적 인산화(OXPHOS) 단백질의 발현은 Western blot 분석을 통해 조사되었다. Metformin 사전 처리는 H2O2로 유도된 와우 explant와 비교하여 모든 OXPHOS 복합체 I, II, III, IV 및 V의 수준을 유의미하게 증가시켰다. 데이터는 다섯 번 독립적으로 수행된 실험 결과의 평균 $\pm$ SEM으로 표시되었다(Met, metformin; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

도 6. 메트포르민 투여가 노화성 난청에 미치는 영향

(A)는 C57BL/6J 마우스에서 메트포르민 투여가 청력 역치에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 6개월령부터 10개월령까지 8kHz, 16kHz, 32kHz 주파수에서의 청각유발반응(ABR) 역치를 측정하였다. Met(-)는 대조군, Met(+)는 메트포르민 투여군을 나타낸다. 메트포르민 투여군에서 연령 증가에 따른 청력 역치의 상승이 유의미하게 억제되었으며 청력 보존 효과가 확인되었다.

(B)는 메트포르민 투여가 청각 관련 조직의 미토콘드리아 DNA 완전성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 와우(Cochlea), 청각피질(Auditory cortex) 및 하구(Inferior colliculus)에서 미토콘드리아 DNA의 완전성을 분석하였다. Met(-)는 대조군, Met(+)는 메트포르민 투여군을 나타낸다. 메트포르민 투여군에서 모든 조직의 미토콘드리아 DNA 완전성이 유의미하게 증가하였다(* $p < 0.05$).

도 7. 메트포르민 투여가 청각 관련 조직의 마이토파지에 미치는 영향

(A)는 와우의 유모세포(Hair cells)와 나선신경절(Spiral ganglion)에서의 마이토파지 관련 단백질 발현을 면역형광염색법으로 분석한 결과이다. LAMP1(보라색), LC3B(녹색), TOM20(적색)의 발현과 이들의 공위치(Merge)를 관찰하였다. 우측 그래프는 각 단백질의 공위치 계수를 정량화한 결과를 나타낸다.

(B)는 청각피질(Auditory cortex)과 하구(Inferior colliculus)에서의 마이토파지 관련 단백질 발현을 면역형광염색법으로 분석한 결과이다. 와우의 유모세포 및 나선신경절과 청각피질 및 하구에서 메트포르민 투여군의 마이토파지 관련 단백질들의 발현이 증가하였으며, 공위치 계수도 유의미하게 증가하였다(* $p < 0.05$).

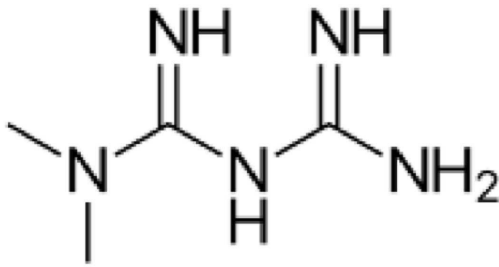
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 설명한다.

본 발명은 노화성 난청의 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 약학 조성물은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0034] [화학식 1]



[0035]

[0036] 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1의 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 화학식 1의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염, 또는 금속염 등을 의미한다.

[0037] 화학식 1의 화합물로는 시판품을 사용할 수도 있으며, 예를 들면 메트포르민(Metformin)을 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학 조성물은 예를 들면 청각 세포의 노화를 완화시키는 기전으로 노화성 난청을 예방할 수 있다. 이는 예를 들면 마이토파지 유도에 의한 것일 수 있다.

[0039] 노화성 난청은 노화에 따른 청각기관의 퇴행성 변화에 의해 발생하는 점진적인 청력감소를 의미한다. 노화성 난청은 예를 들면 감각성 난청, 신경성 난청, 대사성 난청, 기계성 난청, 혼합형 난청을 포함할 수 있다. 예를 들면 감각성 난청일 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스(lactose), 텍스트로즈, 수크로스(sucrose), 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. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제에는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

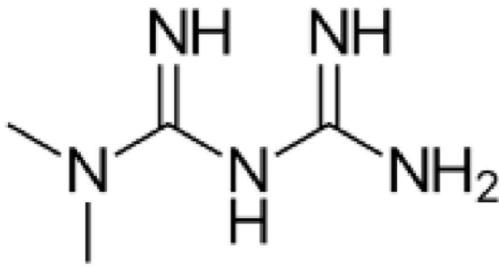
[0041] 본 발명의 약학 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 1 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0042] 또한, 메트포르민은 이미 제형화되어 있으므로, 이는 그 자체로 사용하는 것도 가능하다.

[0044] 또한, 본 발명은 노화성 난청의 예방용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0045] 본 발명의 건강기능식품은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0046] [화학식 1]



[0047]

[0048] 식품학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1의 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 화학식 1의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염, 또는 금속염 등을 의미한다.

[0049] 화학식 1의 화합물로는 시판품을 사용할 수도 있으며, 예를 들면 메트포르민(Metformin)을 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명의 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 담체가 포함될 수 있다. 상기 식품학적으로 허용 가능한 담체는 신체의 한 기관 또는 부분으로부터 신체의 다른 기관 또는 부분으로 활성 성분을 수송하는 역할을 하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제 또는 용매와 같은 약제학적으로 허용되는 물질 또는 운반체(vehicle)를 의미한다.

[0051] 본 발명의 건강기능식품은 음료 (알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품 (예: 과일통 조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품 (예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류 (예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품 (예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등일 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다.

[0053] 본 발명의 건강기능식품에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다.

[0054] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0055] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸하이 드록시 벤조에이트, 프로필하이 드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘, 미네랄 오일 및 이들의 혼합물 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 상술한 제형 내 유효성분으로서의 본 발명의 건강기능식품의 함량은 사용 형태 및 목적, 사용자 상태, 증상의 종류 및 경증 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0058] 이하 실시예를 들어 보다 상세히 설명한다.

[0060] 실시예

[0062] 재료 및 방법

[0063] 세포 배양 및 마우스 관리

[0064] House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1) 세포는 고포도당 Dulbecco's modified Eagle's medium (Welgene, 대한민국 경산시)에서 10% fetal bovine serum (Welgene)을 포함하여 항생제 없이 33° C, 5% CO2 조건 하에서 배양되었다. 동물 실험은 조선대학교 동물 실험 윤리위원회(승인번호: CIACUC2022-S0006)의 승인을 받았으며, 위원회의 가이드라인과 엄격한 규정에 따라 수행되었다. C57BL/6J 마우스는 KBSI 광주센터의 노화과학 동물시설(대한민국 광주)에서 제공받았다. 4일 된 신생 마우스는 와우(달팽이관) explant 연구에 사용되었다. 모든 마우스는 5% 이소플루란 마취하에 경추 탈구로 안락사되었으며, 이후 와우가 분리되었다.

[0066] 세포 생존율

[0067] 세포 생존율은 EZ-Cytox (DoGenBio, 대한민국 서울)을 사용하여 측정하였다. HEI-OC1 세포는 24-well 플레이트에 웰당 4×10^4 세포씩 접종되었다. 24시간 배양 후, 세포는 0.5, 1, 2, 3, 4 mM 농도의 metformin (InvivoGen, 미국 캘리포니아)으로 24시간 처리되었다. 처리하지 않은 세포는 대조군으로 간주되었다. EZ-Cytox 용액은 각 웰에 추가되었고, 플레이트는 33° C에서 2시간 동안 배양되었다. 광학 밀도는 450 nm에서 microplate reader (BioTek, 미국 버몬트)를 사용하여 측정되었다.

[0069] 세포 노화 유도 및 metformin 처리

[0070] 노화 유도를 위해 HEI-OC1 세포는 2 mM H2O2 (Daejung chemicals, 대한민국 시흥)로 1시간 처리되었다. 이는 이전에 설명된 방법을 따랐다. 세포는 1 mM metformin으로 2시간 동안 사전 처리한 후 2 mM H2O2로 1시간 처리되었다. PBS로 세척한 후, 세포는 신선한 배양액에서 5일간 배양되었고, 이후 추가 실험에 사용되었다. 와우 explant는 4일 된 마우스에서 분리되었다. 분리된 와우 explant는 1 mM metformin으로 2시간 배양된 후 0.5 mM H2O2로 5시간 처리되었다. 조직은 신선한 배양액에서 3일 동안 배양되었으며, 이후 실험에 사용되었다.

[0072] 실시간 PCR 분석

[0073] 총 RNA는 처리 종료 시 수확한 HEI-OC1 세포에서 Hybrid-RTM (GeneAII Biotechnology, 대한민국 서울)을 사용하여 추출되었다. 총 RNA 샘플의 순도와 농도는 Nanodrop™ One Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, 미국 매사추세츠)를 사용하여 측정되었다. M-MLV cDNA Synthesis Kit (Enzymomics, 대한민국 대전)을 사용하여 총 RNA (4 µg)를 첫 가닥 cDNA로 역전사하였다. 실시간 PCR 반응은 SYBR Premix Ex Taq kit (TaKaRa Bio, 일본 시가)를 사용하여 Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 미국 캘리포니아)에서 제조사의 지침에 따라 수행되었다. 실시간 PCR에 사용된 프라이머는 다음과 같다:

[0074] 마우스 PINK1 (PTEN 유도성 키나제 1): 5'-GCT TGC CAA TCC CTT CTA TG-3', 5'-CTC TCG CTG GAG CAG TGA C-3'

[0075] 마우스 Parkin: 5'-AAA CCG GAT GAG TGG TGA GT-3', 5'-AGC TAC CGA CGT GTC CTT GT-3'

[0076] 마우스 BNIP3: 5'-GCT CCC AGA CAC CAC AAG AT-3', 5'-TGA GAG TAG CTG TGC GCT TC-3'

[0077] 마우스 Cxcl1: 5'-ACC GAA GTC ATA GCC ACA CTC-3', 5'-CTC CGT TAC TTG GGG ACA CC-3'

[0078] 마우스 Cxcl2: 5'-CCC AGA CAG AAG TCA TAG CCA C-3', 5'-TGG TTC TTC CGT TGA GGG AC-3'

[0079] 마우스 Cxcl10: 5' -CCA AGT GCT GCC GTC ATT TTC-3', 5' -TCC CTA TGG CCC TCA TTC TCA-3'

[0080] 마우스 IL6: 5'-TGA GAA AAG AGT TGT GCA ATG G-3', 5'-GGT ACT CCA GAA GAC CAG AGG-3'

[0081] 마우스 Ccl7: 5'-TTC TGT GCC TGC TGC TCA TA-3', 5'-TTG ACA TAG CAG CAT GTG GAT-3'

[0082] 마우스 Ccl8: 5'-CGG GTG CTG AAA AGC TAC GA-3', 5'-TTG GTC TGG AAA ACC ACA GCT T-3'

[0083] 마우스 Actb: 5'-GTC CAC ACC CGC CAC C-3', 5'-ACC CAT TCC CAC CAT CAC AC-3'

[0084] 마우스 Hprt: 5'-AGC AGT ACA GCC CCA AAA TG-3', 5'-ATC CAA CAA AGT CTG GCC TGT-3'

[0085] 마우스 GAPDH: 5'-GTA TTG GGC GCC TGG TCA CC-3', 5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG ATG G-3'

[0086] 대상 유전자의 발현 수준은 fold change로 측정되었으며, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 평가되었다. 데이터는 마우스 GAPDH mRNA 발현에 대해 정규화된 상대적 mRNA 발현으로 나타났다.

[0088] Western blot 분석

[0089] HEI-OC1 세포와 와우 explant는 RIPA buffer (Cell Signaling Technology, 미국 매사추세츠)로 용해되었으며, 4° C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리되었다. 동일한 양의 단백질 샘플이 12% SDS-PAGE에 로딩된 후 PVDF 막 (Millipore, 미국 매사추세츠)으로 전이되어 Western blot 분석이 수행되었다. 5% 탈지우유를 0.1% Tween-20을 포함한 TBS에 용해하여 실온에서 1시간 동안 비특이적 결합을 차단하였다. 막은 p53, p21 (ABclonal Technology, 미국 매사추세츠), LC3B (Cell Signaling Technology), PINK1, Parkin, BNIP3 (ThermoFisher Scientific, 미국 매사추세츠), OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (ThermoFisher Scientific), β -actin (Santa Cruz, 미국 캘리포니아) 등의 1차 항체와 함께 4° C에서 하룻밤 동안 배양되었다. 이후, TBS-T(0.1% Tween-20, 20 mM Tris base, 137 mM NaCl, pH 7.6)로 두 번 세척한 후, anti-mouse in sheep 및 anti-rabbit in donkey (Jackson ImmunoResearch, 미국 펜실베이니아) 항체로 2시간 동안 배양되었고, TBS-T로 두 번 세척되었다. 면역 반응성 단백질은 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore corp., 미국 매사추세츠)를 사용하여 검출되었으며, 이미지 분석기 (Vilber, 프랑스 Collègeien)를 사용하여 시각화되었다. 단백질 수준은 Image J (NIH, 미국 메릴랜드) 소프트웨어를 사용하여 정량화되었다.

[0091] 노화 관련 β -갈락토시다아제 활성 분석

[0092] 총 4×10^4 HEI-OC1 세포가 6-well 플레이트에서 배양되었다. 처리 종료 후, β -갈락토시다아제 활성은 Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell signaling Technology, 미국 매사추세츠)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분석되었다. 세포는 CO2 없이 37° C에서 1 mL의 노화 관련 β -갈락토시다아제(SA- β -gal) 염색 용액과 함께 하룻밤 동안 배양되었다. 염색된(노화가 확인된) 세포와 염색되지 않은 세포의 수는 각 샘플의 다섯 개 무작위 필드에서 세었다. 또한 염색된 세포는 광학 현미경 (Olympus Corporation, 독일 함부르크)을 사용하여 이미징되었다.

[0093] 와우 explant는 CO2 없이 37° C에서 200 μ L SA- β -gal 염색 용액과 함께 2시간 동안 배양되었으며, Biomedica Corp. (미국 캘리포니아)의 장착 매체를 사용하여 슬라이드에 장착되었다. 염색된(노화 확인) 세포와 염색되지 않은 세포는 각 샘플의 다섯 개 무작위 필드에서 세었으며, 표본은 LEICA ICC50 E (Leica Microsystems, 스위스 Heerbrugg)로 이미징되었다.

[0095] 미토파지 감지 분석

[0096] 미토파지는 Mitophagy Detection Kit (DOJINDO, 일본 구마모토)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정되었다. HEI-OC1 세포는 6-well 플레이트에서 총 4×10^4 세포로 배양되었다. 처리 종료 후, 세포는 Mtpagy Dye와 함께 33° C, 5% CO2 인큐베이터에서 30분 동안 배양되었다. 이후, Lyso Dye로 30분 동안 배양되었다. 샘플은 공초점 현미경 (Carl Zeiss, 독일 Oberkochen)에서 관찰되었다. 공-위치 계수 수준은 ImageJ (NIH, 미국 메릴랜드)를 사용하여 정량화되었다.

[0098] 미토콘드리아 효소 활성

[0099] HEI-OC1 세포는 2×10^5 세포로 구성된 세포 배양 접시에 배양되었다. 처리 종료 후, 세포는 수집되어 PBS로 세척되었다. 미토콘드리아 복합체 I-V의 효소 활성은 Metabolism Assay Kit (Elabscience Biotechnology Inc., 미국 텍사스)를 사용하여 측정되었다. 각 샘플의 OD 값은 microplate reader (BioTek, 미국 버몬트)를 사용하여

측정되었다. 효소 활성은 제조사의 프로토콜에 따라 계산되었으며, 단백질 농도(U/gprot)에 대해 상대적으로 나타냈다.

[0101] **미토콘드리아 막 전위에 대한 유세포 분석**

[0102] 미토콘드리아 막 전위는 JC-1 MitoMP Detection Kit (DOJINDO, 일본 구마모토)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정되었다. 간단히 말하면, HEI-OC1 세포는 6-well 플레이트에서 4×10^4 세포로 배양되었다. 처리 종료 후, 배지를 제거하고 세포를 DMEM에 희석된 JC-1 염료($5 \mu\text{M}$)로 염색하여 33°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 30분 동안 배양하였다. 세포는 HBSS로 두 번 세척한 후 수집되었다. 펠렛은 이미징 버퍼 용액에 재현탁되었으며, JC-1 염료의 형광은 유세포 분석기 (BD Biosciences, 미국 캘리포니아)를 사용하여 분석되었다.

[0104] **미토콘드리아 DNA 완전성**

[0105] HEI-OC1 세포는 6-well 플레이트에서 4×10^4 세포로 배양되었다. 처리 종료 후 세포를 수집하고 AccuPrep Genomic DNA 추출 키트 (Bioneer, 대한민국 대전)를 사용하여 DNA를 분리하였으며, 총 DNA 40 ng이 PCR에 사용되었다. 미토콘드리아 DNA의 완전성은 두 쌍의 프라이머(10.1 kb 및 117 bp)를 사용하여 확인되었다(짧은 증폭 산물은 mtDNA 복제본의 정규화 인자로 사용됨). 10.1 kb (*Mus musculus*)는 다음 프라이머를 사용하여 증폭되었다:

[0106] 5' -GCCAGCCTGACCCATAGCCATAATAT-3' 와 5' -GAGAGATTTTATGGGTGTAATGCCG-3' ;

[0107] 117 bp (*Mus musculus*)는 다음 프라이머를 사용하여 증폭되었다:

[0108] 5' -CCCAGCTACTACCATCATCAAGT-3' 와 5' -GATGGTTTGGGAGATTGGTTGATGT-3' .

[0109] mtDNA 10.1 kb 증폭의 PCR 조건은 다음과 같다: 95°C 에서 30초 동안 초기 변성 후 95°C 에서 15초, 60°C 에서 720초 동안 40 사이클.

[0110] mtDNA 117 bp 증폭의 PCR 조건은 다음과 같다: 95°C 에서 30초 동안 초기 변성 후 95°C 에서 15초, 60°C 에서 90초 동안 40 사이클.

[0111] 정량적 실시간 PCR 분석은 SYBR Premix Ex Taq[®] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa Bio, 일본 시가)를 사용하여 수행되었다. 대상 유전자의 상대적 발현 수준은 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 비교 방법을 사용하여 평가되었다.

[0113] **미토콘드리아 ATP 분석**

[0114] 미토콘드리아 ATP 함량은 ATP Assay Kit (BioVision, 미국 캘리포니아)를 사용하여 평가되었다. 샘플은 키트 지침에 따라 준비되었으며, 샘플과 표준물질의 흡광도는 BioTek ELx800 microplate reader (BioTek, 미국 버몬트)를 사용하여 측정되었다. ATP 함량은 데이터 표준화를 위한 표준 곡선을 기반으로 $\text{nmol}/\mu\text{L}$ (105 세포 당)로 계산되었으며, 대조군에 대한 백분율로 나타냈다.

[0116] **동물실험**

[0117] C57BL/6J 마우스(6개월령)는 실험군과 대조군으로 나뉘어 총 30마리가 사용되었다(실험군 15마리, 대조군 15마리). 실험군은 Metformin($100 \text{ mg}/\text{일}$)을 4개월 동안 매일 경구 투여하였고, 대조군은 동일한 조건에서 위약(placebo)을 투여받았다.

[0119] **(1) 청각 기능 평가**

[0120] 청력 손실을 평가하기 위해 청각유발반응(ABR)을 8kHz, 16kHz, 32kHz의 주파수에서 측정하였다. 마우스는 실험 시작 시점(6개월령)과 8개월, 10개월에 각 주파수에서 ABR을 측정하여 청력 역치(dB SPL)의 변화를 확인하였다. ABR 측정은 마우스를 케타민 주사로 마취시킨 후, 외이도를 통해 삽입된 전극을 이용하여 수행되었다.

[0122] (2) 미토콘드리아 DNA 보존성 평가

[0123] 4개월간 Metformin 투여 후, 마우스를 희생시키고 와우(cochlea), 청각피질(auditory cortex), 하구(inferior colliculus) 조직을 분리하였다. 분리된 조직에서 DNA를 추출하여 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 완전성을 평가하였다. mtDNA 완전성은 long-fragment(10.1 kb)와 short-fragment(117 bp) PCR 분석을 통해 확인하였으며, long/short fragment의 비율로 mtDNA 보존성을 측정하였다.

[0125] (3) 마이토파지 활성 평가

[0126] 마우스에서 분리된 와우, 청각피질, 하구 조직에서 마이토파지 활성은 면역형광 염색을 통해 조사되었다. LAMP1(리소좀 표지), LC3B(마이토파지 활성 표지), TOM20(미토콘드리아 외막 표지)을 사용하여 염색하였고, 공위치 계수(colocalization coefficient)를 분석하여 마이토파지 활성도를 평가하였다. 각 조직의 형광 이미지는 공초점 현미경을 통해 획득하였으며, 5개 무작위 필드에서 공위치 계수를 측정하여 정량화하였다.

[0128] 통계 분석

[0129] 모든 실험은 독립적으로 5회 반복 수행되었다. 데이터 분석에는 Mann-Whitney U 검정을 사용하였다. 통계 분석은 SPSS 25.0 소프트웨어 (SPSS Inc., 미국 일리노이)를 사용하여 수행되었다. $p < 0.05$ 인 값은 통계적으로 유의미한 것으로 간주되었다.

[0131] 결과

[0133] Metformin은 HEI-OC1 세포에서 mitophagy를 촉진하고 노화를 감소시킨다

[0134] Metformin의 세포 독성을 조사하기 위해 HEI-OC1 세포를 다양한 농도의 metformin으로 24시간 처리하였다. 1 mM 이하의 농도에서는 metformin이 HEI-OC1 세포에 독성을 나타내지 않았다(도 1A). 세포 노화는 저농도의 H2O2를 1시간 처리하여 유도되었다. 노화된 HEI-OC1 세포에서 mitophagy 및 노화 관련 유전자의 발현 수준에 대한 metformin의 효과를 조사하기 위해, 세포를 metformin으로 2시간 사전 처리한 뒤 저농도의 H2O2로 1시간 처리하였다. 주요 mitophagy 경로에 관여하는 PINK1, Parkin 및 BNIP3의 mRNA 수준은 H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포에서 감소하였다. 그러나 metformin으로 사전 처리했을 때 H2O2로 유도된 노화 세포와 비교하여 mRNA 수준이 유의미하게 증가하였다($p < 0.05$, 도 1B).

[0135] 노화 관련 분비 표현형(SASP)은 노화된 세포의 주요 특징 중 하나이다. H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포에서 metformin이 SASP 발현 수준에 미치는 영향을 조사하였다. Cxcl1, Cxcl2, Cxcl10, IL6, Ccl17, Ccl18, Actb 및 Hprt의 mRNA 수준은 H2O2로 유도된 노화 세포에서 증가하였다. 이러한 증가된 mRNA 수준은 metformin으로 사전 처리된 노화 세포에서 유의미하게 감소하였다($p < 0.05$, 도 1C).

[0136] 노화 및 mitophagy 관련 단백질의 발현은 metformin으로 사전 처리된 또는 그렇지 않은 노화된 HEI-OC1 세포에서 조사되었다. 노화와 관련된 p53 및 p21의 발현은 H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포에서 유의미하게 증가하였으나, mitophagy와 관련된 PINK1, Parkin 및 BNIP3의 발현은 H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포에서 유의미하게 감소하였다. Metformin으로 사전 처리했을 때, 노화와 관련된 p53 및 p21의 발현이 유의미하게 감소하였으며, 노화된 세포에서 mitophagy와 관련된 PINK1, Parkin 및 BNIP3의 발현이 유의미하게 증가하였다($p < 0.01$, 도 2A).

[0137] Mitophagy는 mitophagy 염료와 lyso 염료의 면역형광 분석을 통해 조사되었다. Mitophagy 염료와 lyso 염료의 공위치 수준은 H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포에서 감소하였으나, metformin으로 사전 처리했을 때 유의미하게 증가하였다($p < 0.05$, 도 2B, C). 세포 노화에 대한 metformin의 효과는 β -galactosidase 활성 분석을 통해 조사되었다. Metformin으로 사전 처리했을 때, β -galactosidase로 염색된 노화된 세포의 비율이 H2O2 처리 세포와 비교하여 유의미하게 감소하였다($p < 0.01$, 도 2D, E). 이 결과는 metformin이 청각 세포에서 mitophagy를 효과적으로 촉진하고 노화를 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0139] Metformin은 노화된 청각 세포에서 감소한 미토콘드리아 기능에 대항한다

[0140] 미토콘드리아 산화적 인산화(OXPHOS) 시스템은 ATP 형태로 세포 에너지를 생성한다. OXPHOS 시스템에 대한 metformin의 효과를 조사하기 위해, OXPHOS 복합체의 발현을 Western blot 분석과 미토콘드리아 효소 활성 분석을 통해 조사하였다. OXPHOS 복합체 I, II, III, IV 및 V의 발현은 H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포에서 유의미하게 감소하였으나, metformin으로 사전 처리했을 때 발현이 유의미하게 증가하였다($p<0.05$, 도 3A). Metformin 사전 처리는 또한 H2O2로 유도된 노화 세포에서 OXPHOS 복합체 I, II, III, IV 및 V의 효소 활성을 유의미하게 증가시켰다($p<0.05$, 도 3B).

[0141] 미토콘드리아 상태를 조사하기 위해, JC-1 염료를 사용한 유세포 분석과 실시간 PCR을 통해 각각 미토콘드리아 막 전위와 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 완전성을 분석하였다. JC-1은 건강한 미토콘드리아에서 집합체를 형성하며 적색 형광을 나타내지만, 미토콘드리아 막 전위가 감소하면 녹색 형광으로 전환된다. 적색 대비 녹색 형광의 비율 감소는 미토콘드리아 막 전위의 감소를 나타낸다. H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포의 비율은 대조군과 비교하여 유의미하게 낮았다. 그러나 metformin 사전 처리 시 비율이 유의미하게 증가하였다($p<0.01$, 도 4A, B).

[0142] H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포의 mtDNA 완전성은 대조군과 비교하여 유의미하게 감소하였다. H2O2 처리 세포에서 metformin 사전 처리 시 mtDNA 완전성은 유의미하게 증가하였다($p<0.05$, 도 4C). H2O2로 유도된 노화된 HEI-OC1 세포의 ATP 함량은 대조군과 비교하여 유의미하게 감소하였다. 그러나 H2O2 처리 세포에서 metformin 사전 처리 시 ATP 함량은 유의미하게 증가하였다($p<0.01$, 도 4D).

[0143] 이 결과는 metformin이 노화된 청각 세포에서 미토콘드리아 기능 저하에 효과적으로 대항한다는 것을 나타낸다.

[0145] Metformin은 와우 explant에서 mitophagy를 보존하고 노화를 감소시킨다

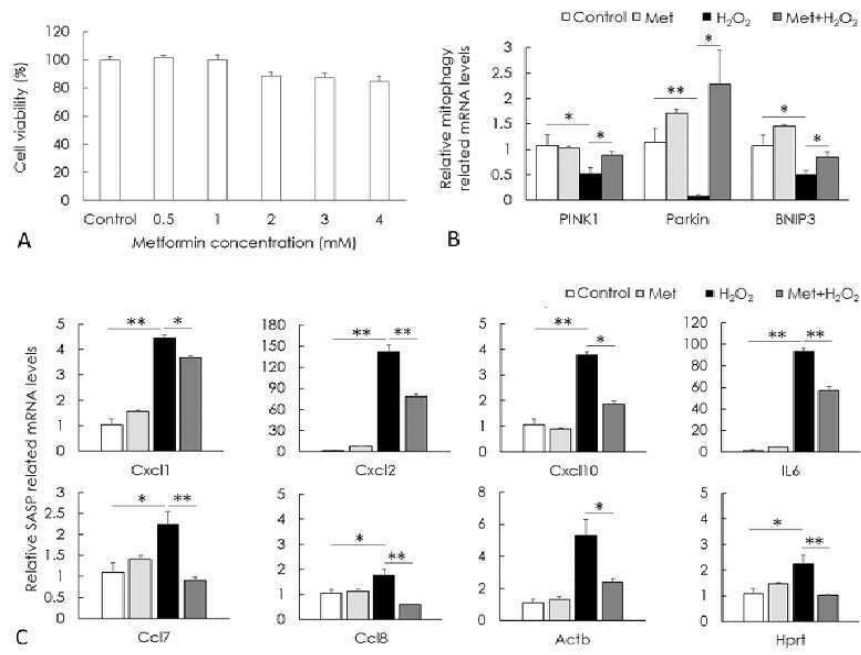
[0146] 포유류의 Corti 기관에서 노화에 대한 metformin의 효과를 조사하기 위해, 와우 explant를 metformin으로 사전 처리했거나 하지 않고 저농도의 H2O2로 처리하였다. 노화와 관련된 p53 및 p21의 발현은 H2O2 처리된 와우 explant에서 유의미하게 증가한 반면, mitophagy와 관련된 PINK1, Parkin, 및 BNIP3의 발현은 유의미하게 감소하였다. Metformin으로 사전 처리했을 때, 노화와 관련된 p53 및 p21의 발현이 유의미하게 감소하였으며, H2O2만 처리된 그룹과 비교하여 mitophagy와 관련된 PINK1, Parkin, 및 BNIP3의 발현이 유의미하게 증가하였다($p<0.01$, 도 5A).

[0147] β -galactosidase로 염색된 노화된 세포는 metformin으로 사전 처리된 H2O2 처리 와우 explant에서 감소하였다($p<0.05$, 도 5B). Metformin 사전 처리는 H2O2 처리된 와우 explant에서 OXPHOS 복합체 I, II, III, IV, 및 V 세포의 발현을 유의미하게 증가시켰다($p<0.05$, 도 5C).

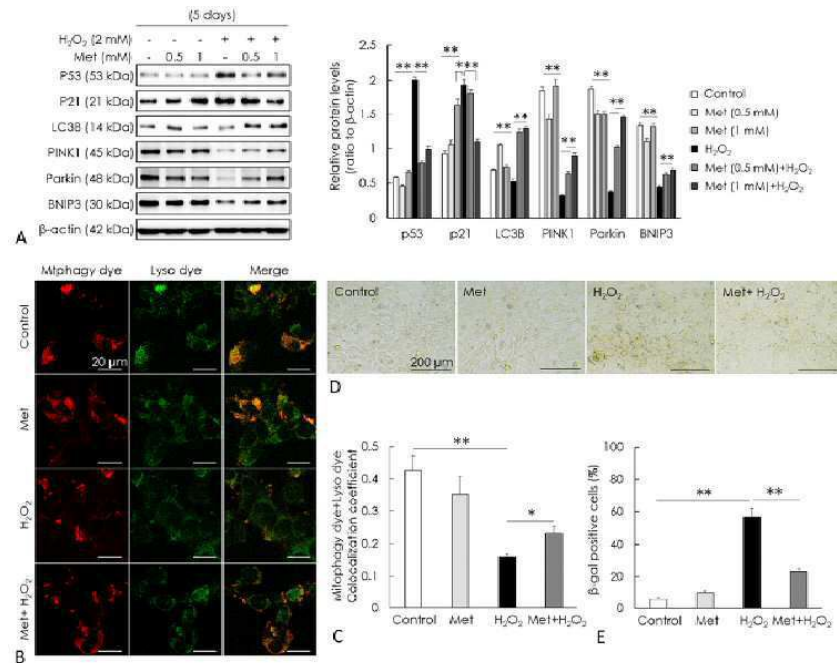
[0148] 이 결과는 metformin이 와우 explant에서 mitophagy와 미토콘드리아 기능을 보존하며, 노화를 감소시킨다는 것을 나타낸다.

도면

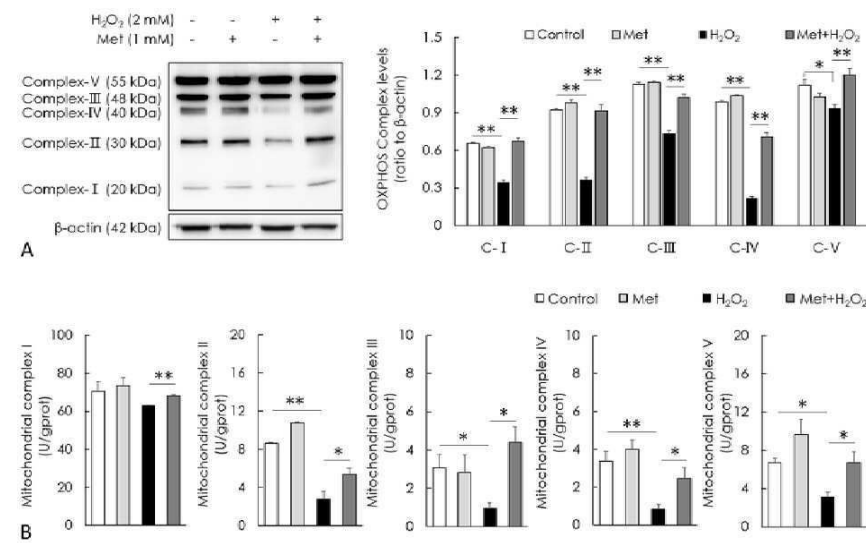
도면1



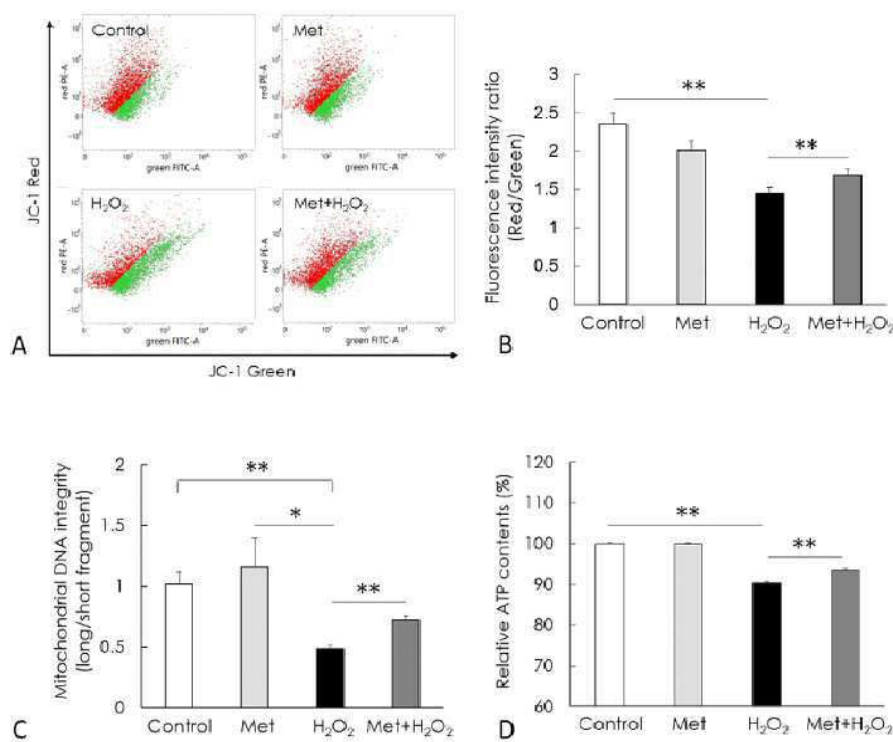
도면2



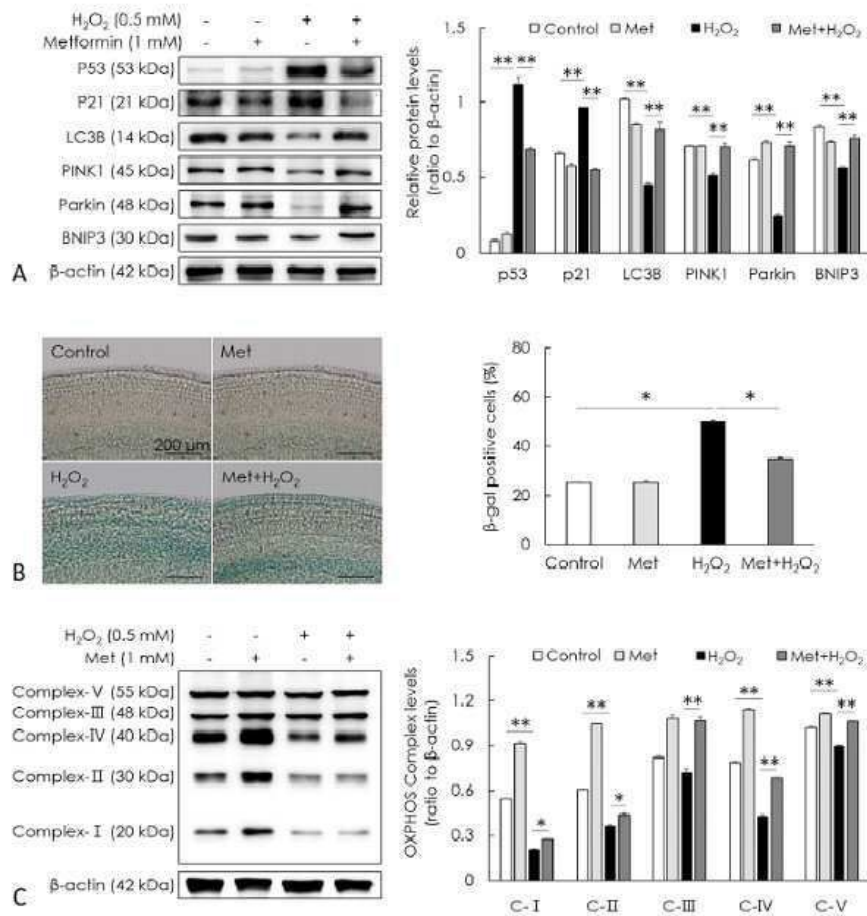
도면3



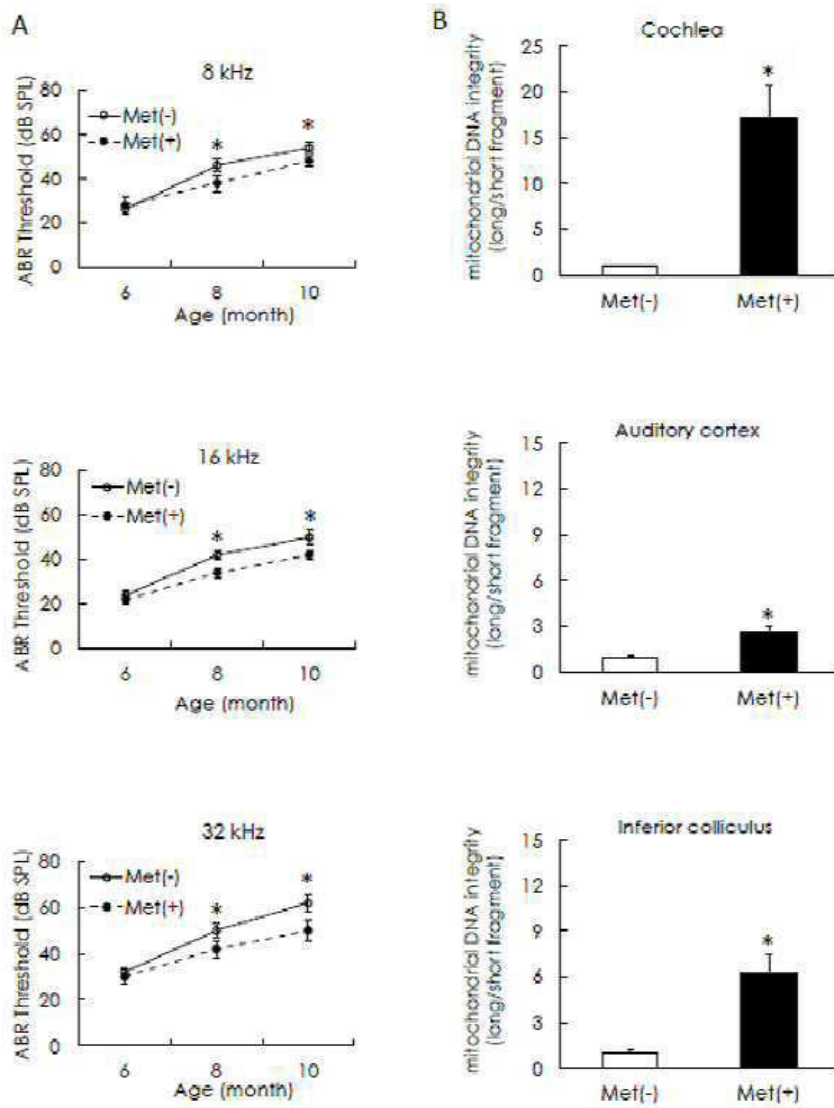
도면4



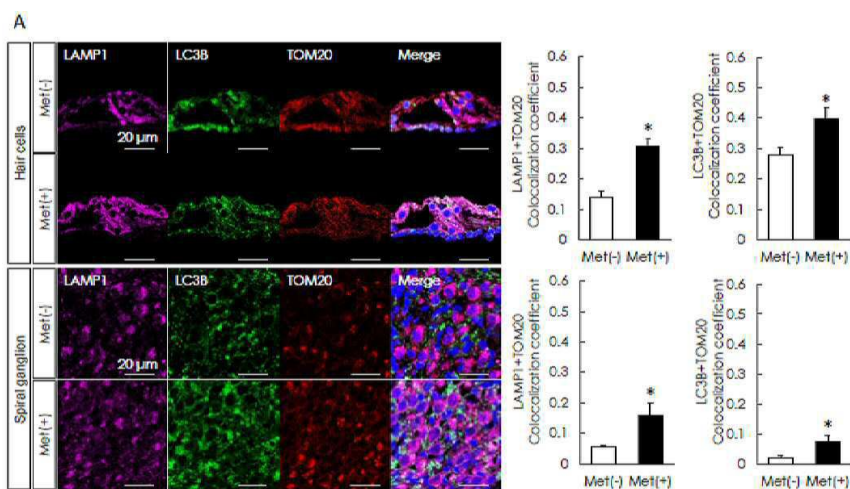
도면5



도면6



도면7a



도면7b

