(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0061662
(43) 공개일자 2025년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/54 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/662 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 9/5456 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-0147414
(22) 출원일자 2024년10월25일
심사청구일자 2024년10월25일
(30) 우선권주장
1020230143646 2023년10월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 퓨전바이오텍
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 106동 807B호(울산과학기술원)
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
유자형
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김상필
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김채규
울산광역시 남구 삼산로 231, 102동 2502호
(74) 대리인
특허법인더웨이브

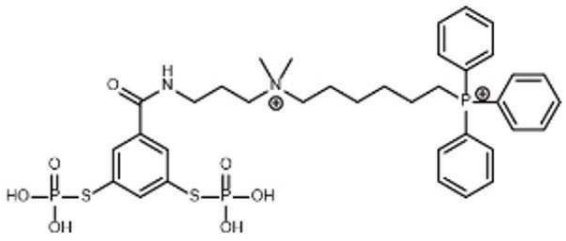
전체 청구항 수 : 총 14 항

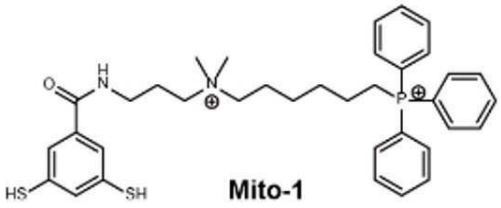
(54) 발명의 명칭 **선택적 노화 세포 사멸 유도 효능이 향상된 세놀리틱 화합물**

(57) 요 약

본 발명은 선택적 노화 세포 사멸 유도 효능이 향상된 세놀리틱 화합물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 노화 세포의 높은 ALP 활성 및 ROS 수치에서 선택적 반응함에 따라서, 노화 세포 선택적 사멸 효능이 현저히 향상되는 효과가 있으며, 약물 독성이 개선된 효과가 있다.

대 표 도 - 도1





(52) CPC특허분류
A61K 31/662 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 27/02 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/302 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711194690
과제번호 00208386
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 세포 안에서의 고분자 중합반응과 세포 운명 조절
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711192673
과제번호 2020M3A9D8038192
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 노화세포 운명조절을 위한 노화세포 선택적 치료 실용화 방법 개발
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711179890
과제번호 2020M3A9D8038190
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 저분자 화합물을 이용한 노화세포운명 조절방법 개발
과제수행기관명 주식회사 퓨전바이오텍
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711181440
과제번호 2020R1A2C1101377
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 노화제어기술 기반 치료용 나노머신 개발
과제수행기관명 주식회사 퓨전바이오텍
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

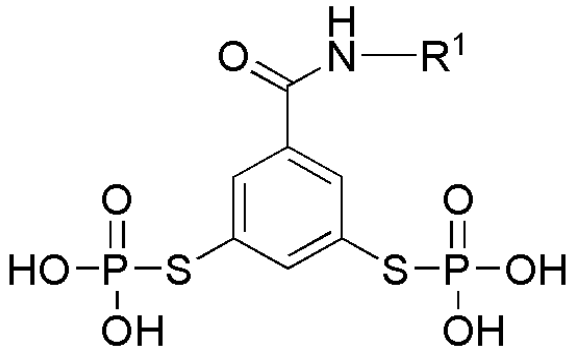
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^1은 미토콘드리아 표적화 모이어티, 또는 미토콘드리아 표적화 펩타이드이고,

상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인을 통해 연결될 수 있다.)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 TPP(triphenylphosphonium), 데퀄리늄(dequalinium), 구아니디늄(guanidinium), 트리에틸암모늄(triethylammonium), 피리디늄(pyridinium), 3-페닐술포닐 푸록산(3-phenylsulfonyl furoxan), F16, 2,3-디메틸벤조티아졸륨 요오드(2,3-dimethylbenzothiazolium iodide), 로다민 19(rhodamine 19) 및 로다민 123(rhodamine 123) 중 1종이고,

상기 미토콘드리아 표적화 펩타이드는 Leu-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Arg-Lys-Ala-Ala-Leu (LLRAALRKAAL), Met-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Ser-Thr-Ala-Arg-Arg-Gly-Pro-Arg-Leu-Ser-Arg-Leu-Leu (MLRAALSTARRGPRLSRLL), Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys (MLSLRQSIRFFK), Leu-Ser-Arg-Thr-Arg-Ala-Ala-Ala-Pro-Asn-Ser-Arg-Ile-Phe-Thr-Arg (LSRTRAAAPNSRIFTR), Met-Ile-Ala-Ser-His-Leu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Phe-Thr-Glu-Leu-Asn (MIASHLLAYFFTELN), Met-Ile-Ala-Ser-His-Leu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Phe-Thr-Glu-Leu-Asn (MIASHLLAYFFTELN), Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys (KLAKLAK), Lys-Leu-Ala-Lys-Arg-Gly-Asp (KLAKRGD) 및 Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys-Arg-Gly-Asp (KLAKLAKRGD) 중 1종이며,

상기 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인에서, 양이온성 모이어티는 옥소늄 이온, 4차 암모늄 이온 또는 4차 포스포늄 이온인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

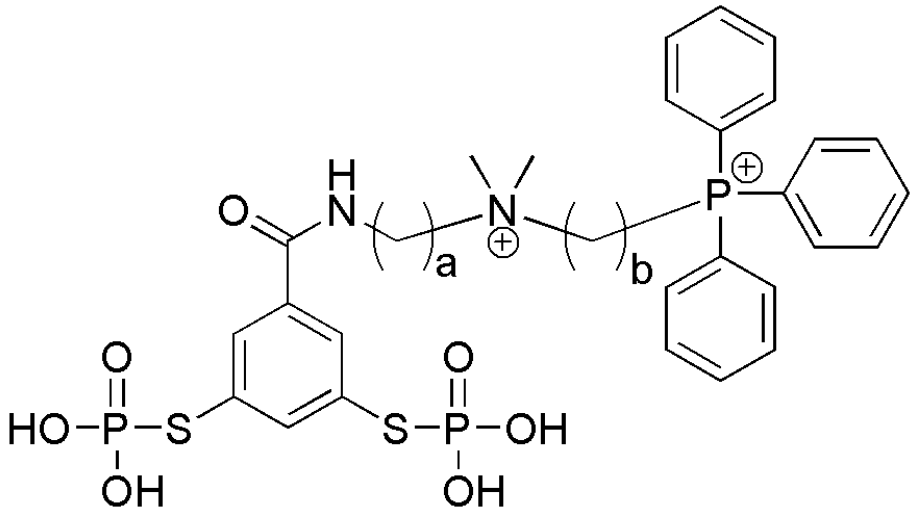
청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의

약학적으로 허용가능한 염.

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

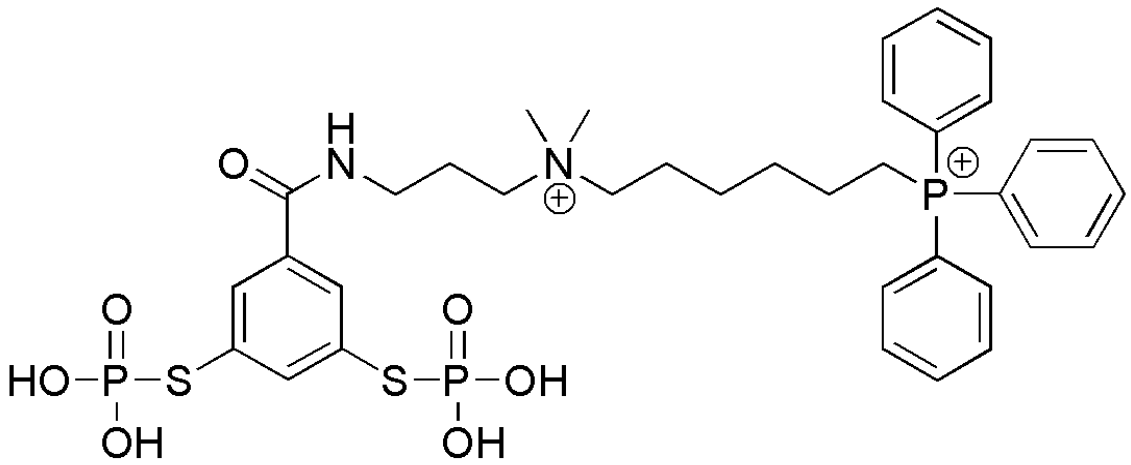
a 및 b는 1 내지 20의 정수이다.)

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물 'p-Mito-1'인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[화학식 3]



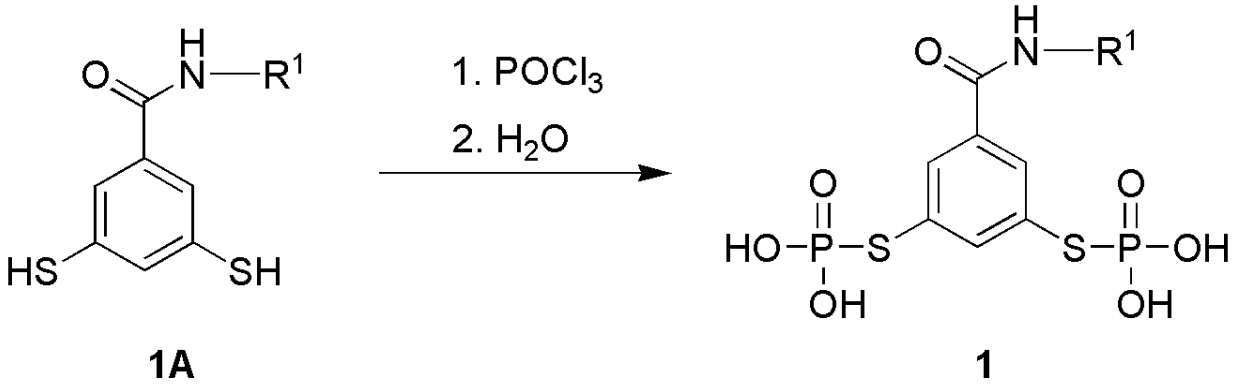
p-Mito-1

청구항 5

하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

화합물 1A 및 $POCl_3$를 유기용매에서 반응시킨 다음, 물을 첨가하여 가수분해를 통해 화합물 1을 얻는 단계(단계 1);를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법.

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

R^1은 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다.)

청구항 6

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 노화 관련 질환은 노인성 심혈관 질환 및 장애, 노인성 폐질환, 특발성 폐 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환, 골관절염, 노인 안구 질환 및 피부 노화 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 노인 안구 질환은 노인 황반변성인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 노화 관련 질환은 노인성 심혈관 질환 및 장애, 노인성 폐질환, 특발성 폐 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환, 골관절염, 노인 안구 질환 및 피부 노화 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 11

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 노화 관련 질환은 노인성 심혈관 질환 및 장애, 노인성 폐질환, 특발성 폐 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환, 골관절염, 노인 안구 질환 및 피부 노화 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는 건강식품 조성물.

청구항 13

제1항의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 세놀리틱(senolytic) 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 세놀리틱 조성물은 노화 세포를 선택적으로 사멸시키는 것을 특징으로 하는 세놀리틱 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 선택적 노화 세포 사멸 유도 효능이 향상된 세놀리틱 화합물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 노화과정이란 시간이 흐름에 따라 세포의 노화현상과 더불어 다양한 신체의 생화학적 또는 생리적인 기능이 저하되는 것으로써 나이가 들어감에 따라 노화 세포가 생체 내에 축적되고 노화와 관련한 질병들과 밀접한 영향을 미치면서 인간의 수명을 제한한다.

[0005] 세포의 노화란 세포가 더 이상 분열하지 않게 되는 것으로, 세포 분열시 염색체 말단의 염기서열 부위인 텔로미어 길이의 소진으로 인하여 세포가 더 이상 분열하지 않게 되는 복제노화와 자외선, 바이러스 감염 및 화학물질 등과 같은 외부의 자극이나 스트레스에 의한 암발생을 억제하는 기작으로써 발생하는 스트레스에 유도된 세포노화가 알려져 있다. 이런 노화세포는 노화세포의 분비 활성(SASP)이라 불리는 특정 성장인자나 생리활성 물질들을 정상세포에 비해 더 많이 분비 하여 인접한 세포조직이나 세포외 기질의 미세환경에 영향을 미치면서 염증반응, 생체항상성 및 다양한 생리활성 반응에 관여한다.

[0007] 일반적으로 염증반응과 관련된 분비 활성을 분비하는 노화세포들은 다양한 생리학적인 역할을 수행한 후에는 면역 시스템에 의해 제거되어 생체항상성을 유지하도록 하여 생명체가 건강한 생명활동을 수행하면서 안정적인 상태로 활동하게 되지만, 연령이 증가함에 따라서 면역 시스템이 퇴화하고 세포의 자가 치유 능력이 감소하게 됨으로써 노화세포들은 점차 몸에 축적되고 결국 생물체는 만성적으로 염증과 사는 비정상적인 상태에 이르게 되며 암 또는 다양한 노인성 질환에 걸릴 확률이 높아지게 된다.

[0009] 따라서 축적된 노화세포들을 선택적으로 제거할 수 있다면 생체항상성 또는 생체조직 재생능력을 향상시켜 생물체의 만성적 염증반응을 회복시켜 노화로 발생하는 다양한 질병을 치료하는데 획기적인 방법이 될 것이다. 최근 노화 세포를 제거하는 세놀리틱(senolytic) 약물들을 이용하여 퇴행성 관절염, 심혈관질병등의 퇴행성 질환

들을 완화시킬 수 있다는 가능성이 보고되었으나 현재까지 발굴된 senolytic은 5개 안팎 정도이며, 노화세포 클리어런스 분자적 기작이 명확하지 않아 다양한 임상학적 가치를 지닌 노화세포만 제거할 수 있는 의약 후보 물질 발굴연구가 절실하게 필요한 실정이다.

[0011] 본 출원인의 이전 특허출원(공개특허공보 10-2021-0052249호)에 따르면, 미토콘드리아 표적 화합물 'Mito-1'은 미토콘드리아의 산화 조건 하에서 이황화물 형성을 통해 거대한 섬유 형태의 생리 활성 구조로 자가조립될 수 있다. 이황화물 형성을 통해 얻어진 섬유 형태의 구조는 양전하를 띤 표면으로 인해 미토콘드리아 막과 강력하게 상호 작용하여 세포 사멸의 활성화를 야기한다. 정상세포의 미토콘드리아는 ROS 수치가 낮아 이황화물 형성 반응을 가속하지 않지만, 노화세포의 미토콘드리아는 ROS 수치가 높아 이황화물 형성 반응을 가속한다. 정상세포 및 노화세포에서 Mito-1은 나노 구조의 현장 형성을 통해 세포 기능의 조절을 나타내었지만 이황화 결합의 동적 불안정성으로 인한 구조 전이의 선택성 부족은 노화세포의 선택적 사멸 유도를 조절하기 어려운 문제가 있다.

[0013] 이에, 본 출원인은 정상세포에서는 ALP 활성 및 ROS 수치가 낮게 유지되고, 노화세포에서는 ALP 활성 및 ROS 수치가 높게 유지되는 점을 알아내고, Mito-1의 -SH 작용기에 포스페이트 작용기를 도입한 'p-Mito-1'을 합성하였고, 노화세포의 높은 ALP 활성 조건에서 탈인산화 반응이 유도되어 p-Mito-1이 Mito-1으로 변형되고, Mito-1은 노화세포의 높은 ROS 수치에서 이황화물 형성 반응이 가속되어 거대 섬유 구조로 자가조립되면서, 결국 노화세포의 선택적 사멸을 유도하는 효능이 현저히 향상됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 공개특허공보 10-2021-0052249호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적 1은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 목적 2는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 목적 3은 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 목적 4는 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 목적 5는 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

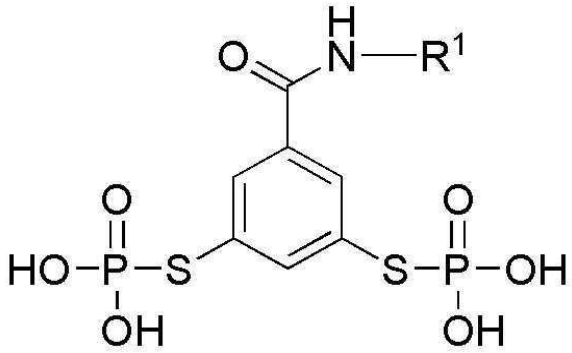
[0021] 본 발명의 목적 6은 세놀리틱(senolytic) 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0024] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0025] [화학식 1]

[0026] 

[0027] 상기 화학식 1에서,

[0028] R^1은 미토콘드리아 표적화 모이어티, 또는 미토콘드리아 표적화 펩타이드이고,

[0029] 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인을 통해 연결될 수 있다.

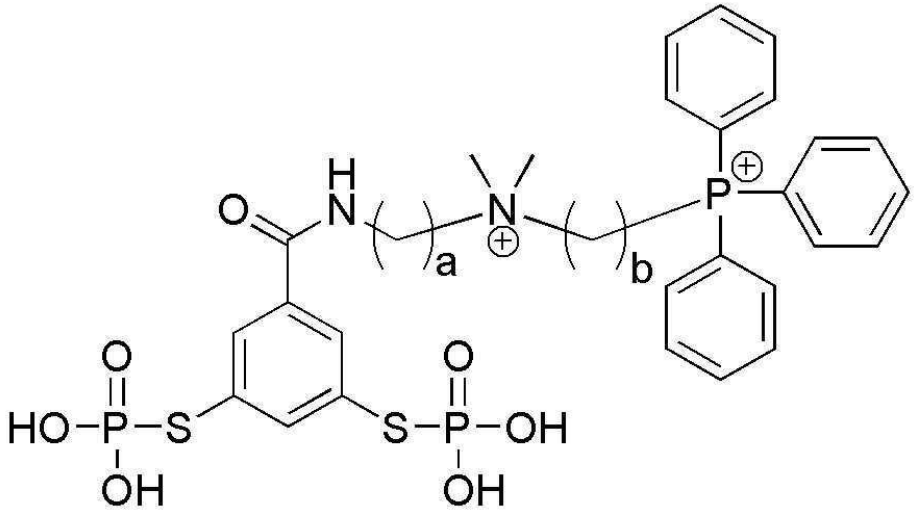
[0031] 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 TPP(triphenylphosphonium), 데퀄리늄(dequalinium), 구아니디늄(guanidinium), 트리에틸암모늄(triethylammonium), 피리디늄(pyridinium), 3-페닐술포닐 푸록산(3-phenylsulfonyl furoxan), F16, 2,3-디메틸벤조티아졸륨 요오드(2,3-dimethylbenzothiazolium iodide), 로다민 19(rhodamine 19), 로다민 123(rhodamine 123) 등을 사용할 수 있고,

[0032] 상기 미토콘드리아 표적화 펩타이드는 Leu-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Arg-Lys-Ala-Ala-Leu (LLRAALRKAAL), Met-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Ser-Thr-Ala-Arg-Arg-Gly-Pro-Arg-Leu-Ser-Arg-Leu-Leu (MLRAALSTARRGPRLSRLL), Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys (MLSLRQSIRFFK), Leu-Ser-Arg-Thr-Arg-Ala-Ala-Ala-Pro-Asn-Ser-Arg-Ile-Phe-Thr-Arg (LSRTRAAAPNSRIFTR), Met-Ile-Ala-Ser-His-Leu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Phe-Thr-Glu-Leu-Asn (MIASHLLAYFFTELN), Met-Ile-Ala-Ser-His-Leu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Phe-Thr-Glu-Leu-Asn (MIASHLLAYFFTELN), Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys (KLAKLAK), Lys-Leu-Ala-Lys-Arg-Gly-Asp (KLAKRGD), Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys-Arg-Gly-Asp (KLAKLAKRGD) 등을 사용할 수 있으며,

[0033] 상기 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인에서, 양이온성 모이어티는 옥소늄 이온, 4차 암모늄 이온, 4차 포스포늄 이온 등을 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 C_{2-20}의 알킬레닐 체인의 일부 탄소를 O, N 또는 P가 대체하며 양이온을 형성하는 형태일 수 있다.

[0035] 바람직하게, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0036] [화학식 2]



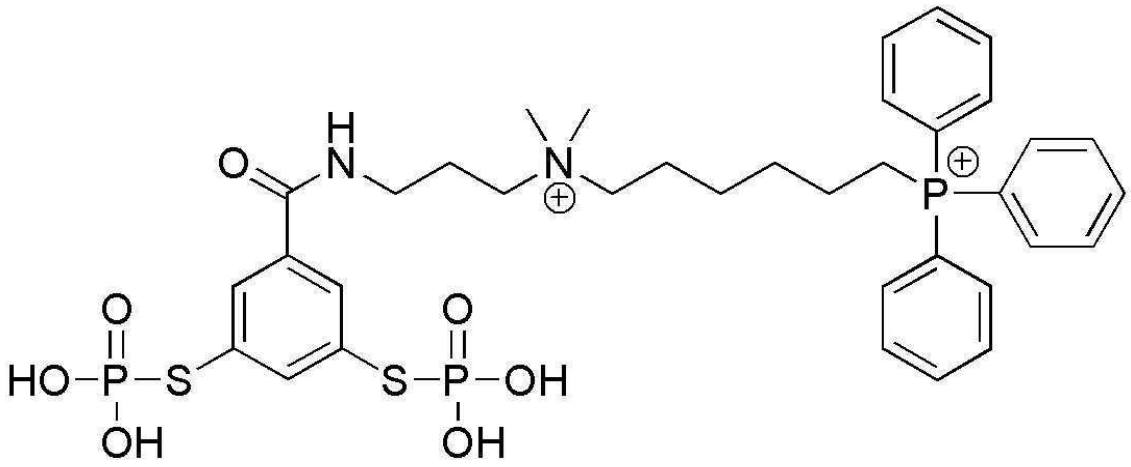
[0037]

[0038] 상기 화학식 2에서,

[0039] a 및 b는 1 내지 20의 정수이다.

[0041] 더욱 바람직하게, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물 'p-Mito-1'일 수 있다.

[0042] [화학식 3]



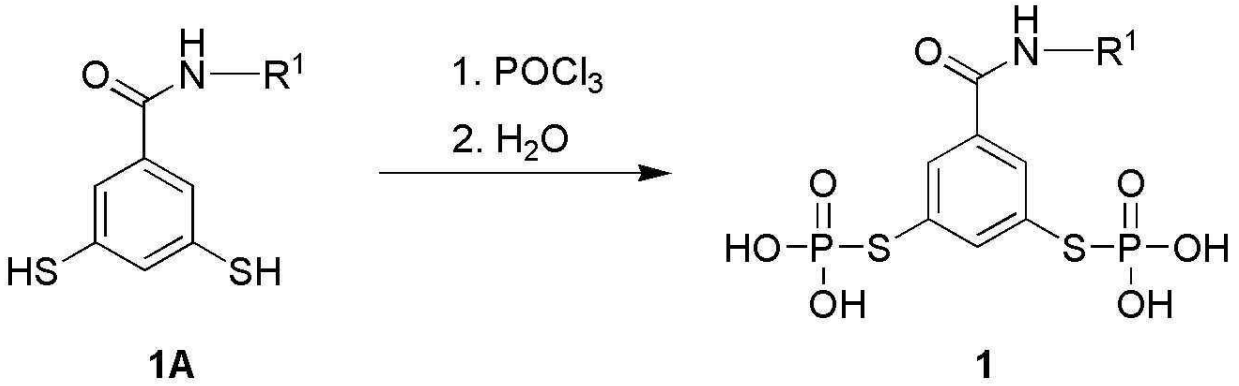
p-Mito-1

[0043]

[0045] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0046] 화합물 1A 및 $POCl_3$를 유기용매에서 반응시킨 다음, 물을 첨가하여 가수분해를 통해 화합물 1을 얻는 단계(단계 1);를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0047] [반응식 1]



1A 1

[0048]

[0049] 상기 반응식 1에서,

[0050] R^1은 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0052] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0053] 상기 노화 관련 질환으로는 노인성 심혈관 질환 및 장애, 노인성 폐질환, 특발성 폐 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환, 골관절염, 노인 안구 질환, 피부 노화 등을 들 수 있고, 복수의 질환에 동시에 적용할 수도 있다.

[0054] 상기 노인 안구 질환의 일례로는 노인 황반변성을 들 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0058] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0060] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 세놀리틱(senolytic) 조성물을 제공한다.

[0061] 상기 세놀리틱 조성물은 노화 세포를 선택적으로 사멸시키는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0063] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 노화 세포의 높은 ALP 활성 및 ROS 수치에서 선택적 반응함에 따라서, 노화 세포 선택적 사멸 효능이 현저히 향상되는 효과가 있고, 포스페이트 작용기를 포함하는 구조로써 포스페이트 작용기가 도입되지 않은 약물 대비 안구 독성이 개선되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 실시예 1의 출발물질인 'Mito-1' 및 생성물인 'p-Mito-1'의 화학구조식이다.

도 2는 실시예 1의 생성물인 'p-Mito-1'의 ^{1}H NMR, ^{31}P NMR 스펙트럼 이미지이다.

도 3은 비교예 1의 출발물질인 'Mito-2' 및 생성물인 'p-Mito-2'의 화학구조식이다.

도 4는 비교예 1의 생성물인 'p-Mito-2'의 ^{1}H NMR, ^{31}P NMR 스펙트럼 이미지이다.

도 5a는 실시예 1에서 합성한 p-Mtio-1의 화학구조와 이의 ALP 효소 반응 매개 탈인산화 결과물에 해당하는 Mito-1의 화학구조이다.

도 5b는 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1을 0.5 U ALP와 함께 배양하고, 0, 2, 6시간 후 ^{31}P NMR 스펙트럼으로 확인한 결과이다.

도 5c는 ALP 부재(W/O ALP) 또는 ALP 존재(W/ ALP) 조건에서, 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1 단량체의 양을 시간 경과에 따라 HPLC 모니터링한 결과이다.

도 5d는 ALP 부재(W/O ALP) 또는 ALP 존재(W/ ALP) 조건에서, 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1 단량체의 IR 스펙트럼 결과이다.

도 5e는 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1을 0.5 U ALP 및 1 mM H_2O_2와 함께 배양하기 전(좌측 이미지)과 후(우측 이미지)의 투과전자현미경(TEM) 이미지이다.

도 5f는 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1을 0.5 U ALP 및 1 mM H_2O_2와 함께 배양하기 전과 후의 동적광산란분석(DLS) 결과이다.

도 5g는 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1을 0.5 U ALP 및 1 mM H_2O_2와 함께 배양하기 전과 후의 제타 포텐셜 측정 결과이다.

도 5h는 ALP 부재(W/O ALP) 또는 ALP 존재(W/ ALP) 조건에서, 실시예 1의 p-Mito-1 처리 농도에 따른 칼세인(염료) 담지 리포솜에서 칼세인 방출율을 확인한 결과이다.

도 6은 정상 RPE 세포 및 노화 RPE 세포 각각의 ALP 활성을 측정한 결과이다.

도 7a는 노화 RPE 세포의 미토콘드리아 형태를 확인한 Cell-TEM 이미지이다.

도 7b는 노화 RPE 세포에 실시예 1의 p-Mito-1 처리에 따른 미토콘드리아 형태를 확인한 Cell-TEM 이미지이다.

도 7c는 시료 처리 24시간 후 Mitotracker로 표지된 노화 세포에서 미토콘드리아 단편화를 관찰한 이미지이다.

도 7d는 시료 처리에 따른 미토콘드리아 길이의 정량화 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7e는 정상 세포와 노화 세포 각각에 대한 Mito-1과 p-Mito-1의 IC 50 값을 나타낸 그래프이다.

도 7f는 100 μM의 p-Mito-1과 함께 배양된 세포 사멸 노화 세포를 보여주는 FACS 분석결과이다.

도 7g는 100μM의 시료로 처리한 노화 세포에서 세포사멸 관련 단백질(Cytochrome c, Pro-caspase-9, Pro-caspase-3 및 PARP1)의 상대적인 양을 측정한 결과이다.

도 7h는 다양한 농도의 p-Mito-1 처리 후 노화세포의 제거를 보여주는 SA-β-gal 분석의 광학 이미지이다.

도 7i는 다양한 농도의 p-Mito-1 처리 후 SA-β-gal 양성 세포의 백분율을 나타낸 그래프이다.

도 8은 탈분극된 막 아래에서 녹색 형광을 방출하는 JC-1 염료를 사용하여 샘플로 처리된 노화 APRE 세포의 미토콘드리아 탈분극을 관찰한 공초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지이다.

도 9a는 B-L에서 실험을 위한 시간 과정의 개략도이다.

도 9b는 컬러 안저 이미지(CFP), 안저 자가형광 이미지(FAF), SA-β-gal 염색의 대표 이미지(SA-β-gal)를 나타낸 안저검사 이미지이다(스케일바 200 μm).

도 9c는 ZO-1에 대한 RPE/맥락막 플랫 마운트의 면역형광 염색 이미지이다(스케일바 50 μm).

도 9d는 RPE/맥락막 플랫 마운트에서 가장 중요한 노화 지표 중 하나인 SA-β-gal 활성을 정량화하여 나타낸 이미지이다.

도 9e는 Image J를 사용하여 ZO-1의 면역 형광 이미지에서 RPE 영역을 정량화한 결과이다.

도 9f는 노화 마커 (p16 및 p21, 빨간색) 및 핵에 대한 면역 형광 염색의 공초점 현미경 사진을 Hoechst (파란

색)로 대조 염색한 이미지이다(스케일바 50 ㎛).

도 9g는 p16 발현 영역의 정량화 결과이다.

도 9h는 p21 발현 영역의 정량화 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0068] **약학적으로 허용 가능한 염**

[0069] 본 발명의 유효물질은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 유효물질의 염기 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 유효물질의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔술폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트가 바람직하다.

[0070] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 유효물질을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0071] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0072] 나아가, 본 발명은 유효물질 및 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 이성질체, 광학 이성질체 등을 모두 포함한다.

[0074] **약학적 조성물**

[0075] 본 발명의 유효물질은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0076] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 유효물질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이

트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0077] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0078] 또한, 본 발명의 유효물질의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001-100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01-35 mg/kg/일이다. 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07-7000 mg/일이며, 바람직하게는 0.7-2500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0080] **건강식품 및 건강기능성식품 조성물**

[0081] 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 및 건강기능성식품을 모두 포함한다.

[0082] 건강식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스넥류, 면류, 아이스크림, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 등을 들 수 있다.

[0083] 건강기능식품의 예로는 정제, 캡슐제, 환제, 액제 형태 등의 건강기능성식품을 들 수 있고, 이너뷰티 제품도 포함될 수 있다.

[0085] 본 발명에 따른 유효물질을 함유하는 건강식품 및 건강기능성식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효물질의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 및 건강기능성식품 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0086] 본 발명의 건강식품 및 건강기능성식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명 유효물질을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트라이톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능성 식품 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0087] 상기 외에 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강식품 및 건강기능성식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품 및 건강기능성식품 조성물은 천연 과일쥬스 및 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0088] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강식품 및 건강기능성식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0090] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0092] **재료 및 방법**

[0093] 트리페닐포스핀, 옥시염화인, 메틸 3,5-디히드록시벤조에이트를 포함한 모든 화학 화합물은 Thermofisher에서 구입했다. N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA)과 트리플루오로아세트산(TFA)은 TCI에서 구입했다. 용매는 삼천화학에서 구입했다. 모든 조 생성물은 triart-C18 컬럼이 있는 다중 분취용 HPLC(LC-forte, YMC)를 사용하여 정제하였다. 모든 형광 염료(TMRM, MitoSOX, Annexin V-FITC, JC-1 및 MitoTracker)는 Thermo Fisher에서 구입했다. MALDI-TOF/TOF(Ultraflex III, Bruker)를 이용하여 정제된 생성물을 확인했다. 모든 TEM 이미지는 Bio-TEM(JEM 1400)에서 얻었다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM 780)을 사용하여 CLSM 이미지를 얻었다.

[0095] **노화세포의 미토콘드리아 내 FRET 특성 관찰**

[0096] 노화 ARPE 세포를 8웰 플레이트에 10,000 세포 밀도로 세포 배양 배지를 24시간 동안 접종하였다. 그런 다음 세포를 10 μM Mito-G 및 Mito-R과 함께 120, 130, 140, 160, 180, 200 및 240분 동안 배양하고 차가운 PBS로 3회 세척하였다. 형광은 450nm에서만 여기되는 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM 780)을 사용하여 모니터링하였다.

[0098] **알칼리성 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP) 활성 측정**

[0099] ARPE-19 및 SnC_ARPE-19를 세포 배양 배지 내 25mL T-플라스크에 접종하였다. 80% 컨플루언시에서 세포를 트립신-EDTA로 수확한 다음 세포를 차가운 PBS로 세척하였다. 다음으로, 세포를 50 μl의 ALP 분석 완충액에 재현탁시키고 얼음 위에 보관하였다. 세포를 4 ℃에서 1000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 모아 새 튜브에 옮겼다. 그 후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)로 405 nm에서 발광을 관찰하여 활성을 측정하였다.

[0101] **세포 TEM 준비**

[0102] 세포 TEM 샘플 준비를 위해서 노화 ARPE 세포 및 ARPE 세포를 6웰 플레이트에 시딩하였다. 세포의 80% 컨플루언스에서, 세포를 48시간 배양하는 동안 샘플로 처리하였다. 다음으로, 세포를 차가운 PBS로 세척하고 수확하였다. 세포 펠릿을 0.1M 인산나트륨 완충액(pH 7.2)으로 3회 세척하였다. 2% 글루타르알데히드로 30분 동안 고정시킨 후 인산나트륨 완충액으로 3회 세척하였다. 세포를 인산나트륨 완충액에 용해된 1% 사산화오스뮴(Electron Microscopy Science)으로 1시간 동안 후고정시킨 후 증류수로 3회 세척하였다. 등급화된 일련의 아세톤(각 단계마다 20%)을 사용하여 탈수한 후 샘플을 에폭시 수지에 매립하였다. 수지를 80℃에서 24시간 동안 중합시켰다. CR-X 초박절편기를 사용하여 매우 얇은 절편(100 nm)을 얻었고 120 kV에서 JEM-1400으로 관찰하였다.

[0104] **JC-1을 이용한 미토콘드리아 막 탈분극 관찰**

[0105] 세포를 8-웰 플레이트(Thermo Fisher)에 접종하여 배양 배지와 함께 24시간 동안 배양하였다. 80% 컨플루언시에서 세포에 100 μM의 p-Mito-1을 처리하고 24시간 배양한 다음 세포를 차가운 PBS로 3회 세척하였다. 미토콘드리아 막의 탈분극은 2 μM의 JC-1로 30분 동안 처리한 후 평가하였다. JC-1 표지 세포는 LSM 7000 기기를 사용하여 모니터링하였다.

[0107] **TMRM을 사용한 미토콘드리아 막 탈분극 모니터링**

[0108] 세포를 세포 배양 배지에서 24시간 동안 80% 컨플루언스로 8웰 플레이트에서 배양하였다. 세포를 100 μM의 p-Mito-1과 함께 24시간 동안 배양하고, 세포를 차가운 PBS로 3회 세척하였다. 탈분극된 막을 20 nM의 TMRM으로 30분간 처리한 후 평가하였다. TMRM 표지된 세포는 LSM 7000 기기를 사용하여 모니터링하였다.

[0110] **MitoSOX를 사용한 미토콘드리아 내부 ROS 생성 이미징**

[0111] 세포를 8-웰 플레이트에서 80% 컨플루언스까지 배양하고, 100 μM의 p-Mito-1과 함께 24시간 동안 배양한 후 차가운 PBS로 3회 세척하였다. ROS의 생성은 MitoSOX(Invitrogen, M36008)로 30분 동안 처리하여 염색하였다. 세포 내 미토콘드리아 ROS는 도립현미경(LSM 780, Carl Zeiss)을 사용하여 관찰하였다.

[0113] **세포 생존율 분석**

[0114] 80% 컨플루언스의 세포(노화 ARPE 세포 및 ARPE 세포)를 세포 배양 배지 내 96웰 플레이트에서 배양하였다. 세포를 48시간 동안 다양한 농도의 p-Mito-1과 함께 배양하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 MTT 분석을 사용하여 세포의 생존율을 계산했다. MTT의 발광성은 마이크로플레이트 리더를 사용하여 분석하였다.

[0116] **웨스턴 블롯 분석**

[0117] 노화 ARPE 세포의 웨스턴 블롯 분석을 위해, 세포를 6웰 플레이트에 시딩했다. 세포를 SDS-PAGE 겔에서 분리하고 cleaved caspase-3(1:500, Abcam, ab2302), cleaved caspase-9(1:1000, Abcam, ab2324) 및 β-actin(1:2000, Abcam, ab8226)에 대한 1차 항체를 사용한 면역블롯팅으로 검출하였다. 사용된 1차 항체의 유형에 따라 막을 HRP(horseradish peroxidase) 컨쥬게이티드 염소 항-마우스 또는 항-토끼 2차 항체와 함께 2시간 동안 배양하였다. 면역반응성 단백질은 향상된 화학발광 기질(Thermo Fisher, 34580)을 사용하여 검출하였고, ImageJ 소프트웨어(NIH, USA)를 사용하여 농도계로 정량화했다. 모든 실험은 적어도 3번 이상 수행되었다.

[0119] **실험동물**

[0120] 건국대학교 실험 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)가 수립한 지침에 따라 마우스를 유지하고 건국대학교 실험실 동물 연구 센터 내의 통제된 장벽 시설에 보관했다. 모든 동물 실험은 건국대학교 IACUC(KU ISCUC, 승인번호 KU21118)에서 승인한 지침에 따라 수행되었다. C58BL/6J 수컷 생쥐(8주령)는 실험동물자원센터(청주)에서 구입하여 실험 전 1주일 동안 시설에 적응시켰다. 모든 실험에서 마우스는 대조군 또는 처치군에 무작위로 배정되었다. Zoletil과 xylazine (4:1, 식염수로 희석)을 복강내 주사하여 마우스를 마취시킨 후 국소 트로페린 점안액(1회 사용, 페닐에프린 염산염(5mg/ml) 및 트로피카미드(5mg/ml), 한미약품)으로 동공을 확장시켰다. 시술 후 모든 눈에 항생제 안연고 (Tarivid, Santen)를 도포했다.

[0122] **망막하 및 유리체강 내 주사**

[0123] 광학 현미경(Olympus SZ51) 하에서 30게이지 멸균 바늘(BD Science)을 사용하여 윤부에 작은 구멍을 뚫었다. 그런 다음 무딘 35게이지 Hamilton 마이크로 주사기(Hamilton Company)를 구멍을 통해 삽입했다. 0일째에 C57BL/6J 마우스의 망막하 공간에 100ng/μl의 Dox 1 μl를 주사했다. 200ng/μl Mito-1, 200ng/μl p-Mito-1 또는 비히클(생리식염수 내 0.4% DMSO)을 3일차에 무딘 35게이지 해밀턴 마이크로시린지를 사용하여 유리체강 내 주사하였다.

[0125] **노화 관련 β-갈락토시다제 염색 평가**

[0126] 조직을 SA-β-갈락토시다제(SA-β-gal) 염색 키트와 함께 제공된 고정액으로 실온에서 1시간 동안 고정하고 제조업체의 프로토콜(Cell signalling, 9860S)에 따라 제공된 염색 용액으로 염색하였다. 37℃에서 밤새 SA-β-gal 염색 후 RPE(retinal pigment epithelium)/맥락막의 무거운 멜라닌 색소가 표백되어 이들 조직의 멜라닌 색소에 의해 가려진 SA-β-gal 염색이 드러났다. 조직을 PBS로 10분 동안 세 번 세척했다. 조직의 탈색을 위해 30% H_2O_2에 담그고 55℃ Heat block에서 50분간 배양하였다. 조직을 PBS로 헹구고 밤새 4℃ PBS에서 배양하였다. 그런 다음 광학 현미경(Olympus SZ51) 아래에 4점 집게와 수술용 칼날(World Precision Instruments, FL, USA)을 평면 장착했다. 염색된 망막 평면 마운트, RPE/맥락막 평면 마운트의 이미지를 도립 현미경(Leica Microsystems #DMi1)을 사용하여 캡처했다.

[0128] **ZO-1 면역형광 이미지 분석**

[0129] 그룹 간 RPE 세포의 형태를 비교하기 위해 Z-스택 기술을 사용하는 공초점 현미경을 통해 면역형광 ZO-1 이미지를 얻었다. 샘플의 ZO-1 영역을 강조하기 위해 ImageJ 소프트웨어의 밝기와 대비를 사용하여 의사 색상을 적용하였다. 각 샘플의 면적 크기는 ROI 관리자를 사용하여 측정되었다. 그 후 제공 BAR 플러그인의 ROI 컬러 코더를 이용하여 해당 영역을 크기에 비례하는 색상으로 칠했다.

[0131] **조직 내 미토콘드리아 ROS**

[0132] MitoSox(Invitogen, M36008)를 사용하여 RPE/맥락막 플랫 마운트에서 미토콘드리아 ROS 생산을 시각화했다. RPE/맥락막 편평 마운트를 인큐베이터에서 37℃에서 10분 동안 5μM MitoSox 용액으로 처리했다. 조직을 PBS 중 핵 염료 Hoechst 33342(1:1500, Thermo Fisher Scientific, H3570)로 실온에서 15분 동안 염색했다. 그 후, 조직을 장착 매체(Polysciences, 18606-20)를 사용하여 장착했다. 미토콘드리아 ROS는 공초점 현미경(CarlZeiss, LSM900)으로 관찰되었다.

[0134] **RPE/맥락막 플랫 마운트의 면역형광**

[0135] 조직을 실온에서 1시간 동안 4% PFA로 고정시켰다. PBS에 용해된 0.1% Triton X-100/3% BSA로 1시간 동안 투과화 및 차단한 후, 고정된 조직을 4℃ p16 (1:500, Santa, sc-1661), p21 (1:300, Abcam, ab188224), ZO-1(1:500, Invitrogen, 33-9100) 또는 HMGB1(1:400, Abcam, ab79823)에서 밤새 배양했다. 염색된 조직을 PBS로 10분 동안 3회 세척하고 하기 Alexa Fluor 결합 2차 항체와 함께 실온에서 2시간 동안 배양하였다. Alexa Fluor 488 컨쥬게이티드 염소 항-마우스 IgG(1:500, Thermo Fisher Scientific, A-11029, Waltham, USA), Alexa Fluor 555-컨쥬게이티드 염소 항-마우스 IgG(1:300, Thermo Fisher Scientific, A21424) 또는 Alexa Fluor 555-컨쥬게이티드 염소 항-토끼 IgG(1:300, Thermo Fisher Scientific, A21429). 2차 항체와 함께 배양 후, 조직을 PBS 중 핵 염료 Hoechst 33342(1:3000, Thermo Fisher Scientific, H3570)로 실온에서 10분 동안 염색했다. 염색된 조직을 PBS로 10분 동안 3회 세척했다. 그 후, Mounting medium(Polysciences, 18606-20, PA, USA)를 이용하여 조직을 마운트하였다. 염색된 조직을 공초점현미경(CarlZeiss, LSM900, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

[0137] **컬러 안저 사진 및 안저 자가형광 이미징**

[0138] 디지털 이미징 시스템(Nikon, Japan)에 연결된 TRC-50 IX 카메라(Topcon, Tokyo, Japan)를 사용하여 확장한 후 마우스 눈의 컬러 안저 사진 및 안저 자가형광 이미지를 캡처했다.

[0140] **<실시예 1> 미토콘드리아 표적 화합물 'p-Mito-1'의 합성**

[0141] (3-((3-(3,5-디머캅토벤즈아미도)프로필)디메틸암모늄)프로필)트리페닐포스포늄 (이하 'Mito-1'로 칭함)을 1.5 당량의 DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine) 및 4.0 당량의 옥시염화인 (phosphorus oxychloride)이 함유된 에틸아세테이트에 용해시켰다. 상온에서 24시간 동안 교반한 후, 얼음욕조에 증류수를 적가하여 가수분해를 진행하였다. 생성물을 HPLC를 사용하여 정제하고, ^{1}H NMR, ^{31}P NMR 스펙트럼 및 질량 분석을 사용하여 확인하였다.

[0142] 이하, 실시예 1에서 얻은 생성물인 미토콘드리아 표적 화합물을 'p-Mito-1'로 칭한다.

[0144] 도 1은 실시예 1의 출발물질인 'Mito-1' 및 생성물인 'p-Mito-1'의 화학구조식이다.

[0145] 도 2는 실시예 1의 생성물인 'p-Mito-1'의 ^{1}H NMR, ^{31}P NMR 스펙트럼 이미지이다.

[0147] **<비교예 1> 미토콘드리아 표적 화합물 'p-Mito-2'의 합성**

[0148] (3-((3-(3,5-디하이드록시벤즈아미도)프로필)디메틸암모늄)프로필)트리페닐포스포늄 (이하 'Mito-2'로 칭함)을 1.5 당량의 DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine) 및 4.0 당량의 옥시염화인 (phosphorus oxychloride)이 함유된 에틸아세테이트에 용해시켰다. 상온에서 24시간 동안 교반한 후, 얼음욕조에 증류수를 적가하여 가수분해를 진행하였다. 생성물을 HPLC를 사용하여 정제하고, ^{1}H NMR, ^{31}P NMR 스펙트럼 및 질량 분석을 사용하여 확인하였다.

[0149] 이하, 비교예 1에서 얻은 생성물인 미토콘드리아 표적 화합물을 'p-Mito-2'로 칭한다.

[0151] 도 3은 비교예 1의 출발물질인 'Mito-2' 및 생성물인 'p-Mito-2'의 화학구조식이다.

[0152] 도 4는 비교예 1의 생성물인 'p-Mito-2'의 ^{1}H NMR, ^{31}P NMR 스펙트럼 이미지이다.

[0154] **<실험예 1> 구형 입자에서 섬유 구조로의 변형을 위한 ALP 매개 탈인산화 및 이황화물 형성 원리 규명**

[0155] 도 5a는 실시예 1에서 합성한 p-Mtio-1의 화학구조와 이의 ALP 효소 반응 매개 탈인산화 결과물에 해당하는 Mito-1의 화학구조이다.

[0157] **(1) p-Mito-1의 ALP 매개 탈인산화 규명**

[0158] 실시예 1에서 p-Mito-1 화합물을 합성한 후, 알칼리성 포스파타제(ALP)에 의한 티오포스페이트의 탈인산화를 ^{31}P NMR의 시간 의존 분석을 사용하여 평가하였고, 그 결과를 도 5b에 나타내었다.

[0159] 도 5b는 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1을 0.5 U ALP와 함께 배양하고, 0, 2, 6시간 후 ^{31}P NMR 스펙트럼으로 확인한 결과이다.

[0160] 도 5b에 나타난 바와 같이, 초기 상태에서는 ^{31}P NMR 스펙트럼의 0 ppm에서 인산기의 뚜렷한 피크가 잘 관찰되나, 500 μM p-Mito-1을 0.5 U ALP와 함께 2시간 배양한 후 인산염 그룹의 적분은 감소하고 피크는 6시간 배양 이내에 완전히 사라졌다. 반면, 트리페닐포스포늄 피크는 ALP 배양 후에도 원래 상태를 유지하였다. 유사하게, 탈인산화 거동은 0.5 U ALP와 함께 배양된 p-Mito-2 용액에서도 관찰되었으며, 이는 p-Mito-1과 p-Mito-2 모두 ALP에 의해 탈인산화될 수 있음을 시사한다.

[0162] HPLC 분석에서 p-Mito-1 단량체의 양을 모니터링하여 탈인산화를 추가로 조사하였고, 그 결과를 도 5c에 나타내었다.

[0163] 도 5c는 ALP 부재(W/O ALP) 또는 ALP 존재(W/ ALP) 조건에서, 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1 단량체의 양을 시간 경과에 따라 HPLC 모니터링한 결과이다.

[0164] 도 5c에 나타난 바와 같이, p-Mito-1의 양은 ALP 존재 조건에서 급격히 감소하고 약 3분 만에 새로운 피크가 나타났으며 이는 Mito-1의 피크와 일치하였다. 대조적으로, p-Mito-1의 양은 ALP 부재 조건에서는 여전히 초기 상태를 유지하였다.

[0166] 도 5d는 ALP 부재(W/O ALP) 또는 ALP 존재(W/ ALP) 조건에서, 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1 단량체의 IR 스펙트럼 결과이다.

[0167] 도 5d에 나타난 바와 같이, ALP와 6시간 배양한 후 2870cm^{-1}에서 S-H 결합의 피크가 나타난 것으로 보아, p-Mito-1에서 탈보호된 티올 작용기를 확인하였다. 이 결과는 ALP가 p-Mito-1의 탈인산화를 유도하여 이황화 결합 형성을 가능하게 하는 티올 작용기가 나타남을 시사한다.

[0169] **(2) 이황화물 형성에 따른 구형 입자에서 섬유 구조로의 자기조립 거동 규명**

[0170] 구형 나노입자 형태의 p-Mito-1은 ALP 효소에 의해 탈인산화하여 Mito-1으로 변형되고, Mito-1은 산성 조건하에서 이황화물을 형성하면서 거대 섬유 구조로의 자기조립이 일어나 세포 사멸을 유도하게 된다.

[0172] 도 5e는 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1을 0.5 U ALP 및 1 mM H_2O_2와 함께 배양하기 전(좌측 이미지)과 후(우측 이미지)의 투과전자현미경(TEM) 이미지이다.

[0173] 도 5e에 나타난 바와 같이, ALP가 없는 경우 p-Mito-1이 구형 구조로 유지되고 있음을 확인할 수 있고(좌측 이미지), 0.5 U ALP 및 1 mM H_2O_2와 함께 배양한 후에는 Mito-1 자기조립 섬유 구조와 유사하게 변형되었다(우측 이미지).

[0174] 한편, 비교예 1의 p-Mito-2는 ALP 처리에 의해 탈인산화가 일어나더라도 강한 산화제 없이는 섬유 구조로 자기조립 거동이 일어나지 않음을 확인하였다.

[0176] 동적광산란분석(DLS)을 사용하여 나노구조의 변화를 추가로 모니터링하였고, 그 결과를 도 5f에 나타내었다.

[0177] 도 5f는 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1을 0.5 U ALP 및 1 mM H_2O_2와 함께 배양하기 전과 후의 동적광산란분석(DLS) 결과이다.

[0178] 도 5f에 나타난 바와 같이, p-Mito-1을 0.5 U ALP 및 1mM H_2O_2와 함께 배양 후 약 30nm p-Mito-1 구조가 약 400nm로 증가한 것으로 나타났으며, 이는 Mito-1이 이황화물을 형성한 어셈블리의 크기와 유사하다.

[0180] 제타 포텐셜을 측정하여 나노구조의 변화를 추가로 모니터링하였고, 그 결과를 도 5g에 나타내었다.

[0181] 도 5g는 실시예 1에서 합성한 p-Mito-1을 0.5 U ALP 및 1 mM H_2O_2와 함께 배양하기 전과 후의 제타 포텐셜 측정 결과이다.

[0182] 도 5g에 나타난 바와 같이, 표면 전하는 ALP 처리 전에는 낮은 양전하를 나타내나, ALP 처리 후에는 높은 양전하로 변경되는 것을 확인할 수 있다. 이 결과는 약간의 양전하를 띤 구형 구조의 p-Mito-1이 높은 ALP 활성 및 ROS 수치 조건에서 높은 양전하를 띤 섬유 구조로 자기조립 거동을 나타냄을 시사한다.

[0184] 순 양전하를 띤 나노물질은 정전기적 상호작용으로 인해 음전하를 띤 세포막과 상호작용할 가능성이 높다. 특히, 미토콘드리아 막은 대부분의 세포에서 ~180mV 정도 음전하를 띠기 때문에 양전하를 띤 나노구조가 미토콘드리아 막에 끌리게 된다.

[0185] 따라서, ALP와 ROS가 모두 과발현되는 환경에서만 미토콘드리아 막과 상호작용하는 생리활성 구조를 선택적으로 생성할 수 있을 것으로 기대했다. 이 개념을 조사하기 위해 미토콘드리아 막을 모방한 칼세인 함유 인공 리포솜을 사용하여 미토콘드리아 막과 상호 작용하는 능력을 분석했다. 일반적으로 리포솜에 담지된 칼세인은 소광(quenching) 효과로 인해 형광을 잃게 되지만, 리포솜이 파괴되면 형광이 회복한다.

[0186] 도 5h는 ALP 부재(W/O ALP) 또는 ALP 존재(W/ ALP) 조건에서, 실시예 1의 p-Mito-1 처리 농도에 따른 칼세인(염료) 담지 리포솜에서 칼세인 방출율을 확인한 결과이다. 각 조건에서 1mM H_2O_2와 함께 처리하였다.

[0187] 도 5h에 나타난 바와 같이, ALP 존재(W/ ALP) 하에 5mM p-Mito-1로 처리된 리포솜에서 최대 70%의 칼세인의 빠른 방출이 관찰되었다. 또한, 1mM p-Mito-1로 처리된 리포솜에서 최대 25%의 낮은 누출이 모니터링되었다. 대조적으로, ALP 부재(W/O ALP) 상태에서 5mM p-Mito-1로 처리한 경우에도 리포솜에서 염료(칼세인) 방출이 관찰되지 않았다. 이 결과는 p-Mito-1이 ALP 활성 및 ROS 수치가 모두 높은 상태에서만 미토콘드리아 막과 상호작용하는 양전하를 띤 섬유 구조로 변형됨을 시사한다.

[0189] **<실험예 2> 노화세포에서 ALP 활성 향상 규명**

[0190] 노화는 다양한 내인성 및 외인성 자극에 반응하여 암의 공격적인 발달을 방지하기 위해 세포주기를 정지시키는

자기방어 메커니즘이다. 세포노화는 유익한 생물학적 기능을 가지고 있지만, 노화세포의 축적은 염증과 그에 따른 노화 관련 질병을 유발한다. 특히, 망막 병리 부위의 노화 RPE 세포는 시력 상실을 유발하는 연령 관련 황반변성(AMD)과 관련이 있다. 이러한 노화는 비정상적인 대사 활동, 과발현된 β-갈라토시다제 및 높은 산화 상태를 포함한 다양한 세포 변화 및 뚜렷한 표현형 변화와 관련이 있다. 또한, 노화 세포는 N- 및 O- 연결된 글리코실화 교대로 인해 알칼리성 인산분해효소(ALP)의 활성이 증가한다.

[0191] 이러한 관점에서 ALP 매개 형질전환 시스템이 노화 세포 내부에서만 발생하여 미토콘드리아 기능 장애를 구체적으로 유도할 것으로 예상했다. 이 개념을 명확히 하기 위해, 먼저 노화 세포가 티오포스페이트 분자의 특정 탈인산화 표적이 될 수 있는 ALP의 활성을 증가시켰는지 여부를 조사하였다.

[0192] 세포 내 ALP의 활성은 제조업체의 프로토콜에 따라 평가되었으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0193] 도 6은 정상 RPE 세포 및 노화 RPE 세포 각각의 ALP 활성을 측정한 결과이다.

[0194] 도 6에 나타난 바와 같이, 노화 RPE 세포의 ALP 활성이 정상 RPE 세포의 활성보다 5배 더 큰 것을 확인할 수 있다.

[0196] **<실험예 3> 노화 세포의 미토콘드리아 환경에서 p-Mito-1의 in situ 형질전환 규명**

[0197] 미토콘드리아 내 이황화물 형성이 노화 세포의 미토콘드리아에서 구체적으로 in situ 형질전환을 유도할 수 있는지 조사하기 위해, 100 μM의 p-Mito-1을 24시간 동안 처리한 후 노화 세포에 대해 Cell-TEM 관찰을 수행하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0198] 도 7a는 노화 RPE 세포의 미토콘드리아 형태를 확인한 Cell-TEM 이미지이다.

[0199] 도 7b는 노화 RPE 세포에 실시예 1의 p-Mito-1 처리에 따른 미토콘드리아 형태를 확인한 Cell-TEM 이미지이다.

[0200] 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이, 24시간 배양 후 100μM의 p-Mito-1로 처리한 노화 세포의 TEM 이미지(아래 이미지)를 보면 미토콘드리아가 파괴되고 섬유 구조가 관찰되는 반면에, p-Mito-1 미처리 노화세포에서는 미토콘드리아의 길쭉한 형태가 관찰되었다. 이 결과는 p-Mito-1이 ALP 활성 및 ROS 수준이 상승되어 있는 노화 세포의 미토콘드리아 내부 환경에서 섬유 구조를 구축하여 미토콘드리아의 파괴를 유도할 수 있음을 시사합니다.

[0202] p-Mito-1의 이황화 결합으로 변형된 섬유 구조는 양전하를 띠는 표면을 갖고 있으며, 이는 음전하를 띤 미토콘드리아 막과 강하게 상호작용할 수 있어 미토콘드리아에 심각한 손상을 일으킬 수 있다. 100μM의 p-Mito-1을 24시간 동안 처리한 후 노화 세포의 미토콘드리아 형태를 모니터링하여 형질전환 효과를 조사하였고 그 결과를 도 7c에 나타내었다.

[0203] 도 7c는 시료 처리 24시간 후 Mitotracker로 표지된 노화 세포에서 미토콘드리아 단편화를 관찰한 이미지이다.

[0204] 도 7d는 시료 처리에 따른 미토콘드리아 길이의 정량화 결과를 나타낸 그래프이다.

[0205] 도 7c에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아 단편화 및 부종은 p-Mito-1 처리 세포에서 확인되었으며, 이는 Mito-1 처리와 유사한 효과를 나타냈다. 반면, 대조군에서는 길쭉한 미토콘드리아 형태가 관찰되었다.

[0207] 미토콘드리아 기능 장애는 건강한 미토콘드리아에 대한 JC-1 이량체의 적색 형광과 미토콘드리아 막이 탈분극될 때 JC-1 단량체의 녹색 형광을 방출하는 JC-1 분석을 사용하여 추가로 조사하였고, 이 결과를 도 8에 나타내었다.

[0208] 도 8은 탈분극된 막 아래에서 녹색 형광을 방출하는 JC-1 염료를 사용하여 샘플로 처리된 노화 APRE 세포의 미토콘드리아 탈분극을 관찰한 공초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지이다.

[0209] 도 8에 나타난 바와 같이, 대조군(미처리군) 세포에서 적색 형광을 관찰했지만 p-Mito-1과 Mito-1 처리 세포 모두에서 밝은 녹색 형광이 관찰되었다. 대조적으로, 적색 형광은 p-Mito-2 처리 후에도 초기 상태로 남아 있어, p-Mito-2는 미토콘드리아 막의 파괴를 유도하지 않았다. 이 실험결과는p-Mito-1이 미토콘드리아 막의 파괴를 유도한다는 것을 시사한다.

[0211] 산화 스트레스는 세포 기능의 심각한 손상을 유발할 수 있으므로 미토콘드리아 기능 장애는 세포 사멸 메커니즘의 활성화로 이어진다. p-Mito-1은 노화 세포에 대해 특이적으로 세포 사멸을 유도하는 세놀리틱(senolytic) 효과를 가질 것으로 예상되었다. 이를 조사하기 위해 p-Mito-1과 함께 48시간 동안 배양한 정상 ARPE 세포 및 노화 ARPE 세포에 대해 세포 생존력을 테스트하였고, 그 결과를 도 7e에 나타내었다.

[0212] 도 7e는 정상 세포와 노화 세포 각각에 대한 Mito-1과 p-Mito-1의 IC 50 값을 나타낸 그래프이다.

[0213] 도 7e에 나타난 바와 같이, p-Mito-1은 노화 세포에 대해 ~ 80 μM의 IC50으로 선택적 세포 독성을 보인 반면, 200 μM p-Mito-1 처리에서도 정상 세포에서는 미미한 효과가 관찰되었다. 흥미롭게도, 노화세포에 대해서는 p-Mito-1 및 Mito-1 모두 IC50이 ~80μM으로 유사한 독성을 나타냈으나, 정상세포에 대해서는 p-Mito-1이 Mito-1 대비 훨씬 적은 독성을 나타냈다. 이는 p-Mito-1이 ~4.25의 선택 지수를 갖는 표적 노화 세포에 더 높은 특이성을 갖는 반면, Mito-1은 ~2.18의 낮은 선택 지수를 나타냄을 나타낸다.

[0215] 노화 세포의 선택적 제거를 추가로 조사하기 위해, 노화 세포와 정상 세포 모두에 대한 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 분석하였고, 그 결과를 도 7f에 나타내었다.

[0216] 도 7f는 100 μM의 p-Mito-1과 함께 배양 된 세포 사멸 노화 세포를 보여주는 FACS 분석결과이다.

[0217] 도 7f에 나타난 바와 같이, FACS 분석에 따르면 노화 세포는 100μM의 p-Mito-1 처리 후 24시간 이내에 초기 세포사멸 단계로 진입하는 것으로 나타났습니다. 그러나 정상 세포는 p-Mito-1의 배양 후에도 건강한 상태를 유지하여 p-Mito-1이 노화 세포에 대해 선택적으로 세포 사멸을 유도함을 확인할 수 있다.

[0219] 미토콘드리아 내 형질전환을 거친 노화세포에서 세포사멸 단백질의 발현 정도를 분석함으로써 세포 사멸 기전을 자세히 확인하였고, 그 결과를 도 7g에 나타내었다.

[0220] 도 7g는 100μM의 시료로 처리한 노화 세포에서 세포사멸 관련 단백질(Cytochrome c, Pro-caspase-9, Pro-caspase-3 및 PARP1)의 상대적인 양을 측정한 결과이다.

[0221] 도 7g에 나타난 바와 같이, p-Mito-1의 처리는 Cytochrome c, Pro-caspase-9, Pro-caspase-3 및 PARP1의 발현을 감소시킨다. 반대로, p-Mito-2의 배양은 세포사멸 단백질의 발현 수준에 유의미한 영향을 미치지 않으며, 이는 p-Mito-1이 노화 세포를 향한 세포사멸 신호 전달 경로의 활성화를 선택적으로 유도한다는 것을 시사한다.

[0223] 또한, 정상세포와 노화세포의 혼합에 대한 X-gal 분석을 이용하여 노화세포의 선택적 제거를 광학적으로 확인하였다. 구체적으로, 노화세포와 정상세포를 8:2 비율로 공동 배양한 후, p-Mito-1을 처리하여 SA-β-Galactosidase 양성 세포의 비율을 관찰하였다.

[0224] 도 7h는 다양한 농도의 p-Mito-1 처리 후 노화세포의 제거를 보여주는 SA-β-gal 분석의 광학 이미지이다.

[0225] 도 7i는 다양한 농도의 p-Mito-1 처리 후 SA-β-gal 양성 세포의 백분율을 나타낸 그래프이다.

[0226] 도 7h 및 7i에 나타난 바와 같이, 처음에는 ~ 80%의 세포가 SA-β-갈락토시다제에 양성이었지만, 도 7H에 표시된 대로 p-Mito-1 처리 농도에 비례하여 그 비율이 감소하였다. 도 7I에 표시된 대로 100μM의 p-Mito-1을 처리한 후 노화세포의 비율은 10% 미만으로 낮아졌고, 이는 정상세포와 노화세포가 혼합된 환경에서도 p-Mito-1이 노화세포를 선택적으로 표적할 수 있음을 시사한다.

[0228] **<실험예 4> 노화 세포 제거의 in vivo 평가**

[0229] 노화 세포에 대한 세포 사멸의 선택적 활성화를 고려하면, p-Mito-1이 AMD와 같은 노화 관련 질환에서 노화 세포를 제거하는 세놀리틱스 중 하나로 작용할 수 있을 것으로 기대하였다.

[0230] p-Mito-1이 노화 RPE(retinal pigment epithelium) 세포를 제거할 수 있는지 여부를 조사하기 위해 먼저 노화 마우스 모델을 유도했다. 구체적으로, 수컷 C57BL/6J 마우스(8주령)는 망막하 주사를 통해 비히클(0.4% DMSO/식

염수) 또는 독소루비신(Dox, 일반 식염수 내 0.4% DMSO 내 100 ng/㎕) 1㎕를 투여받았다. 3일차에 Vehicle(식염수, 음성대조군), Mito-1 또는 p-Mito-1(200ng/㎕)을 유리체강 내 주사하였고, 8일차에 안구를 채취하였다(도 9a 참조).

[0231] 도 9a는 B-L에서 실험을 위한 시간 과정의 개략도이다.

[0232] 지도형 위축(Geographic atrophy, GA)은 건성 AMD의 진행된 형태로 간주된다. 따라서 독소루비신이 AMD와 유사한 발병기전을 발달시켰는지 여부를 결정하기 위해 컬러 안저 사진(CFP)과 자가형광 이미징(FAF)을 사용하였다.

[0233] 도 9b는 컬러 안저 이미지(CFP), 안저 자가형광 이미지(FAF), SA-β-gal 염색의 대표 이미지(SA-β-gal)를 나타낸 안저검사 이미지이다(스케일바 200 ㎛).

[0234] 도 9d는 RPE/맥락막 플랫 마운트에서 가장 중요한 노화 지표 중 하나인 SA-β-gal 활성을 정량화하여 나타낸 이미지이다.

[0235] 도 9b에 나타난 바와 같이, 독소루비신이 눈에서 전반적으로 지도형 위축(GA)을 유도하지만 Mito-1 및 p-Mito-1 치료에서는 부분적인 감소가 관찰되었다 (CFP 이미지). 안저 자가형광 이미지(FAF)은 RPE 세포 내에 축적되는 불완전하게 분해된 생성물로 생각되는 리포푸신의 자가형광을 검출한다. Mito-1 및 p-Mito-1 처리에서 리포푸신이 감소한 것을 관찰했는데, 이는 어둡고 저형광 영역으로 나타난다(FAF 이미지).

[0236] 도 9d에 나타난 바와 같이, 더욱이 RPE/맥락막 플랫 마운트에서 가장 중요한 노화 지표 중 하나인 SA-β-gal 활성이 크게 감소하여 Mito-1 및 p-Mito-1이 노화 RPE 세포를 제거하는 것으로 나타났다(SA-β-gal 이미지).

[0238] RPE의 밀착연접(Tight junction) 무결성에 대한 Mito-1 및 p-Mito-1의 효과를 조사하기 위해 Zonula occludens-1(ZO-1)의 위치를 면역조직화학으로 시각화했다. RPE는 단일층의 육각형 과색소침착 세포로 구성되며, 이는 비대해지고, 불규칙한 모양을 가지며, 노화로 인해 파괴된다. 노화 RPE의 회복은 Mito-1 및 p-Mito-1을 면역 염색으로 처리하여 관찰되었으며 유사 색상 이미지로 확인하였고, 그 결과를 도 9c에 나타내었다.

[0239] 도 9c는 ZO-1에 대한 RPE/맥락막 플랫 마운트의 면역형광 염색 이미지이다(스케일바 50 ㎛).

[0240] 도 9e는 Image J를 사용하여 ZO-1의 면역 형광 이미지에서 RPE 영역을 정량화한 결과이다.

[0241] 도 9c에 나타난 바와 같이, 세포 RPE 경계를 묘사하는 밀착연접 단백질인 zonula occludens-1(ZO-1, 녹색)에 대한 확대된 RPE 세포 형태는 Doxorubicin 단독 주사한 Vehicle 군에서 관찰되었으며, Mito-1 및 p-Mito-1 처리군에서 회복되는 것을 확인할 수 있다.

[0243] p-Mito-1의 senolytic 효과를 추가로 조사하기 위해 p16과 p21을 면역 염색하고 RPE/맥락막 플랫 마운트 면역염색에서 p16과 p21의 수준이 극도로 낮아지는 것을 관찰했다.

[0244] 도 9f는 노화 마커 (p16 및 p21, 빨간색) 및 핵에 대한 면역 형광 염색의 공초점 현미경 사진을 Hoechst (파란색)로 대조 염색한 이미지이다(스케일바 50 ㎛).

[0245] 도 9g는 p16 발현 영역의 정량화 결과이다.

[0246] 도 9h는 p21 발현 영역의 정량화 결과이다.

[0247] 도 9f 내지 9h에 나타난 바와 같이, p16 및 p21 발현 영역의 정량화는 Control Vehicle에 비해 Doxorubicin 단독 주사에서 증가하였고 Mito-1 및 p-Mito-1 처리군에서는 감소했다.

[0249] 망막 기능은 RPE에 의존하며 RPE 세포의 노화는 AMD와 같은 연령 관련 퇴행성 질환의 주요 유발 요인이 될 수 있다. 본 발명에서 프로브 개념으로 p-Mito-1 유리체강 내 주입을 통해 노화 RPE 세포의 선택적 절제를 통해 망막 변성을 개선하는 방법을 탐구하였다. p-Mito-1은 노화세포에 대한 세포사멸을 선택적으로 조절함으로써, SA-β-gal(도 9D), ZO-1(도 9E), p16(도 9G) 및 p21(도 9H)과 같은 노화표지자의 발현수준을 감소시키는 유의한 세놀리틱 효과를 나타내었다.

[0250] Mito-1도 비슷한 세놀리틱 효과를 보였지만, in vitro 실험 결과에 따르면 p-Mito-1은 Mito-1보다는 정상세포에 부작용 없이 노화세포에서만 특이적으로 세포사멸을 유도할 것으로 예상된다.

[0253] **<실험예 5> p-Mito-1와 Mito-1의 독성시험 결과 비교**

[0254] p-Mito-1 와 Mito-1를 정상 마우스 안구내에 단회 투여하여, 포스페이트 작용기가 첨가된 p-Mito-1 가 Mito-1 대비 안전성을 확보할 수 있을지 확인하기 위해 독성시험을 수행하였다.

[0255] 구체적으로, 수컷 C57BL/6J 마우스(8주령)에 Vehicle(식염수 1㎕, 음성대조군), Mito-1 (200ng/㎕) 또는 p-Mito-1 (200ng/㎕)을 그룹당 3마리씩 오른쪽 안구 유리체강 내 주사하였고, 14일차에 안구를 채취하였다. 안구 검사는 14일차에 산동제 (Mydrin-P, Santen Pharmaceutical Co., Japan)를 투여하고, slit lamp biomicroscope (SL-17, KOWA Co., Japan)와 ophthalmoscope (GENESIS-D, Kowa Co. Ltd., Japan or Epicam V, Epipole, UK)를 통해 수행하였다. 각 그룹에서 마우스의 사망률을 표 1, 체중 변화를 표 2, 14일차 안구를 조사한 결과를 표 3에 나타내었다.

표 1

[0257]

실험군	1일차	7일차	14일차	최종
식염수	0	0	0	0/3
Mito-1	0	0	0	0/3
p-Mito-1	0	0	0	0/3

표 2

[0259]

실험군	1일차	7일차	14일차
식염수	3마리 평균: 23.7 표준편차: 1.5	3마리 평균: 25.1 표준편차: 1.2	3마리 평균: 27.3 표준편차: 2.1
Mito-1	3마리 평균: 24.2 표준편차: 1.5	3마리 평균: 26.1 표준편차: 1.7	3마리 평균: 26.5 표준편차: 1.9
p-Mito-1	3마리 평균: 23.4 표준편차: 2.2	3마리 평균: 25.5 표준편차: 1.5	3마리 평균: 26.2 표준편차: 1.3

표 3

[0261]

실험군	수정체 불투명도	안구내 손상부위	유리체의 염증 세포 발생	망막의 염증세포 발생
식염수	총 3마리 중 영향 없음: 3 약한 불투명: 0 심한 불투명: 0	총 3마리 중 정상: 3 비정상: 0	총 3마리 중 영향 없음: 3 약한 염증 발생: 0 심한 염증 발생: 0	총 3마리 중 영향 없음: 3 약한 염증 발생: 0 심한 염증 발생: 0
Mito-1	총 3마리 중 영향 없음: 1 약한 불투명: 2 심한 불투명: 0	총 3마리 중 정상: 3 비정상: 0	총 3마리 중 영향 없음: 0 약한 염증 발생: 2 심한 염증 발생: 1	총 3마리 중 영향 없음: 0 약한 염증 발생: 2 심한 염증 발생: 1

p-Mito-1	총 3마리 중 영향 없음: 3 약한 불투명: 0 심한 불투명: 0	총 3마리 중 정상: 3 비정상: 0	총 3마리 중 영향 없음: 2 약한 염증 발생: 1 심한 염증 발생: 0	총 3마리 중 영향 없음: 3 약한 염증 발생: 0 심한 염증 발생: 0

[0263] 표 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, 모든 그룹에서 사망한 동물이 없음을 확인하였으며, 모든 그룹의 마우스에서 급격한 몸무게 변화가 없음을 확인하였다.

[0264] 표 3에 나타난 바와 같이, 14일차 안구를 조사했을 때, p-Mito-1 투여 대비 Mito-1 투여 그룹의 안구내 유리체와 망막 조직에서 현저한 염증이 발생함을 확인하였다.

[0265] 이는 Mito-1에 포스페이트 작용기를 첨가한 p-Mito-1이 노화 세포 선택적 사멸 효능 및 황반변성 마우스 모델에서의 약물 효력을 보유하는 동시에, Mito-1 약물의 안구 독성을 낮춰주는 효과를 가짐을 의미한다.

[0267] **약제의 제조예**

[0268] 본 발명에 따른 유효물질은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 유효물질을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0270] **<약제 제조예 1> 산제의 제조**

[0271] 유효물질 2 g

[0272] 유당 1 g

[0273] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0275] **<약제 제조예 2> 정제의 제조**

[0276] 유효물질 100 mg

[0277] 옥수수전분 100 mg

[0278] 유 당 100 mg

[0279] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0280] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0282] **<약제 제조예 3> 캡슐제의 제조**

[0283] 유효물질 100 mg

[0284] 옥수수전분 100 mg

[0285] 유 당 100 mg

[0286] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0287] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0289] **<약제 제조예 4> 주사제의 제조**

[0290] 유효물질 10 ㎍/㎖

[0291] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지

[0292] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ㎖

[0293] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명에 따른 유효물질을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ㎖ 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120 ℃에서 15 분 이상 오토클래이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0295] **<약제 제조예 5> 경비흡수제 (Nasal spray)의 제조**

[0296] 유효물질 1.0 g

[0297] 아세트산나트륨 0.3 g

[0298] 메틸파라벤 0.1 g

[0299] 프로필파라벤 0.02 g

[0300] 염화나트륨 적량

[0301] HCl 또는 NaOH pH 조정 적량

[0302] 정제수 적량

[0303] 통상의 경비흡수제의 제조방법에 따라, 염수 (0.9% NaCl, w/v, 용매는 정제수) 1 mL당 유효물질 3 mg이 포함되도록 제조하고, 이를 불투명한 스프레이 용기에 충진하고 멸균시켜 경비흡수제를 제조하였다.

[0305] **<약제 제조예 6> 액제의 제조**

[0306] 유효물질 100 mg

[0307] 이성화당 10 g

[0308] 만니톨 5 g

[0309] 정제수 적량

[0310] 통상의 액제의 제조방법에 따라, 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체 100 mL로 조절한 후 갈색 병에 충진하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0312] **건강식품의 제조예**

[0313] 본 발명에 따른 유효물질은 목적에 따라 여러 형태의 건강식품으로 제조 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 유효물질을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 건강식품의 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0315] **<건강식품 제조예 1> 유제품(dairy products)의 제조**

[0316] 본 발명의 유효물질 0.01-1 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0318] **<건강식품 제조예 2> 선식의 제조**

[0319] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 본 발명의 유효물질을 진공 농축기에서 감압농축하고 건조분말을 얻었다. 상기에서 제조

한 곡물류, 종실류 및 유효물질의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0320] 곡물류(현미 34 중량부, 율무 19 중량부, 보리 20 중량부),

[0321] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0322] 유효물질 (2 중량부),

[0323] 영지(1.5 중량부), 및

[0324] 지황(1.5 중량부).

[0326] **건강기능식품의 제조예**

[0327] 본 발명에 따른 유효물질은 목적에 따라 여러 형태의 건강기능식품으로 제조 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 유효물질을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 건강기능식품의 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0329] **<건강기능식품 제조예 1> 건강기능식품의 제조**

[0330] 유효물질 100 mg

[0331] 비타민 혼합물 적량

[0332] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[0333] 비타민 E 1.0 mg

[0334] 비타민 B1 0.13 mg

[0335] 비타민 B2 0.15 mg

[0336] 비타민 B6 0.5 mg

[0337] 비타민 B12 0.2 μg

[0338] 비타민 C 10 mg

[0339] 비오틴 10 μg

[0340] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0341] 엽산 50 μg

[0342] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0343] 무기질 혼합물 적량

[0344] 황산제1철 1.75 mg

[0345] 산화아연 0.82 mg

[0346] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0347] 제1인산칼륨 15 mg

[0348] 제2인산칼슘 55 mg

[0349] 구연산칼륨 90 mg

[0350] 탄산칼슘 100 mg

[0351] 염화마그네슘 24.8 mg

[0352] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능성 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능성 식품 제조방법에 따라 상기의

성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능성 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0354] **<건강기능식품 제조예 2> 건강 기능 음료의 제조**

[0355] 유효물질 100 mg

[0356] 구연산 100 mg

[0357] 올리고당 100 mg

[0358] 매실농축액 2 mg

[0359] 타우린 100 mg

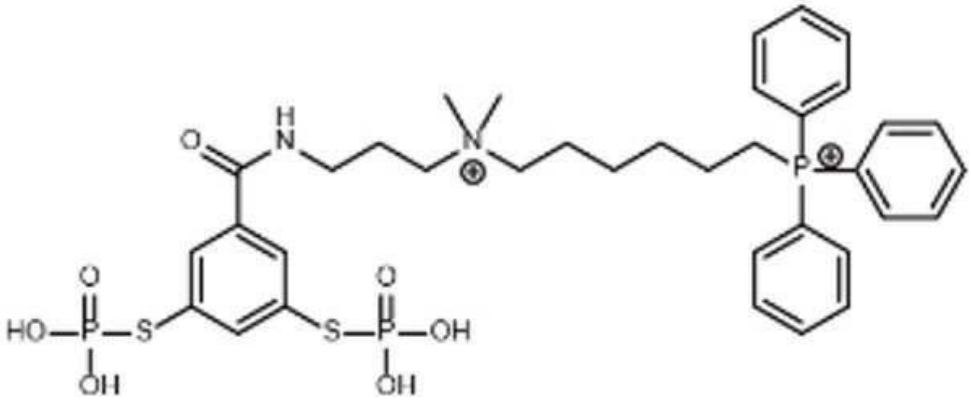
[0360] 정제수를 가하여 전체 500 mL

[0361] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

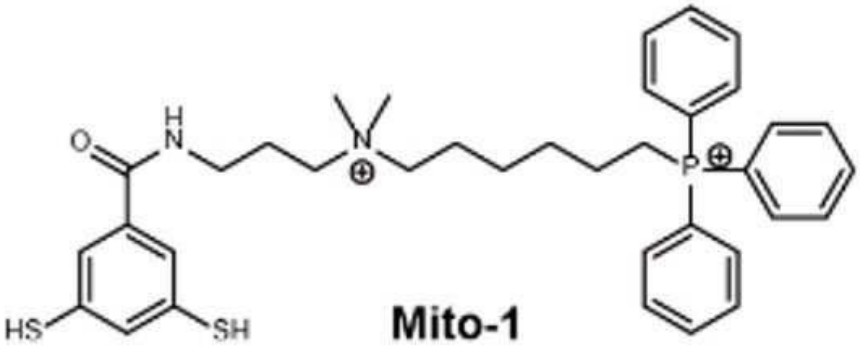
[0363] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특히 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1

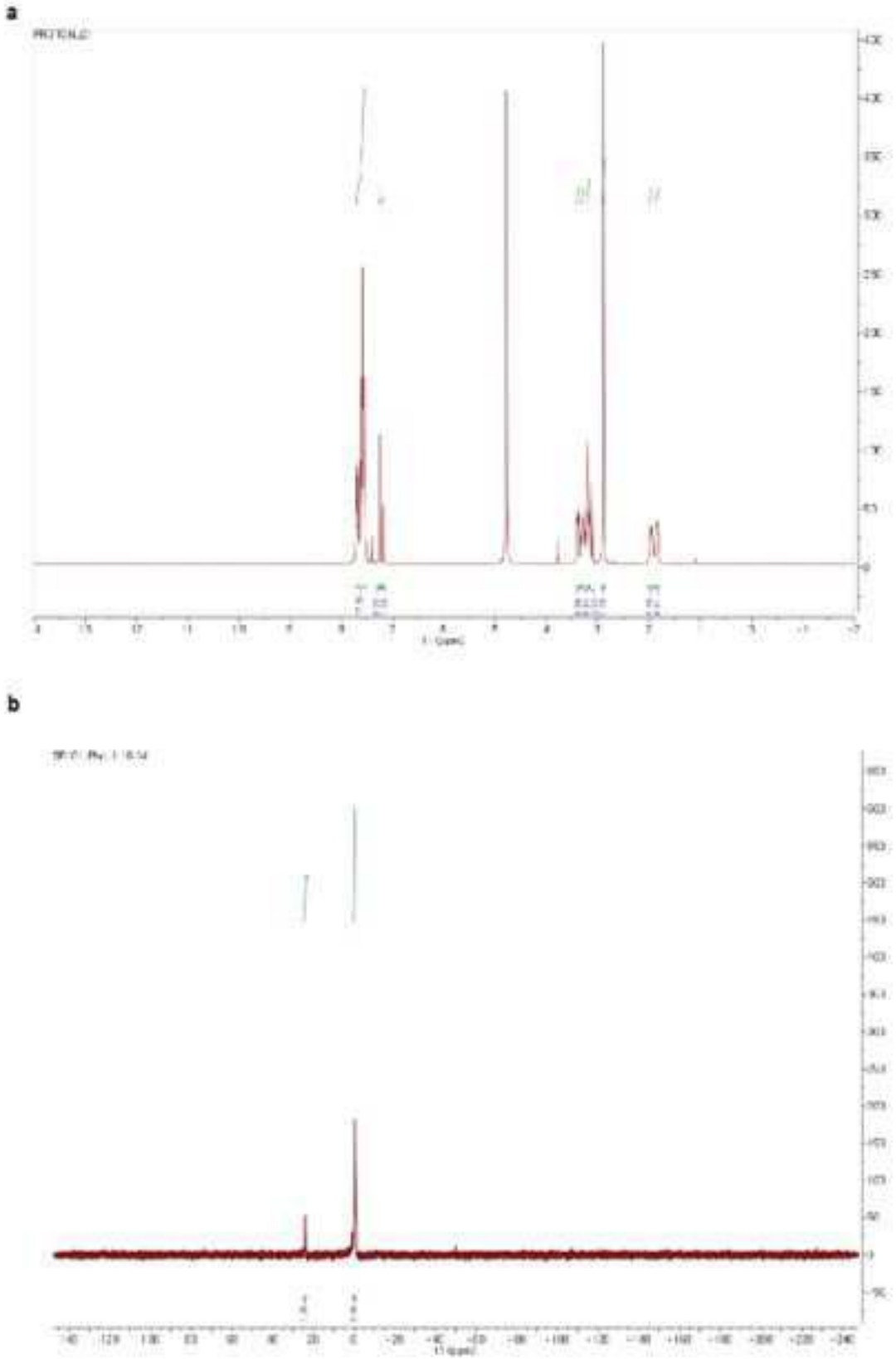


p-Mito-1

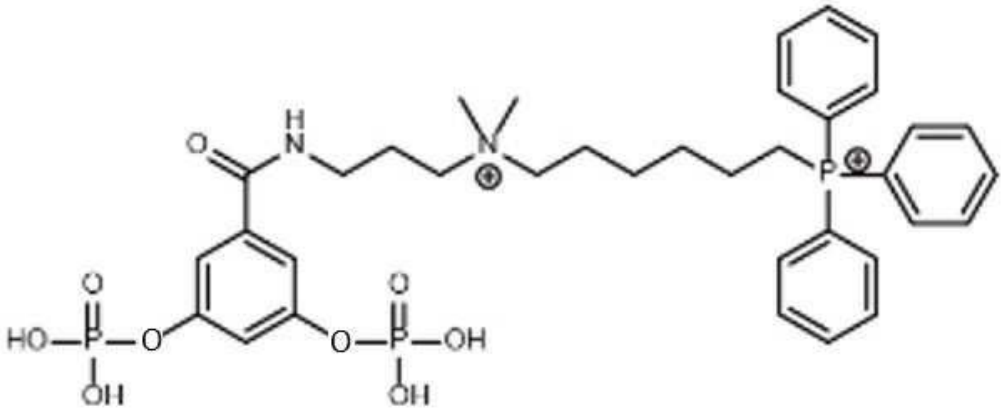


Mito-1

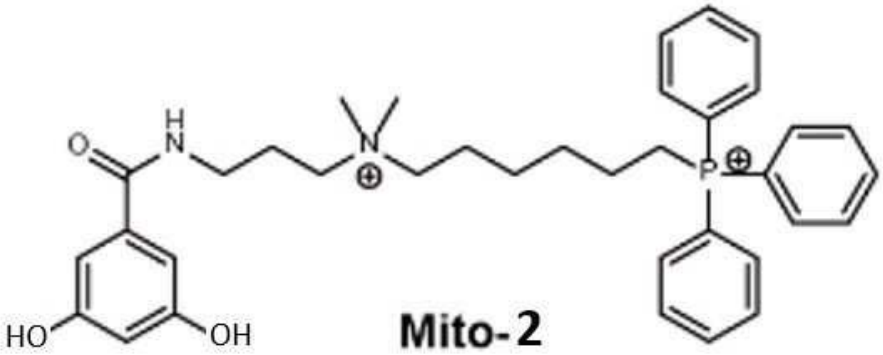
도면2



도면3

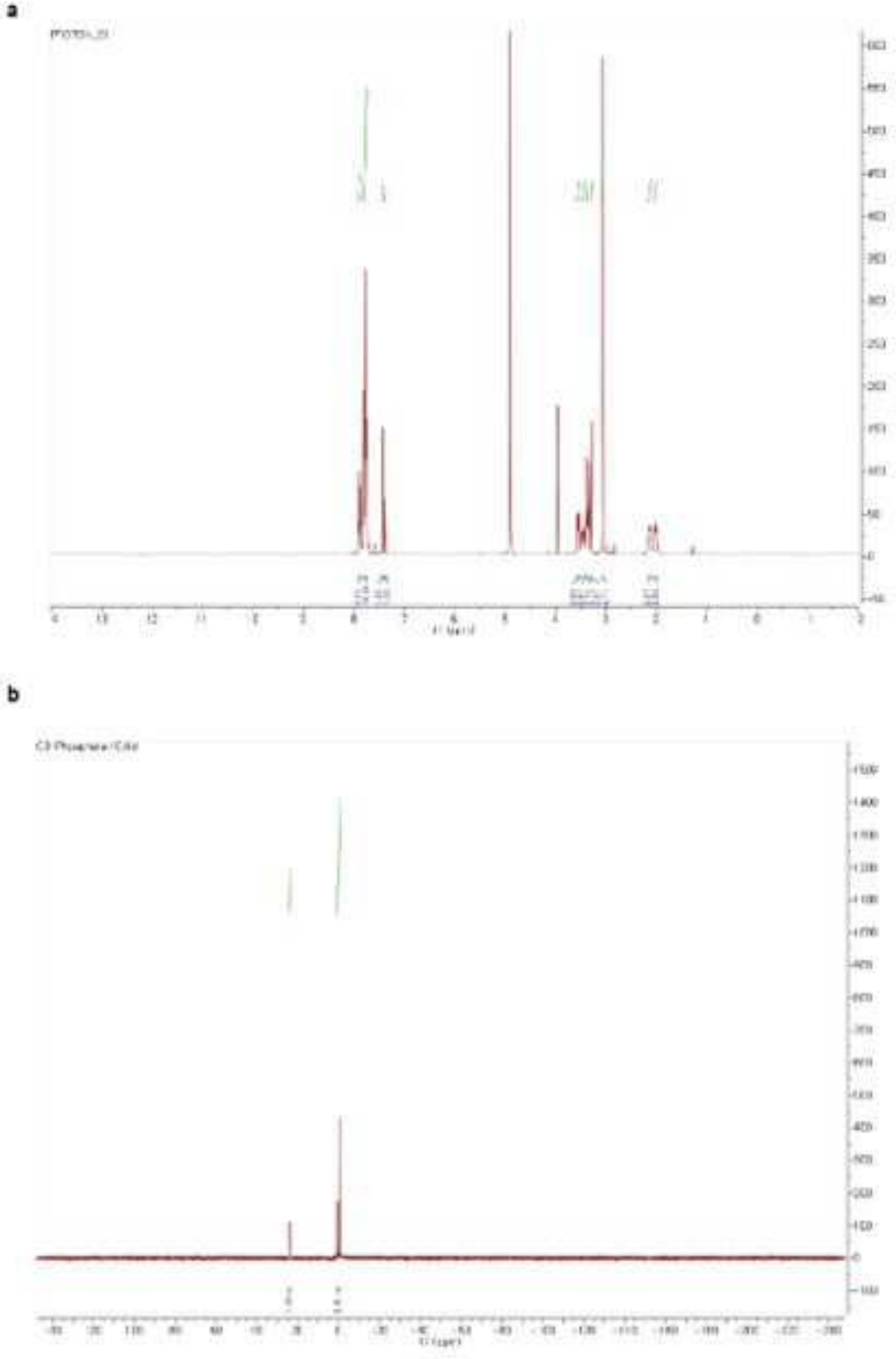


p-Mito-2



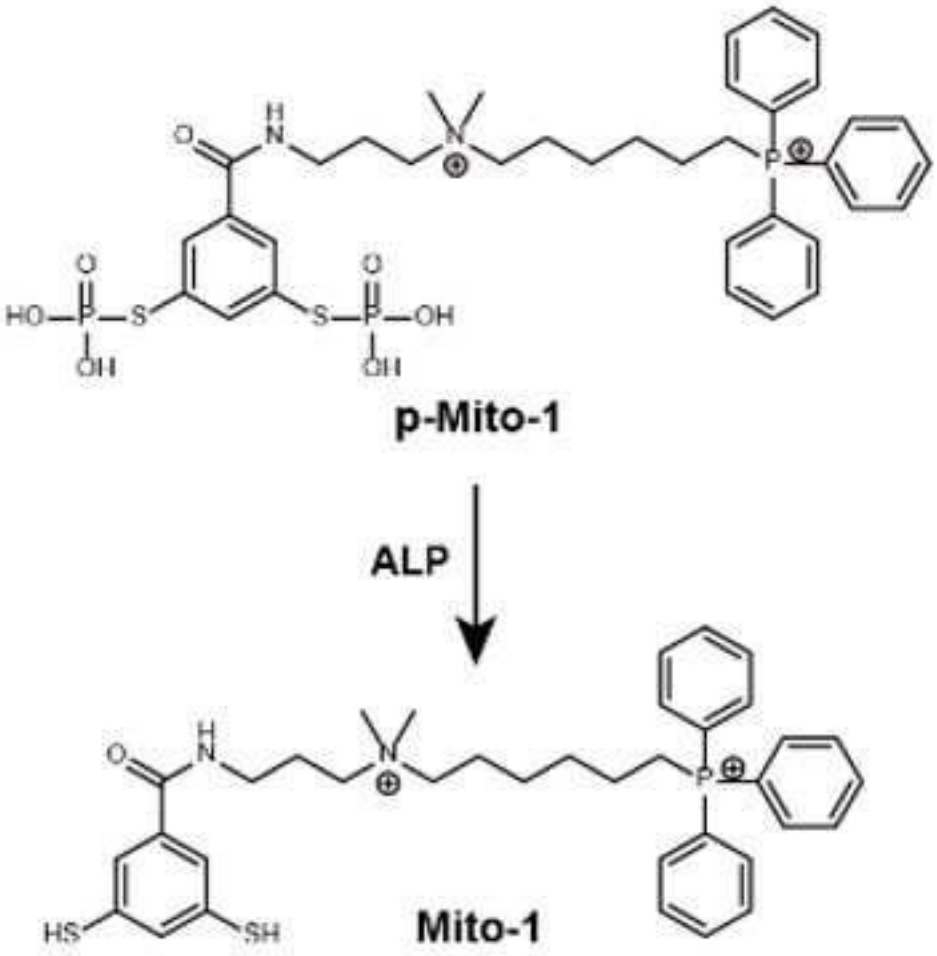
Mito-2

도면4

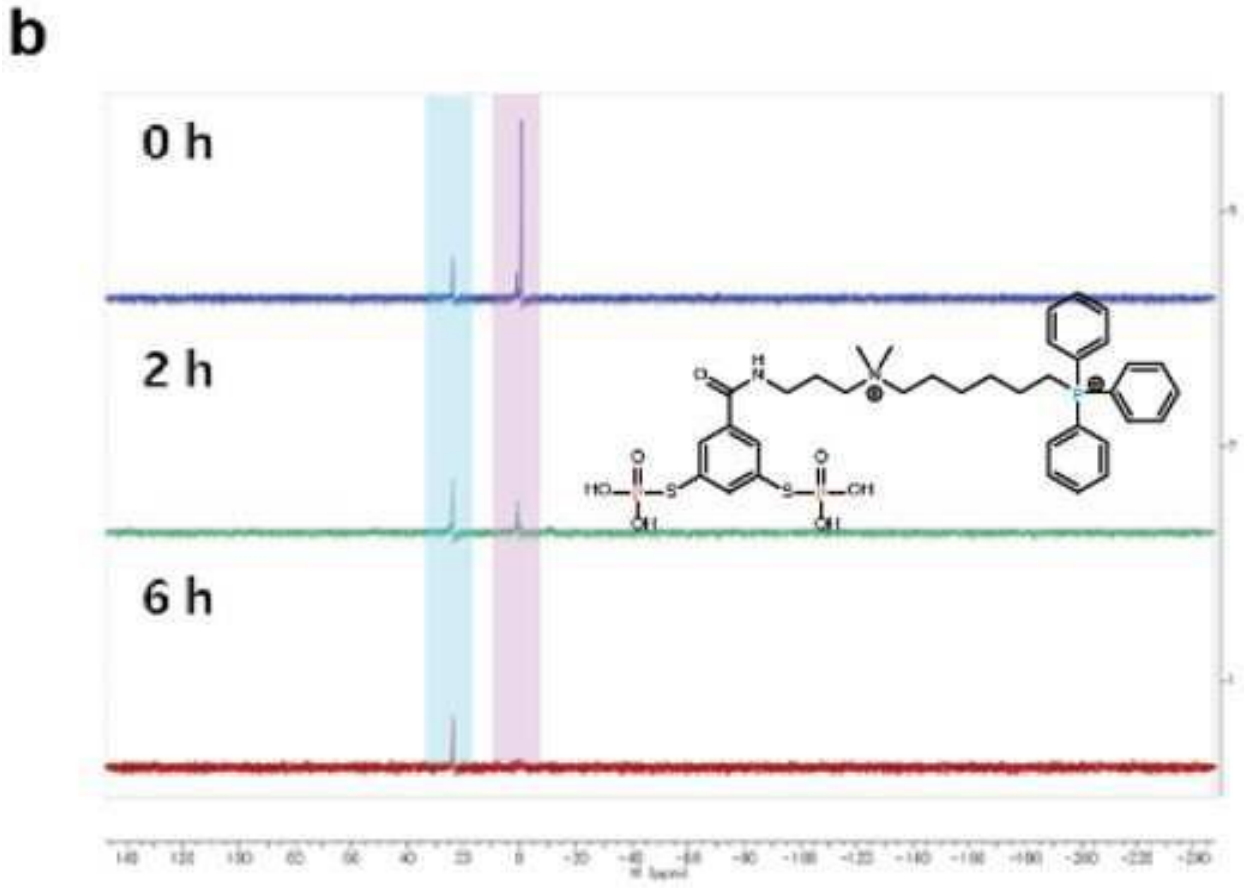


도면5a

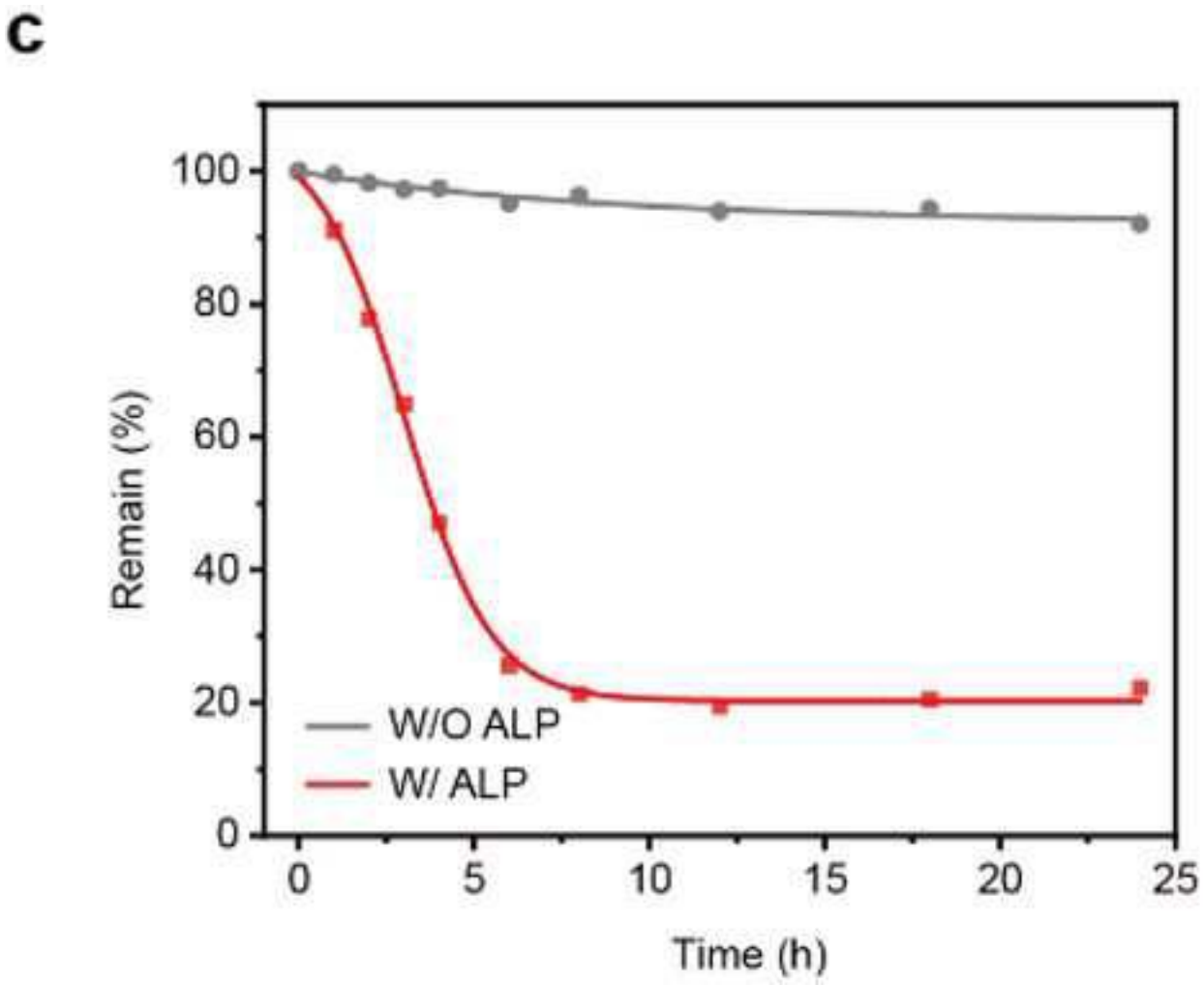
a



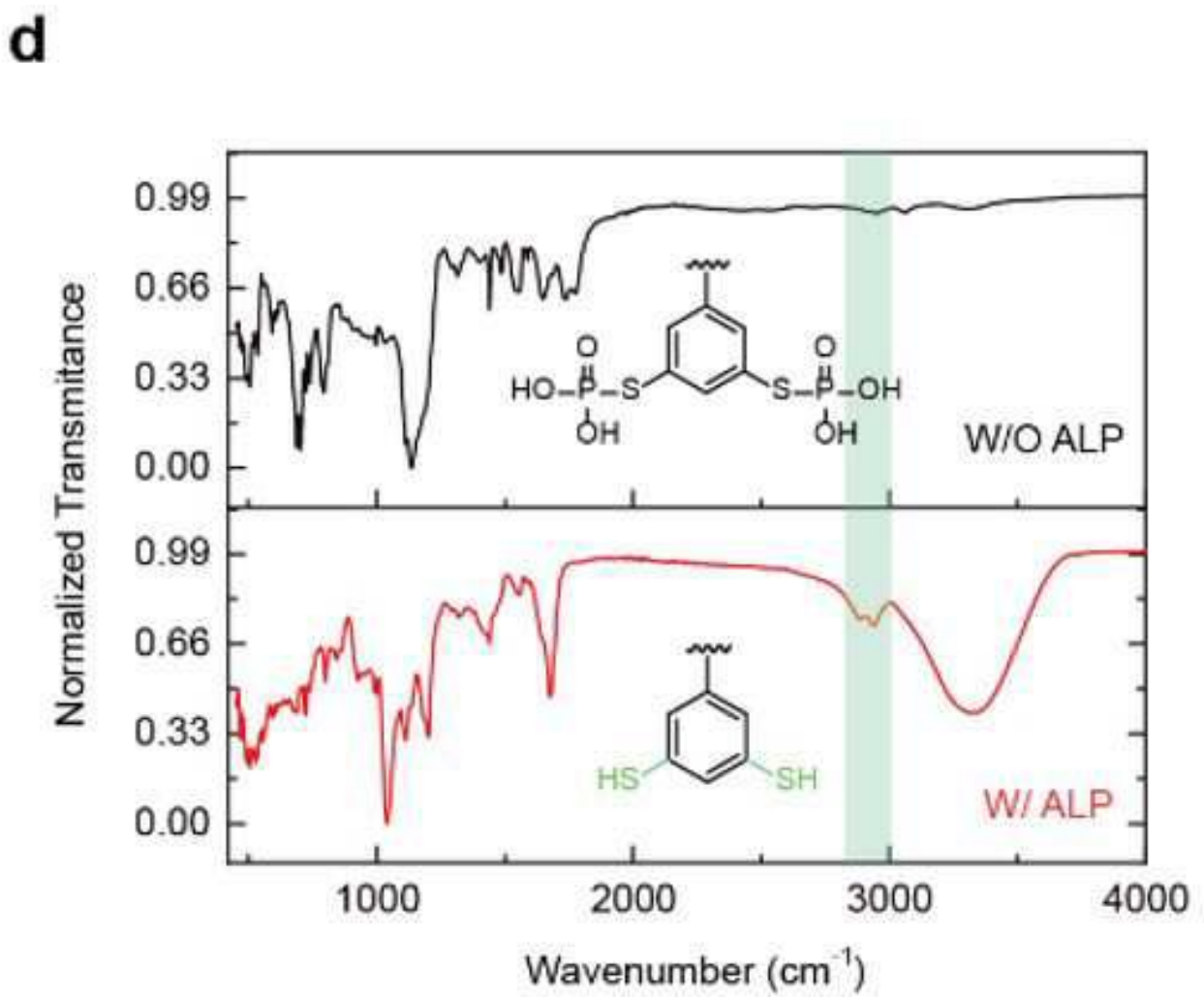
도면5b



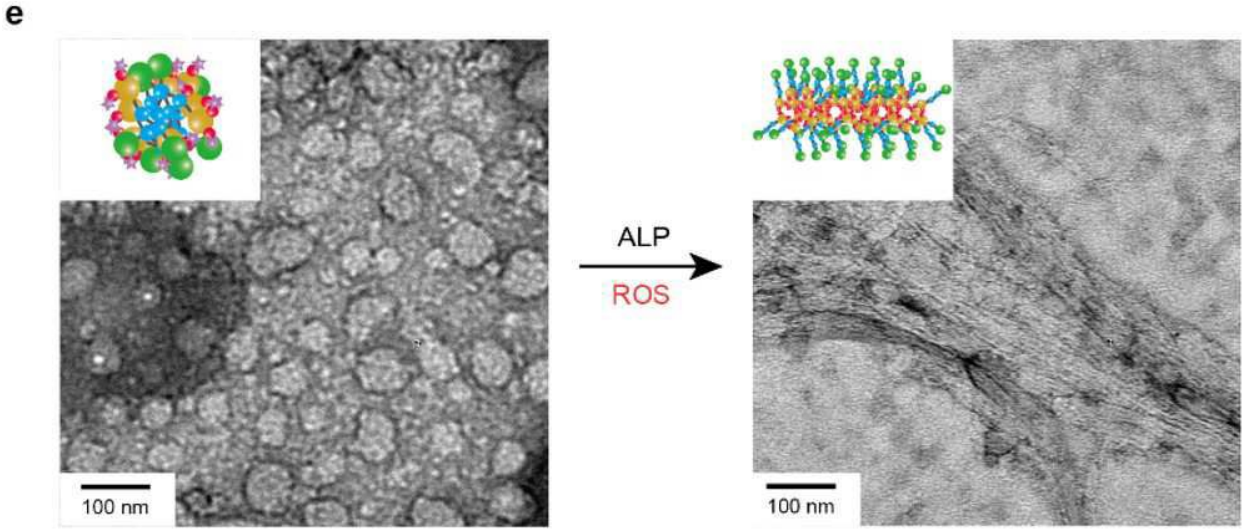
도면5c



도면5d

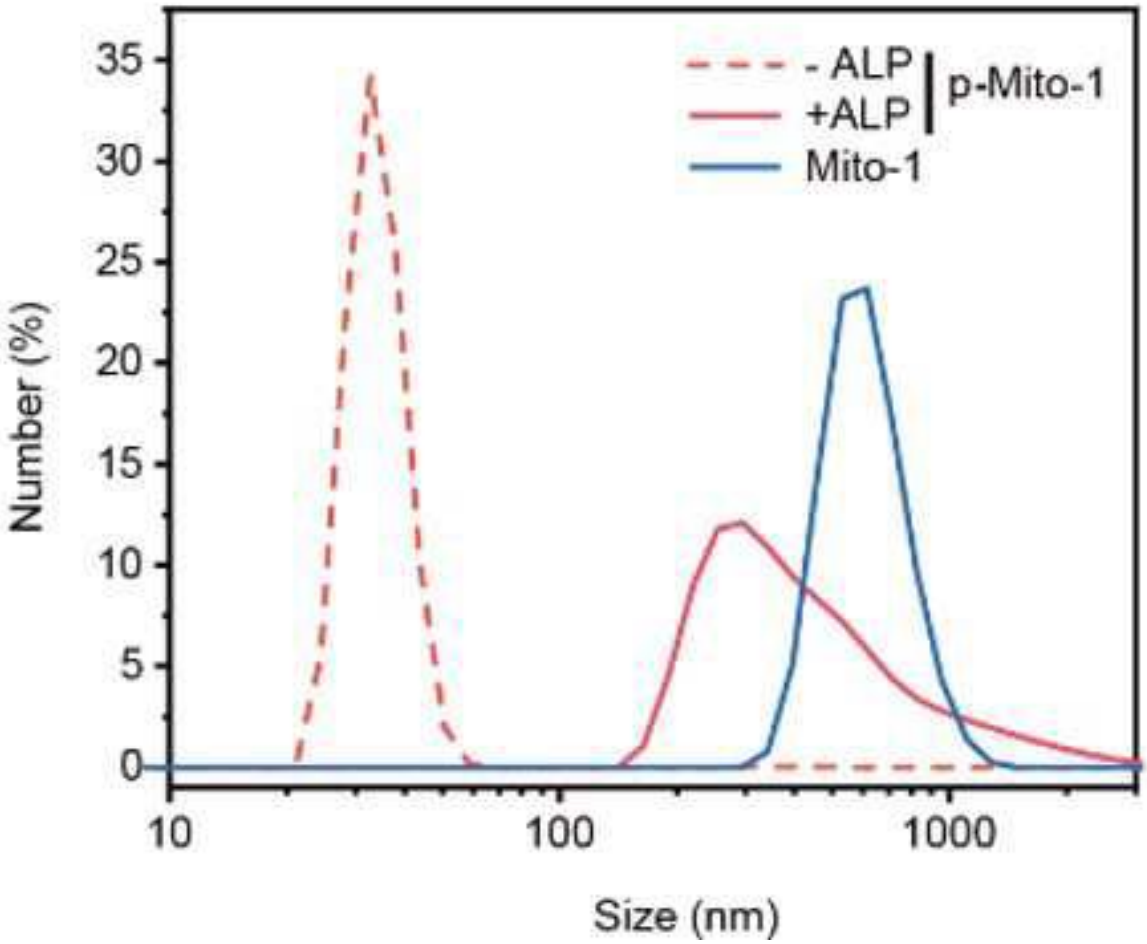

d
Normalized Transmitance
0.99
0.66
0.33
0.00
W/O ALP
HO–P–S
OH
S–P–OH
W/ ALP
HS
SH
1000
2000
3000
4000
Wavenumber (cm-1)

도면5e

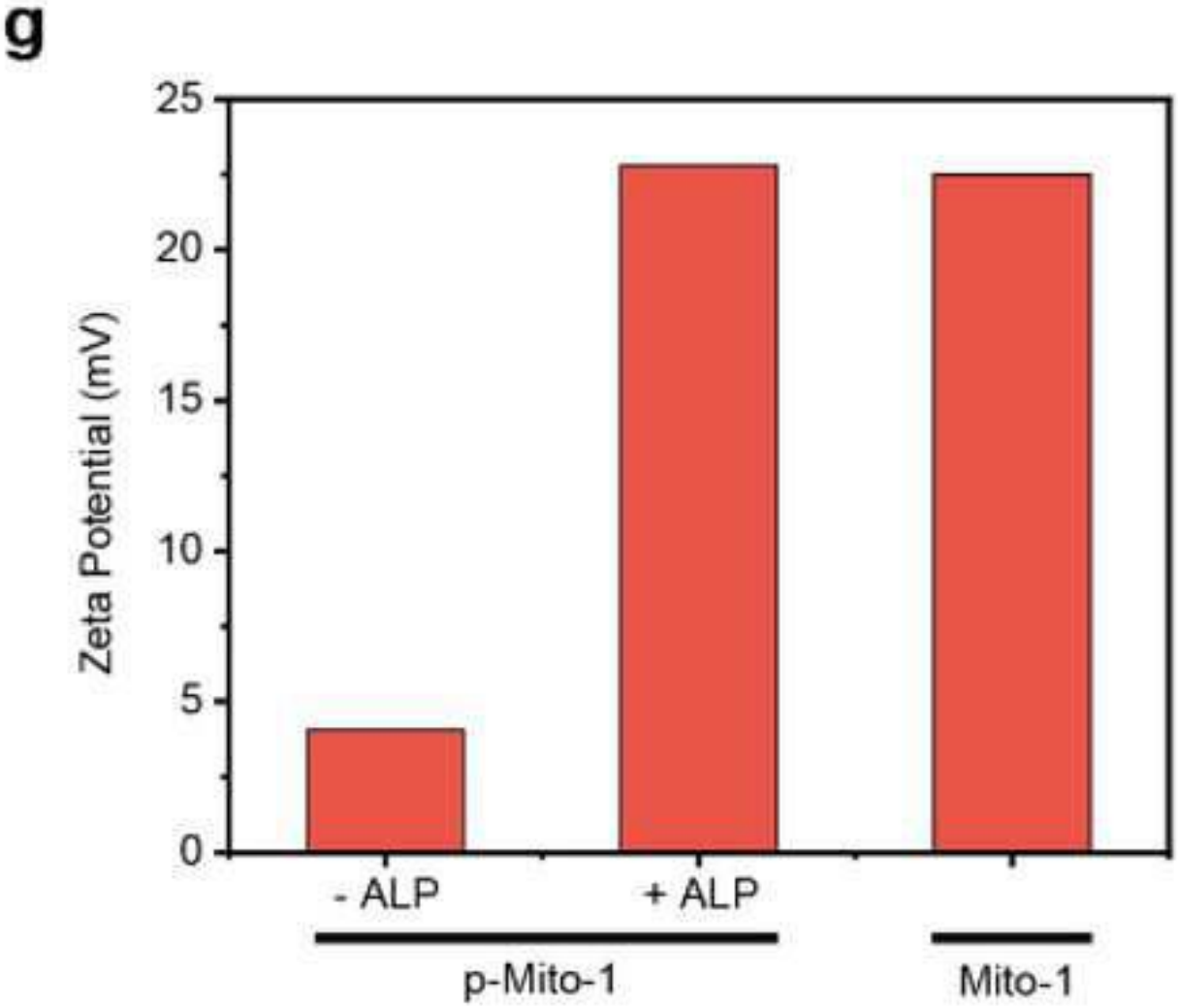

e
100 nm
ALP
ROS
100 nm

도면5f

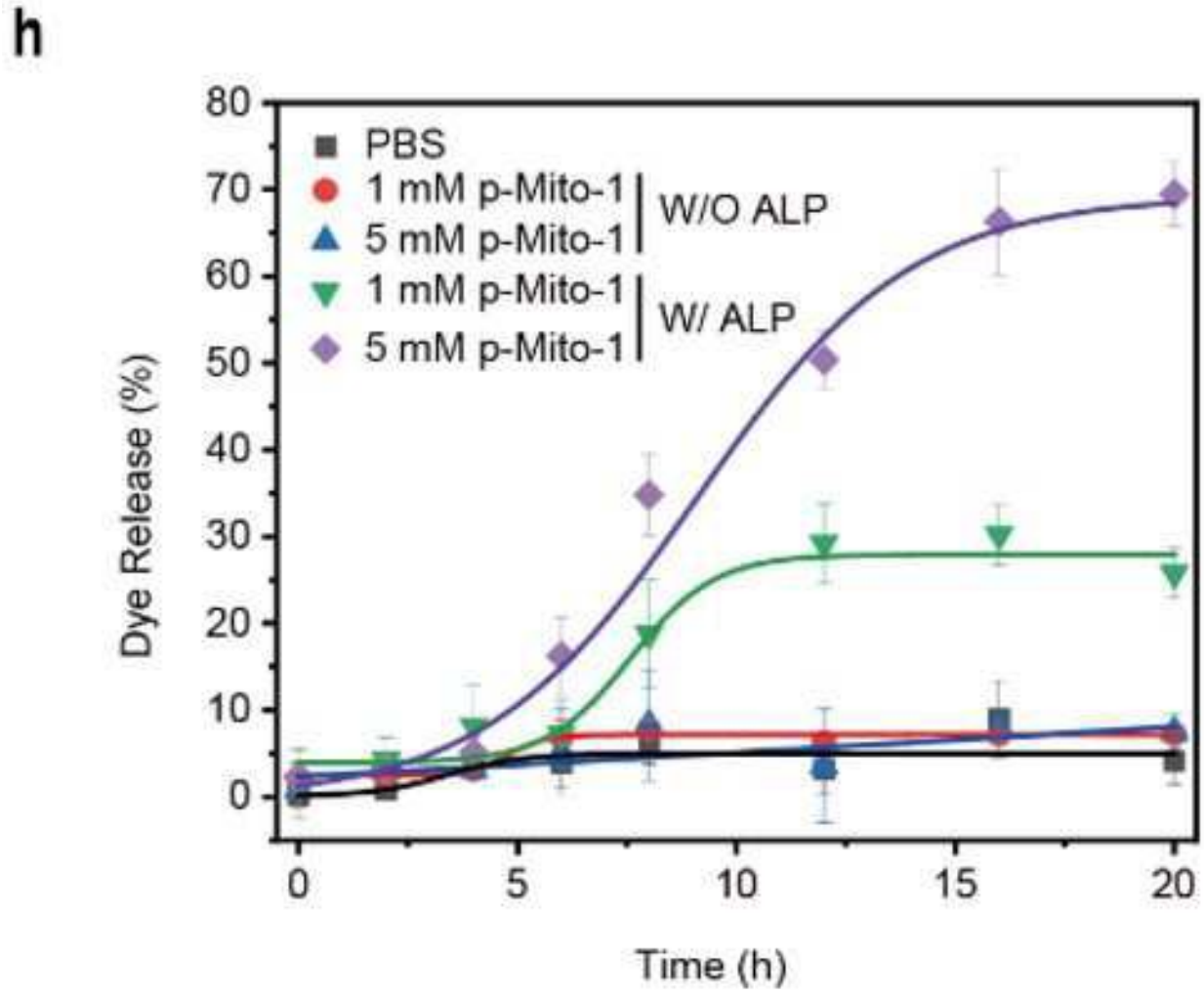
f


- ALP
+ALP
Mito-1
p-Mito-1
Number (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
10
100
1000
Size (nm)

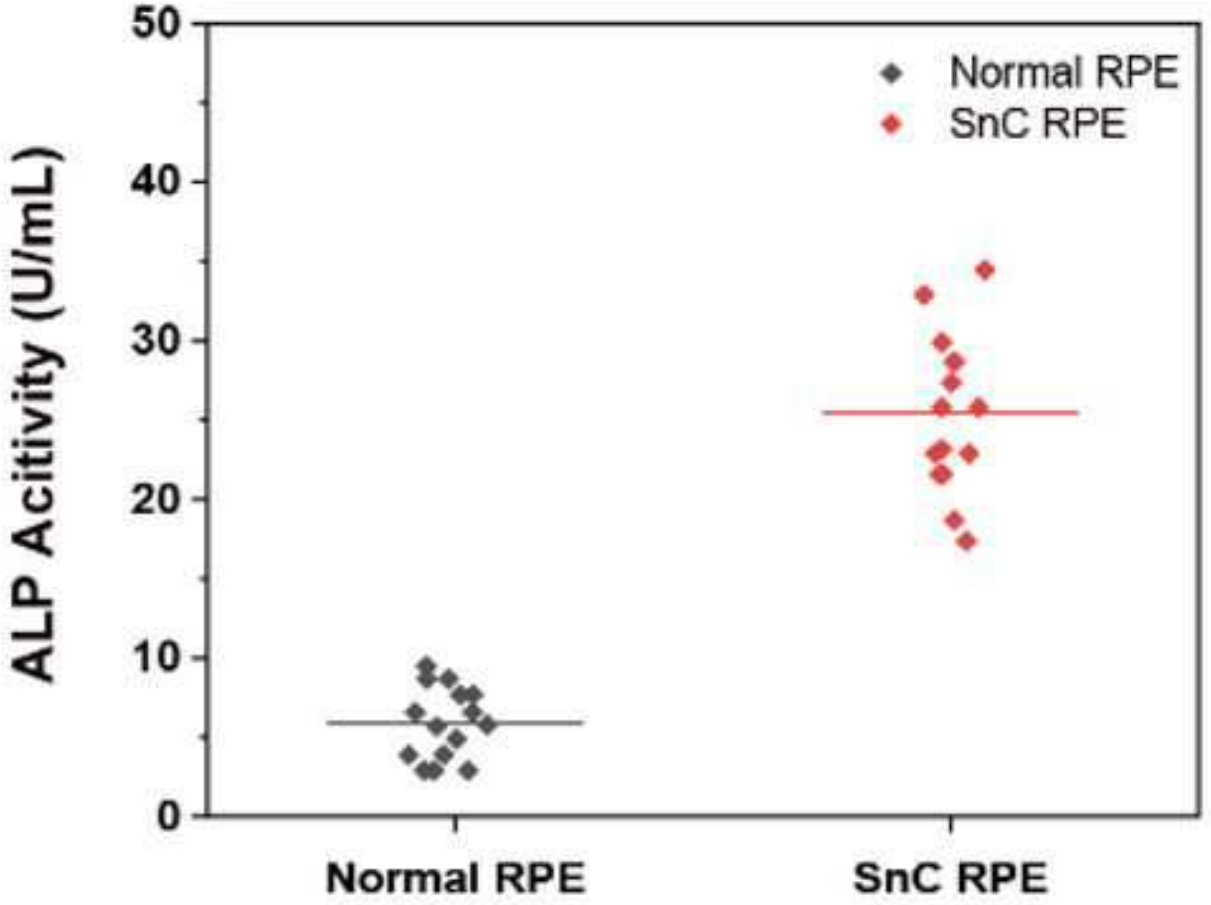
도면5g



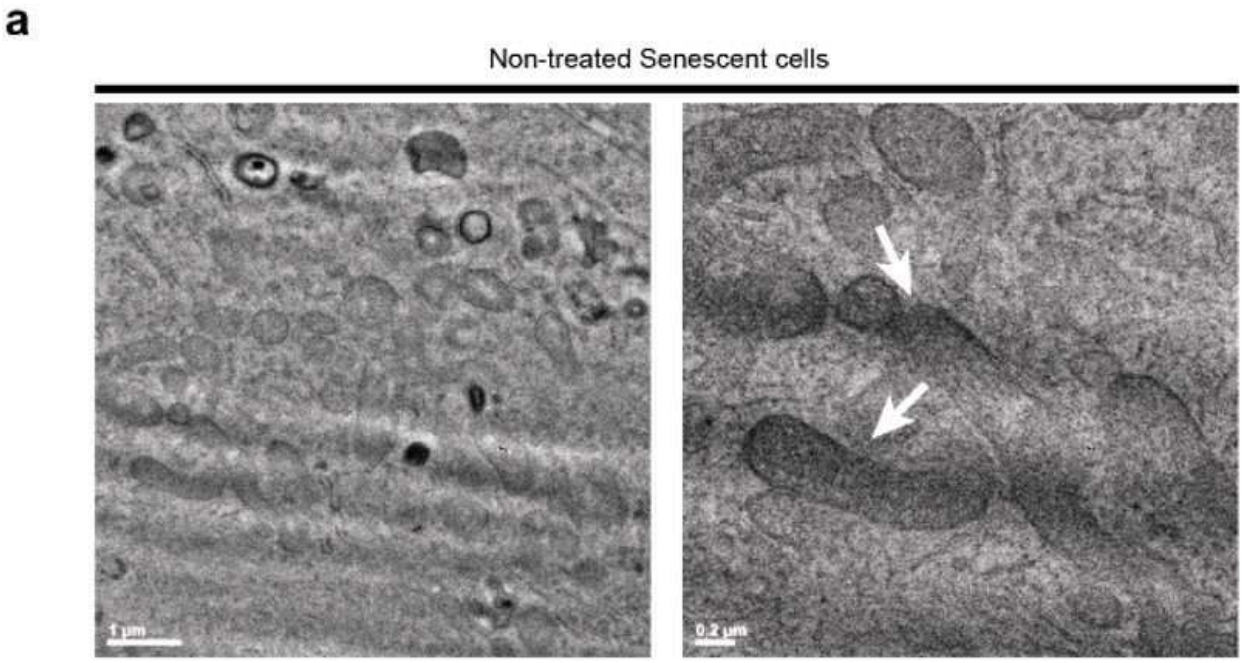
도면5h


h
PBS
1 mM p-Mito-1
5 mM p-Mito-1
W/O ALP
1 mM p-Mito-1
5 mM p-Mito-1
W/ ALP
Dye Release (%)
Time (h)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
0
5
10
15
20

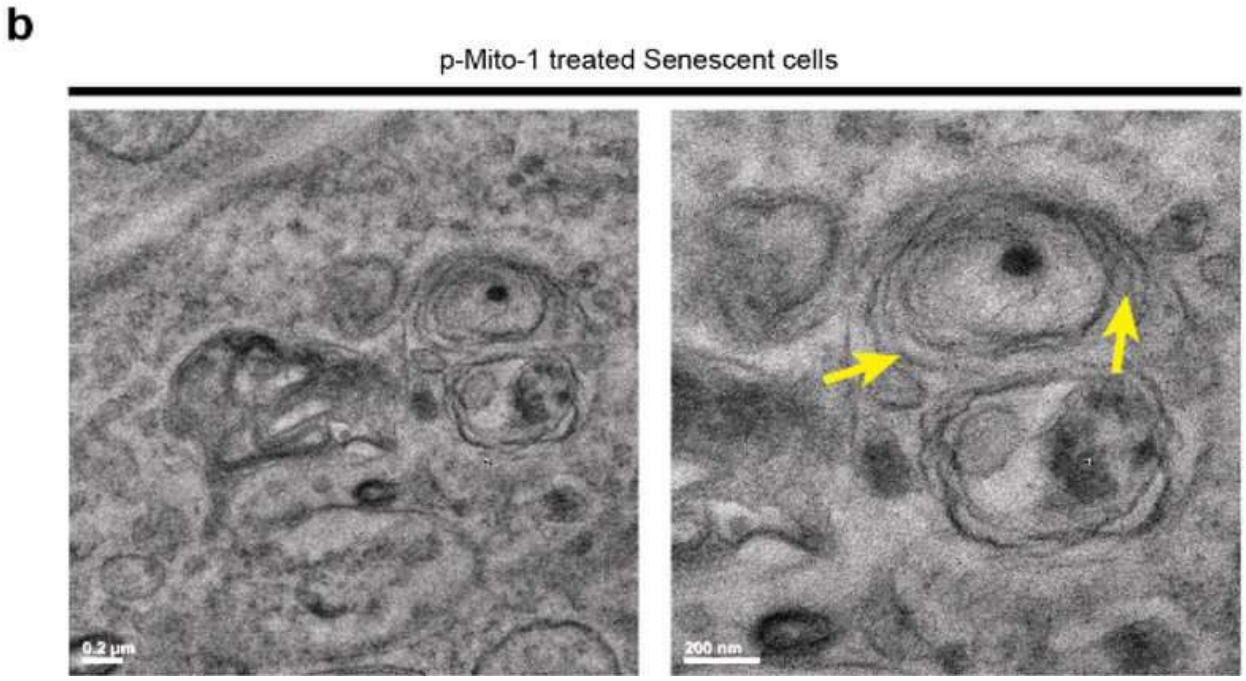
도면6


50
40
30
20
10
0
ALP Acitivity (U/mL)
Normal RPE
SnC RPE
Normal RPE
SnC RPE

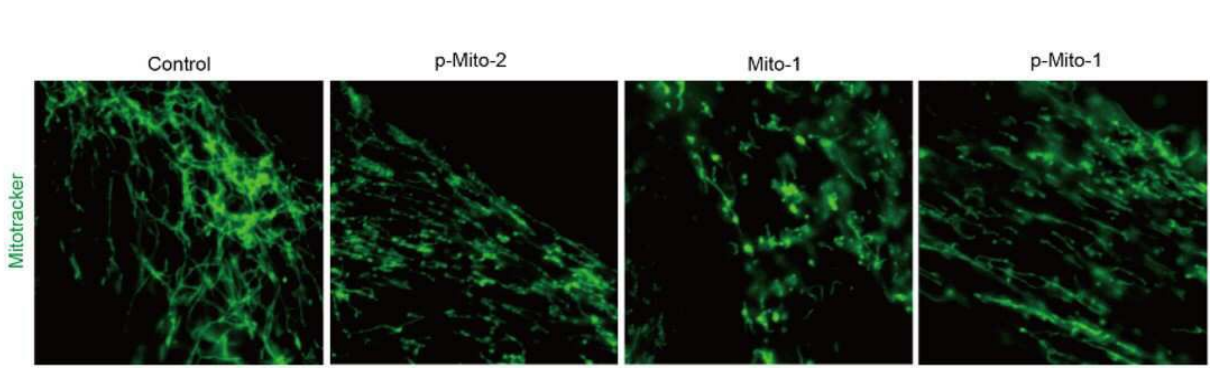
도면7a


a
Non-treated Senescent cells

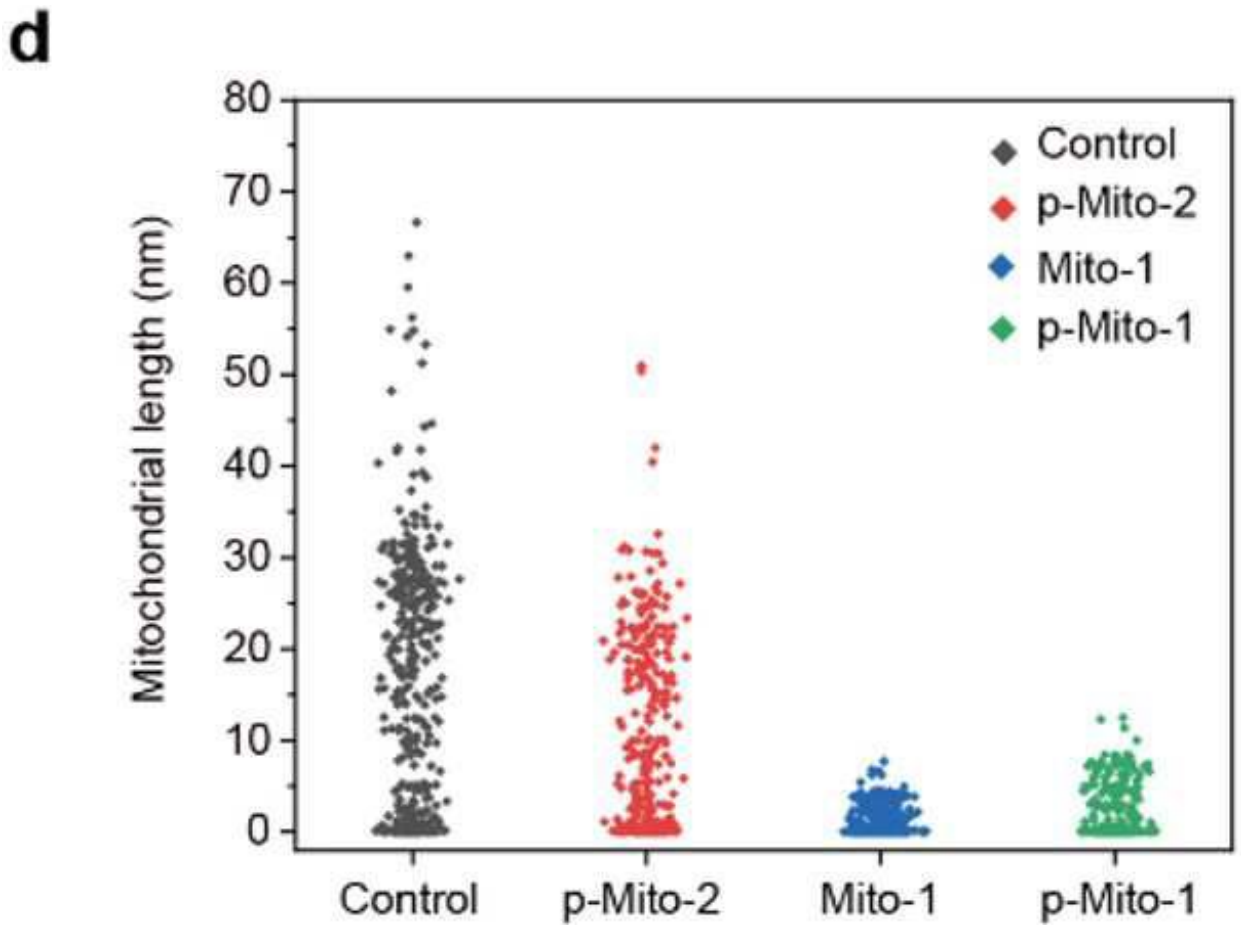
도면7b


b
p-Mito-1 treated Senescent cells
0.2 μm
200 nm

도면7c

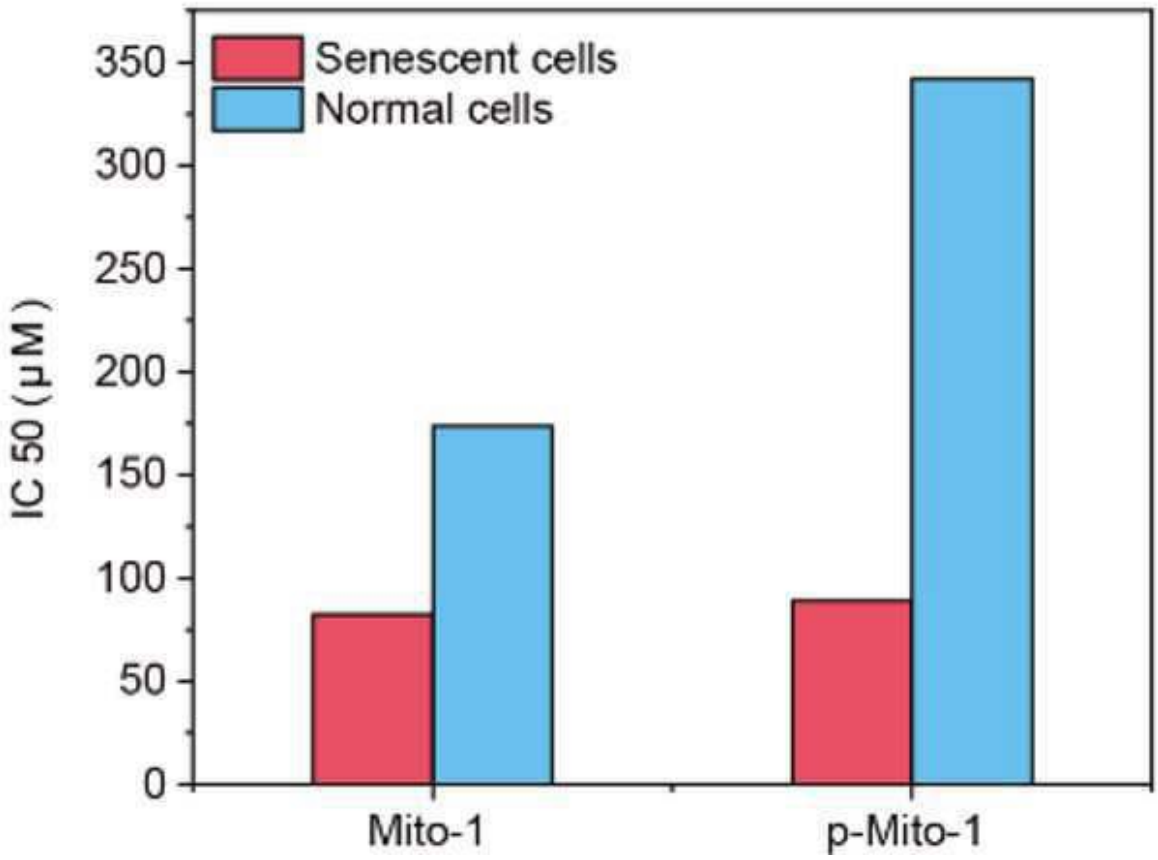

c
Control
p-Mito-2
Mito-1
p-Mito-1
Mitotracker

도면7d


d
Mitochondrial length (nm)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
p-Mito-2
Mito-1
p-Mito-1
Control
p-Mito-2
Mito-1
p-Mito-1

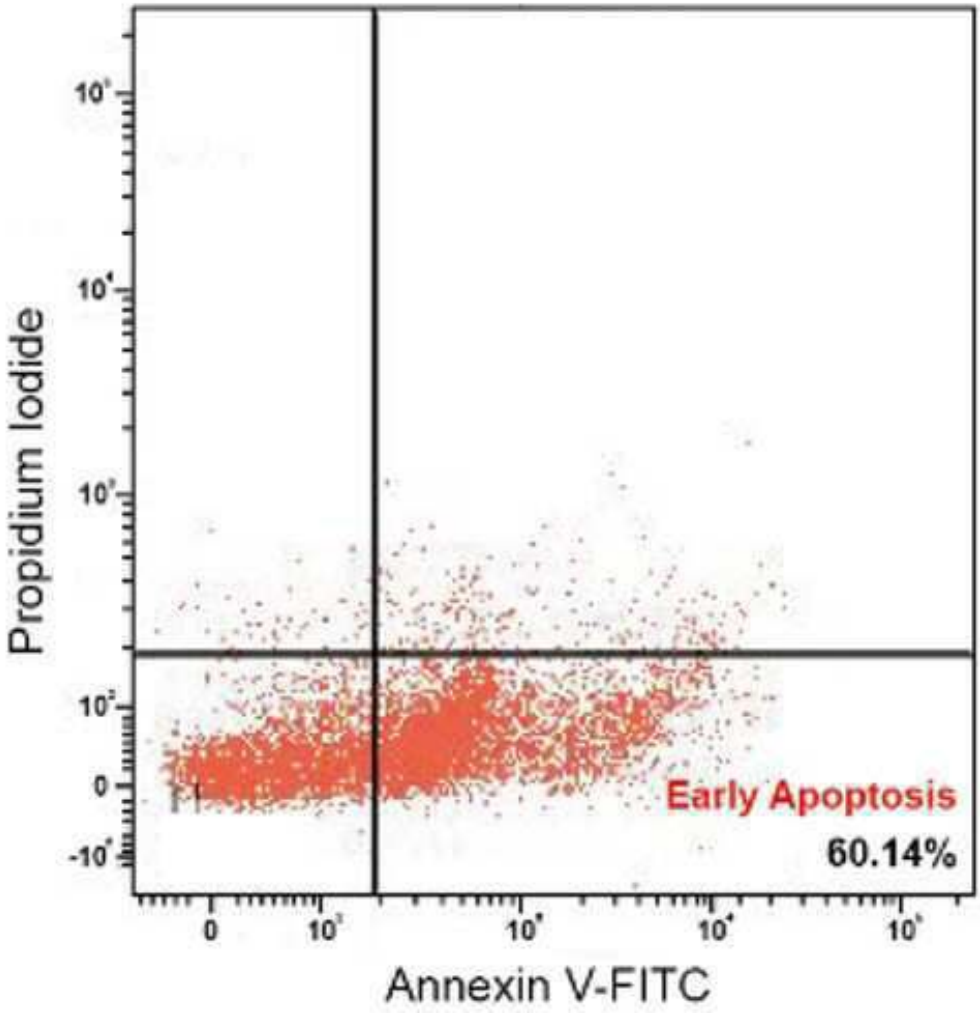
도면7e

e

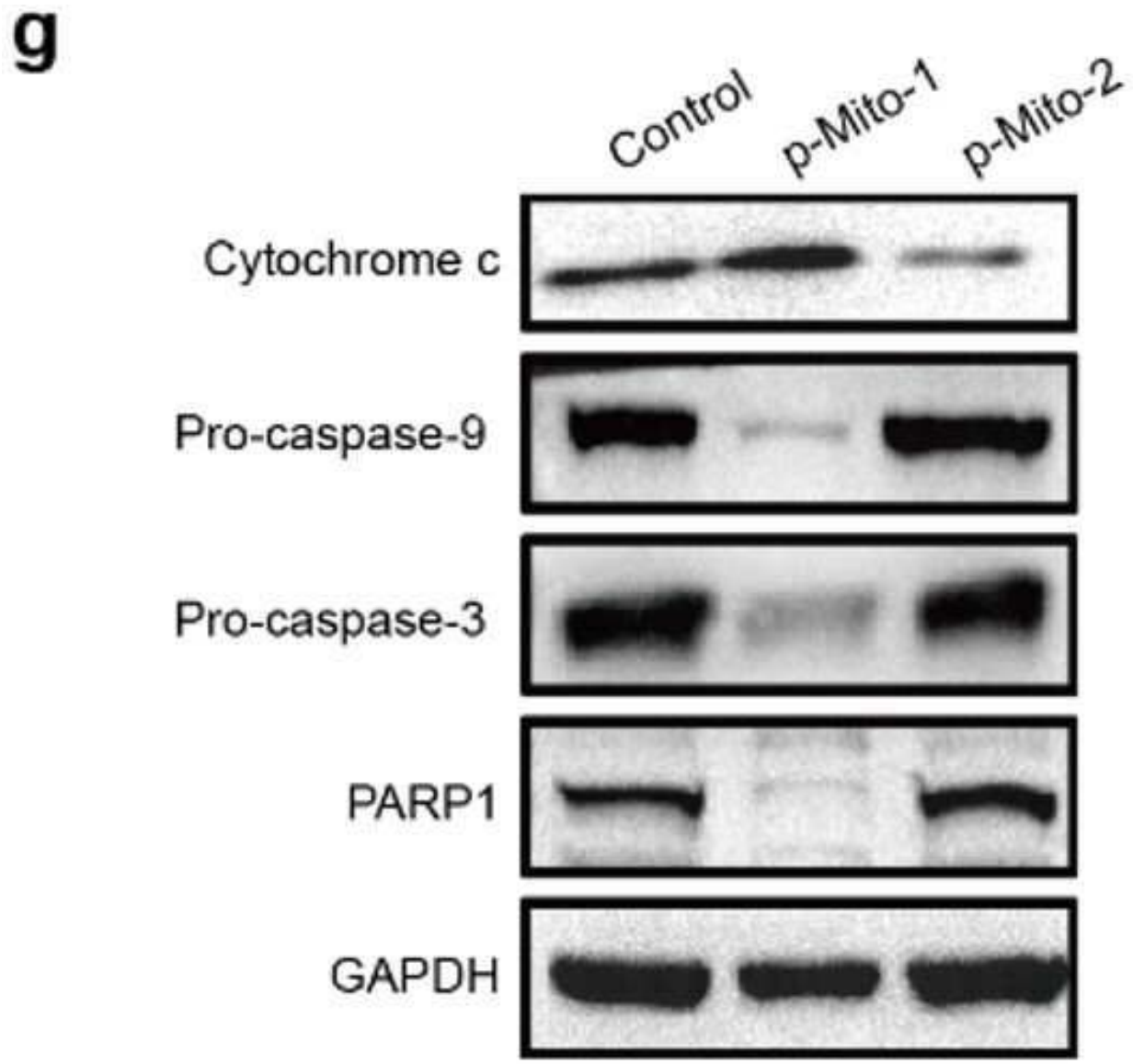

Senescent cells
Normal cells
IC 50 (μM)
350
300
250
200
150
100
50
0
Mito-1
p-Mito-1

도면7f

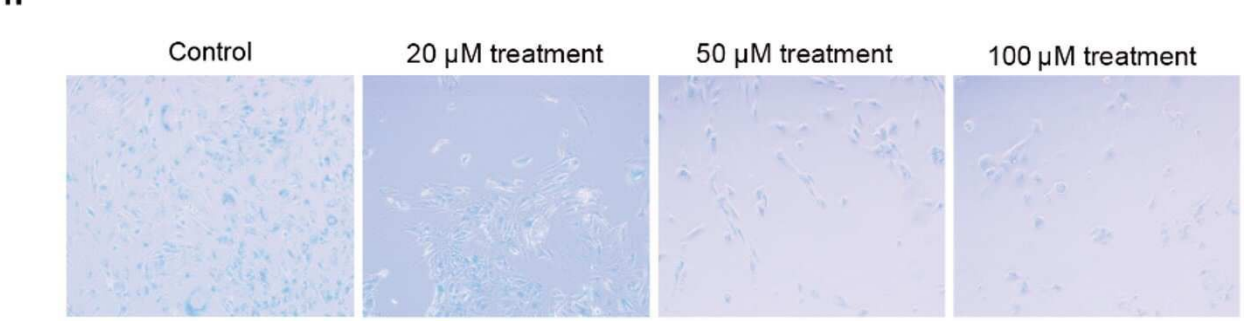
f


Propidium Iodide
Annexin V-FITC
Early Apoptosis
60.14%
0
10³
10⁴
10⁵
-10²
0
10²
10³
10⁴
10⁵

도면7g

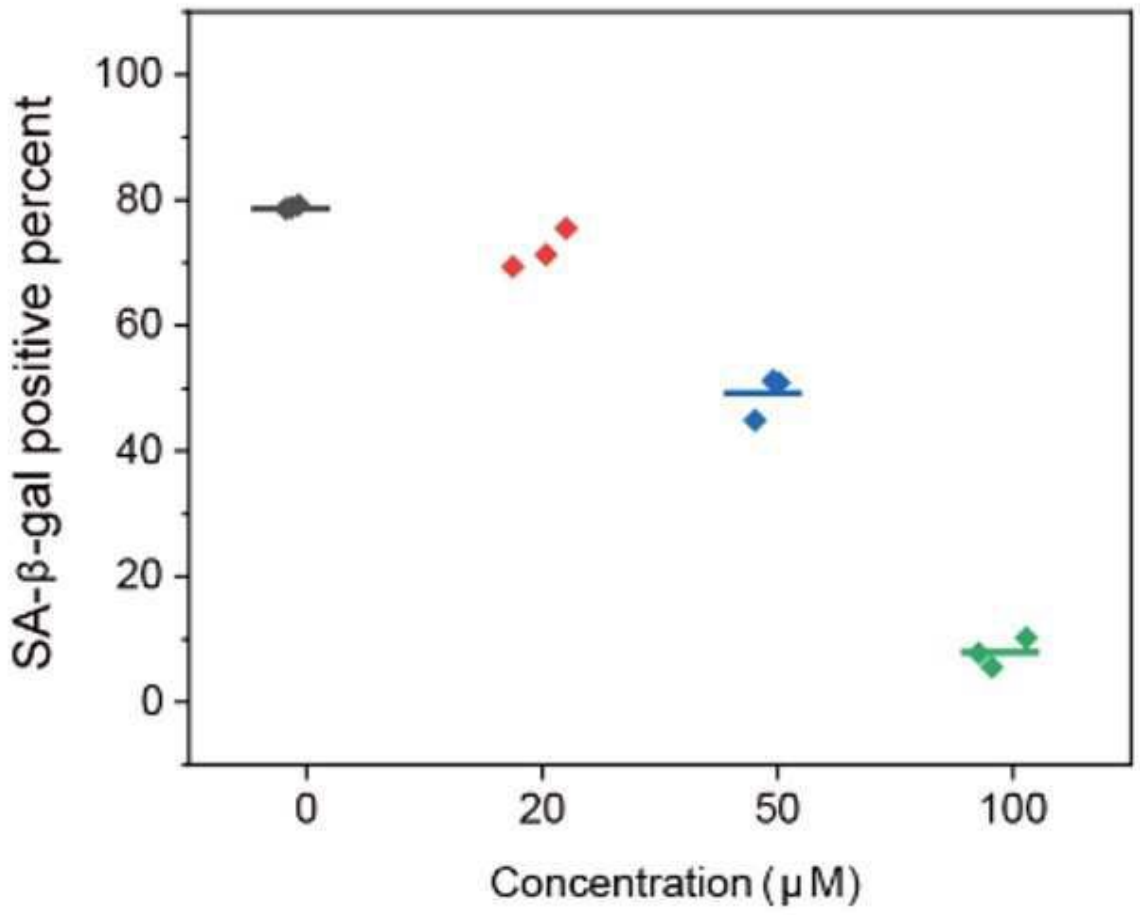

g
Control
p-Mito-1
p-Mito-2
Cytochrome c
Pro-caspase-9
Pro-caspase-3
PARP1
GAPDH

도면7h

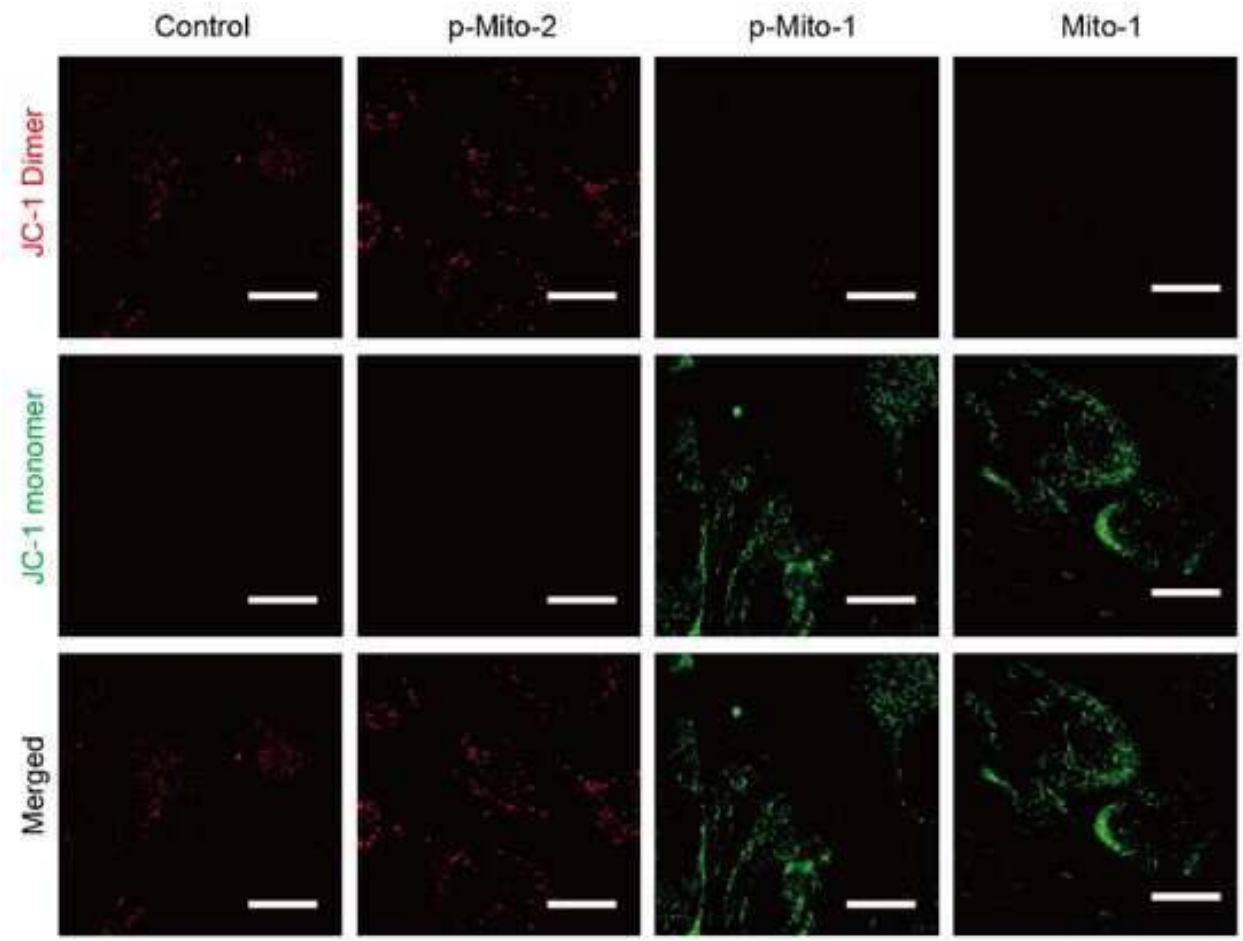

h
Control
20 μM treatment
50 μM treatment
100 μM treatment

도면7i

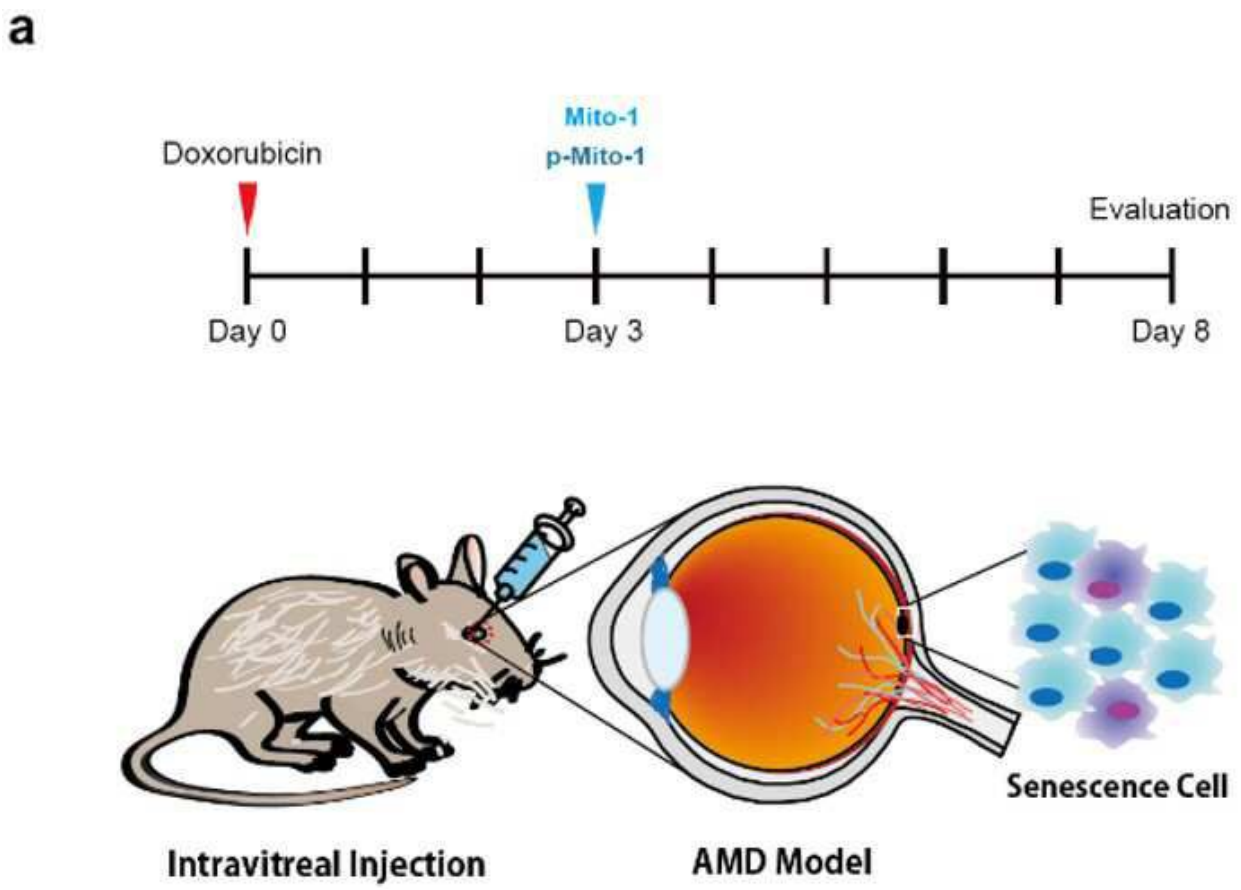
i


SA-β-gal positive percent
100
80
60
40
20
0
0
20
50
100
Concentration (μM)

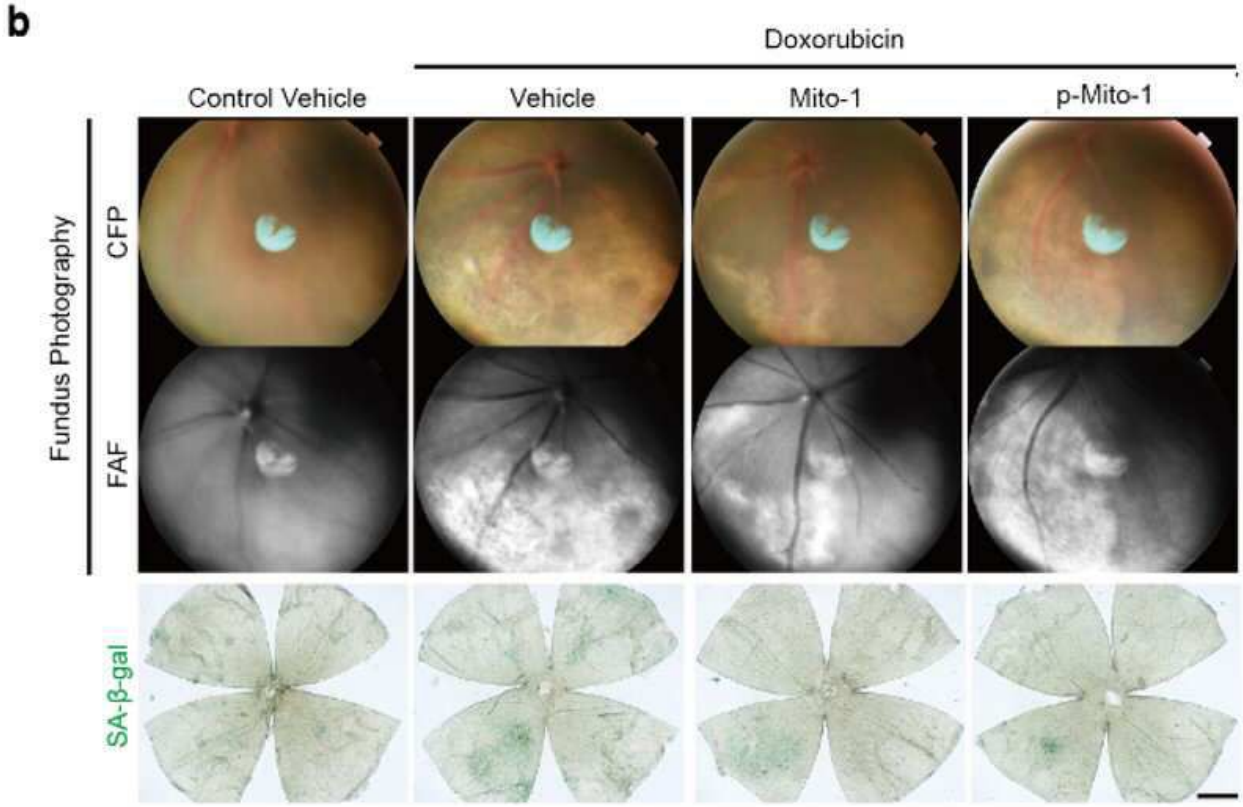
도면8



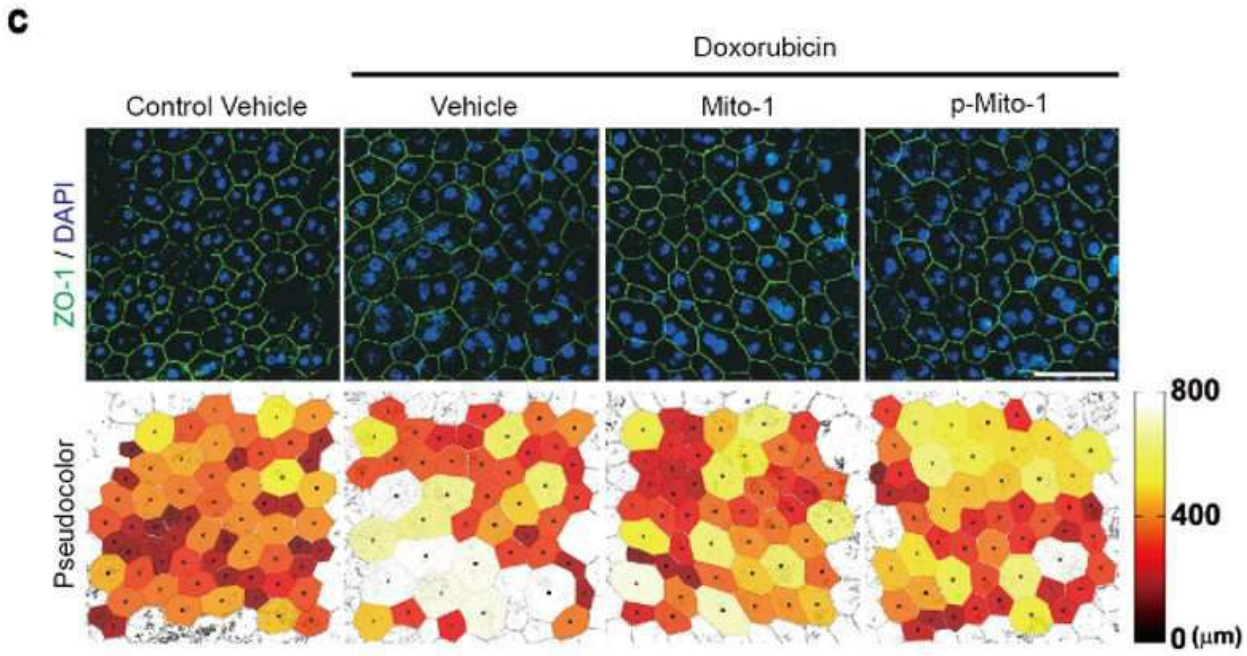
도면9a


a
Doxorubicin
Mito-1
p-Mito-1
Evaluation
Day 0
Day 3
Day 8
Senescence Cell
Intravitreal Injection
AMD Model

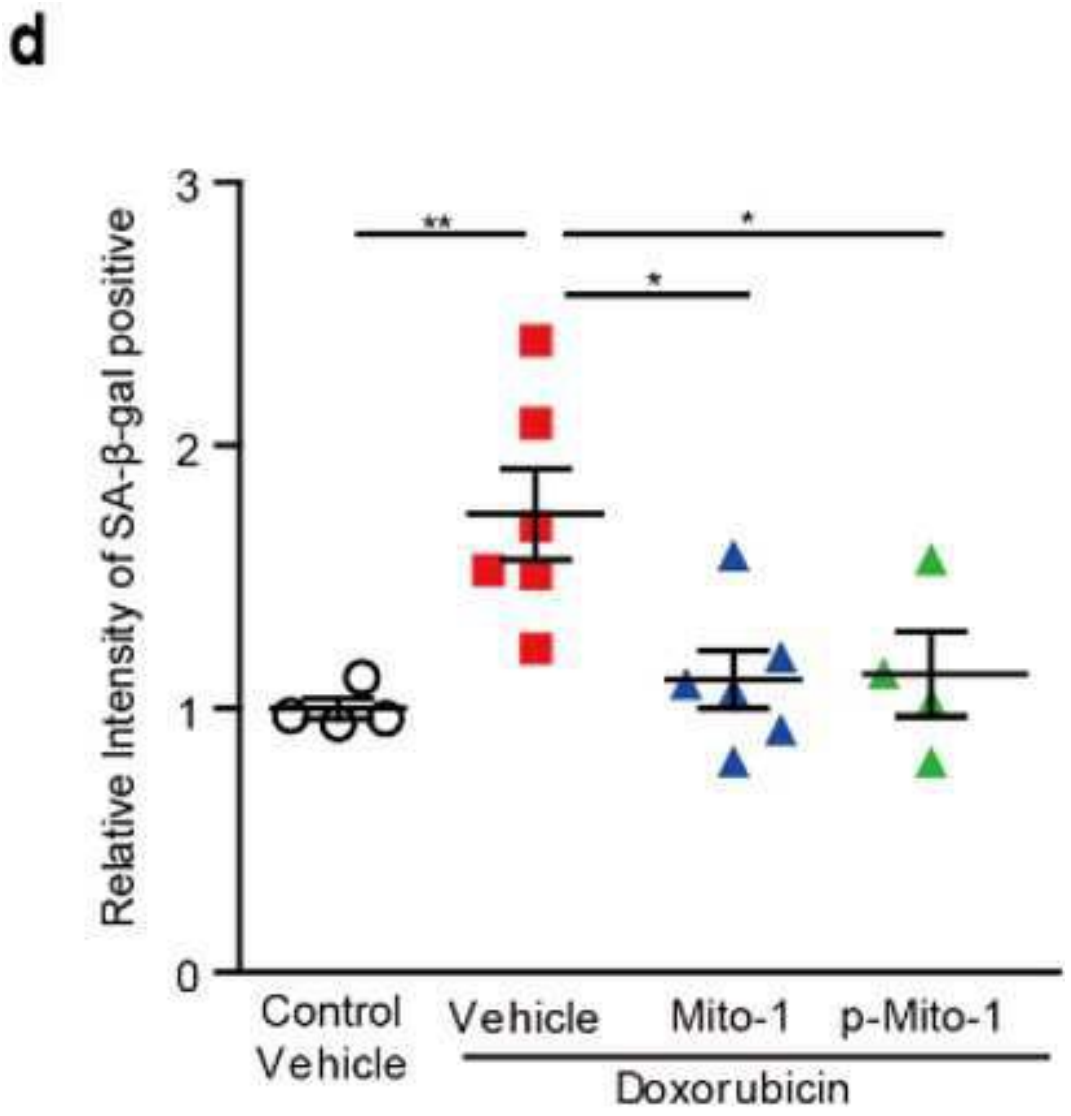
도면9b


b
Doxorubicin
Control Vehicle
Vehicle
Mito-1
p-Mito-1
Fundus Photography
CFP
FAF
SA-β-gal

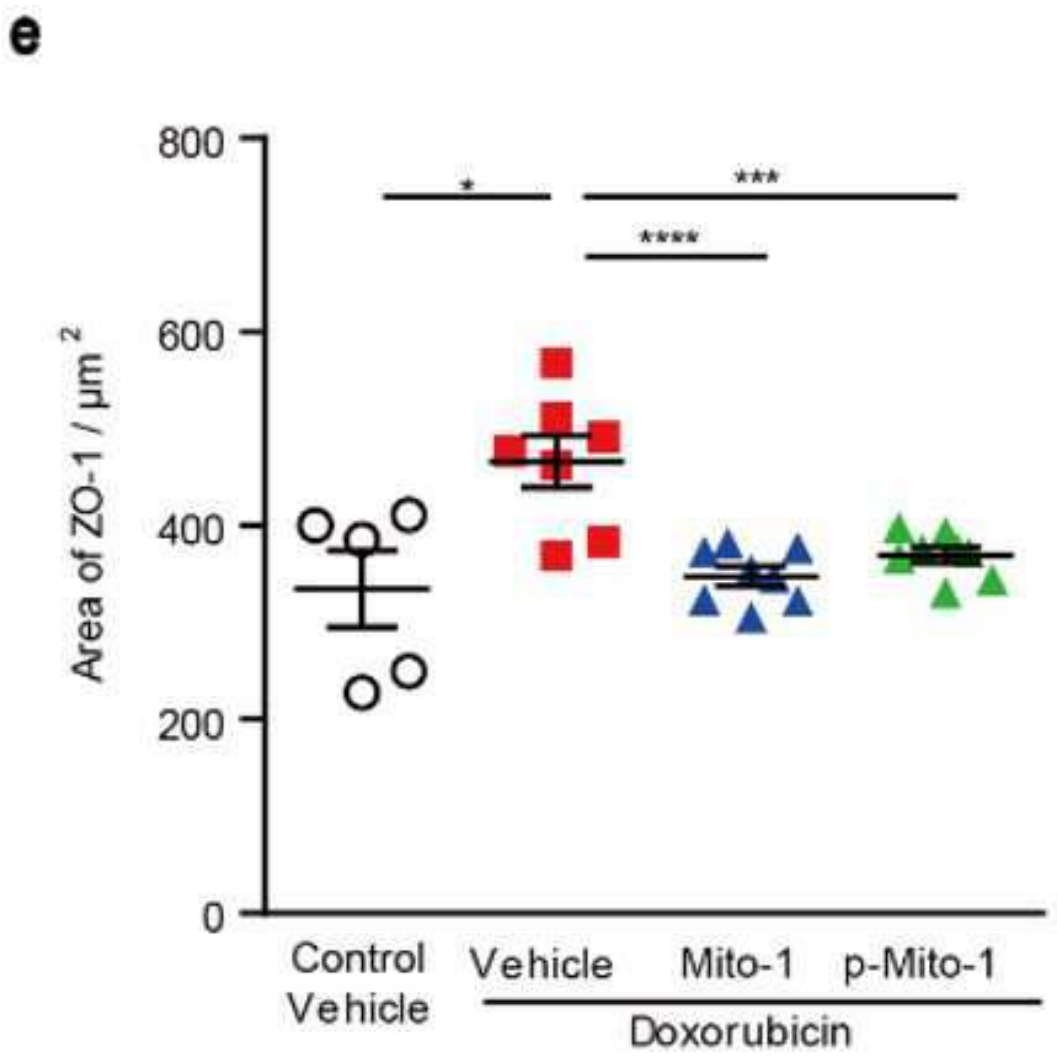
도면9c


c
Doxorubicin
Control Vehicle
Vehicle
Mito-1
p-Mito-1
ZO-1 / DAPI
Pseudocolor
800
400
0 (μm)

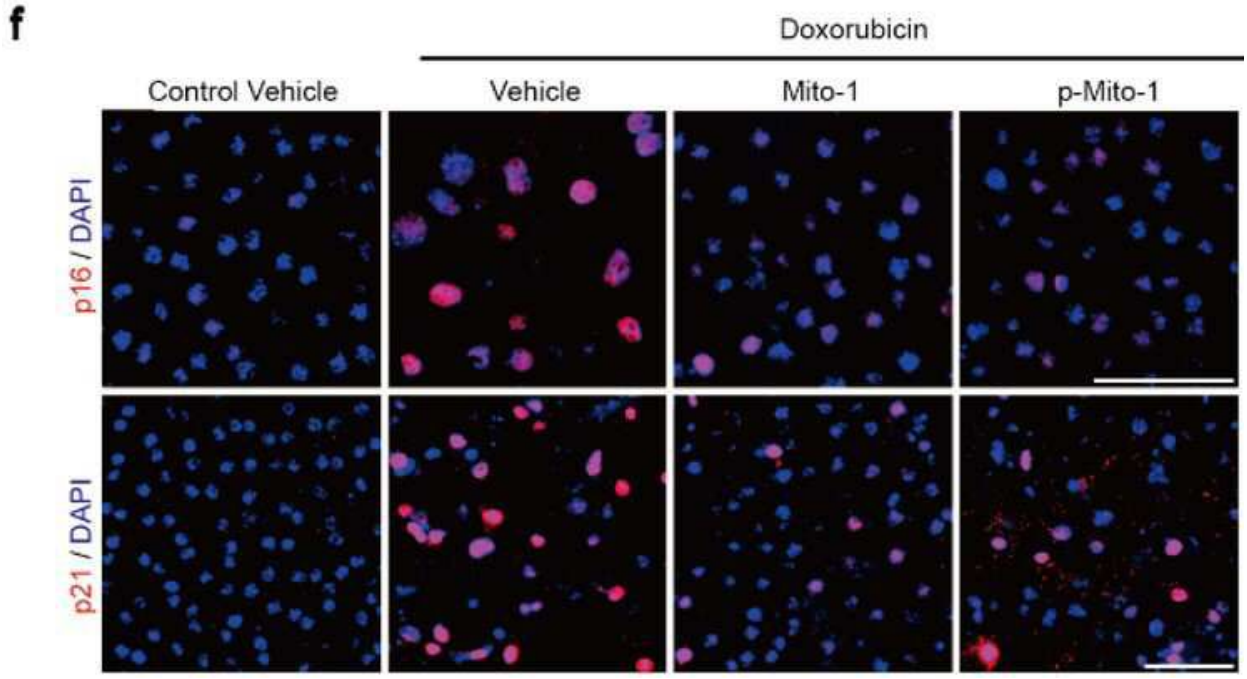
도면9d


d
Relative Intensity of SA-β-gal positive
3
2
1
0
**
*
*
Control Vehicle
Vehicle
Mito-1
p-Mito-1
Doxorubicin

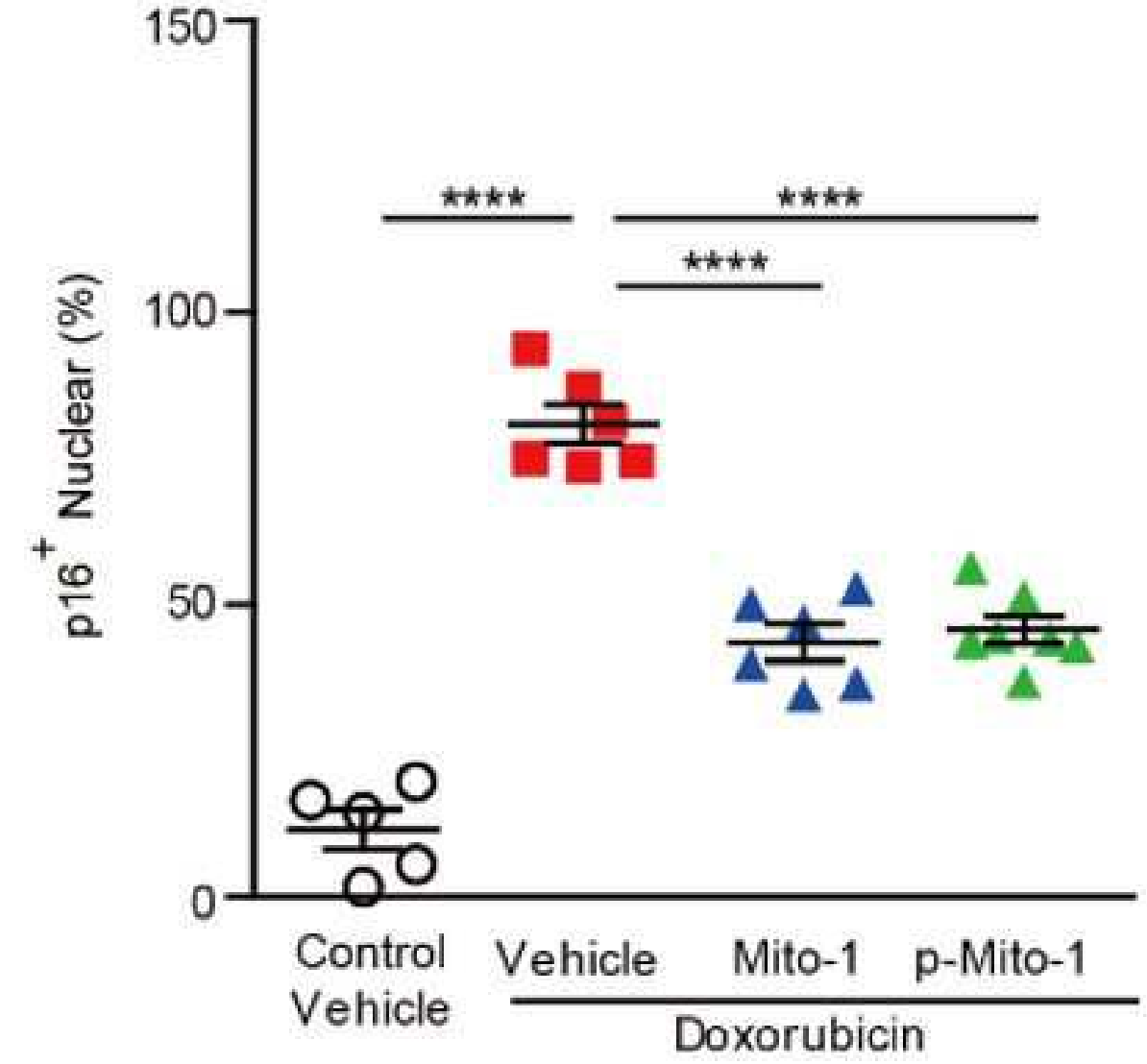
도면9e


e
800
600
400
200
0
Area of ZO-1 / µm 2
*
***
****
Control
Vehicle
Vehicle
Mito-1
p-Mito-1
Doxorubicin

도면9f

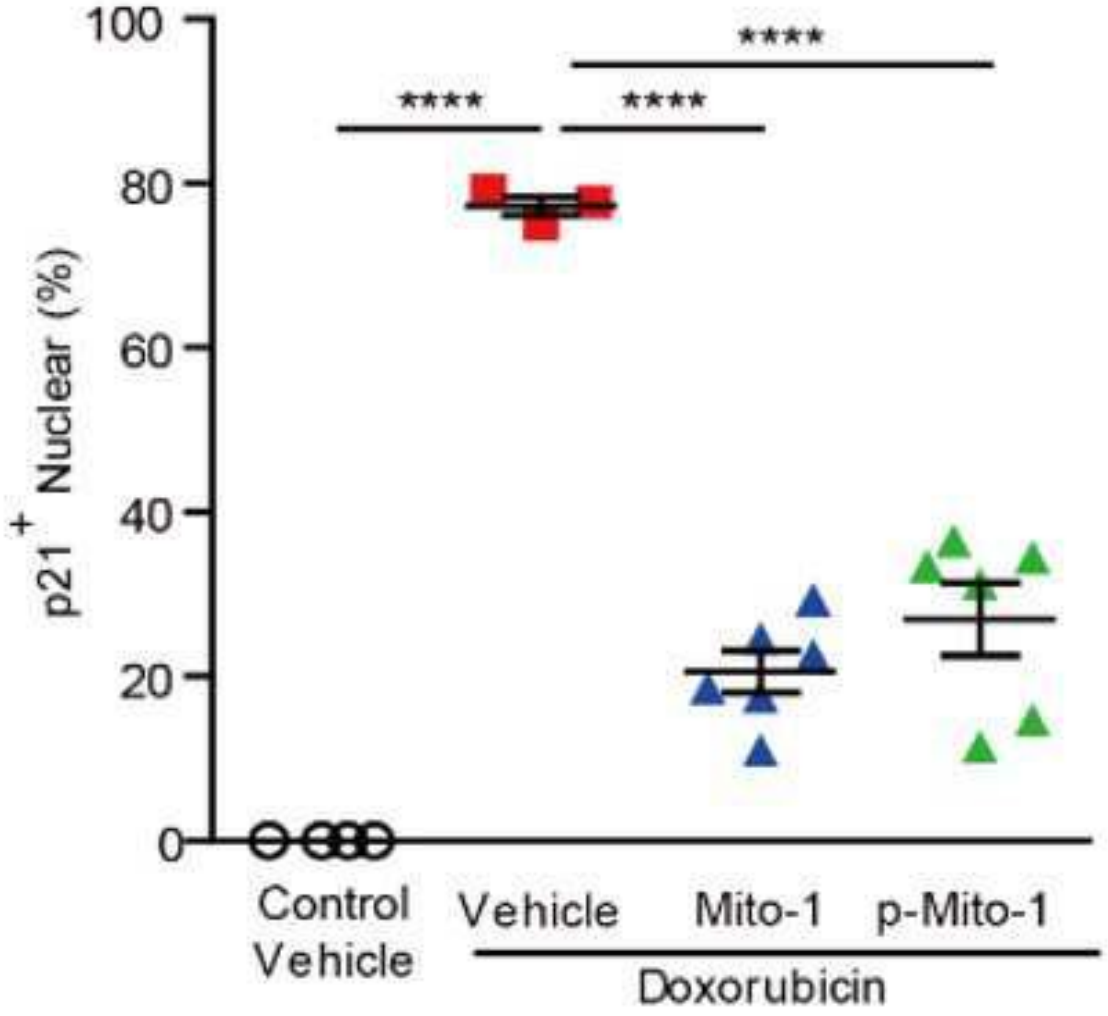

f
Doxorubicin
Control Vehicle
Vehicle
Mito-1
p-Mito-1
p16 / DAPI
p21 / DAPI

도면9g


g
150
100
50
0
p16+ Nuclear (%)
****
****
****
Control
Vehicle
Vehicle
Mito-1
p-Mito-1
Doxorubicin

도면9h

h


100
80
60
40
20
0
p21+ Nuclear (%)
****
****
****
Control
Vehicle
Vehicle
Mito-1
p-Mito-1
Doxorubicin