

출원번호통지서

출원일자 2024.05.02
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2024-0058770 (접수번호 1-1-2024-0483045-15)
(DAS접근코드CE4F)
출원인명칭 인천대학교 산학협력단(2-2004-021729-6) 외 1명
대리인성명 차준용(9-2010-000942-0)
발명자성명 박준태 윤지희 권형욱 변영주 이기용
발명의명칭 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물

특허청장

<< 안내 >>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
- 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

【서지사항】**【서류명】** 특허출원서**【출원구분】** 특허출원**【출원인】****【명칭】** 인천대학교 산학협력단**【특허고객번호】** 2-2004-021729-6**【출원인】****【명칭】** 고려대학교 세종산학협력단**【특허고객번호】** 1-2016-058872-3**【대리인】****【성명】** 차준용**【대리인번호】** 9-2010-000942-0**【포괄위임등록번호】** 2014-028955-8**【발명의 국문명칭】** 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물**【발명의 영문명칭】** ANTI-AGING COMPOSITION COMPRISING VITISIN B**【발명자】****【성명】** 박준태**【성명의 영문표기】** PARK, Joon Tae**【주민등록번호】** 750404-1XXXXXX**【우편번호】** 22000**【주소】** 인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호**【발명자】**

【성명】 윤지희

【성명의 영문표기】 YOON, Jee Hee

【주민등록번호】 000802-4XXXXXX

【우편번호】 22022

【주소】 인천광역시 연수구 아카데미로312번길 177, 108동 804호

【발명자】

【성명】 권형욱

【성명의 영문표기】 KWON, Hyung Wook

【주민등록번호】 681028-1XXXXXX

【우편번호】 06701

【주소】 서울특별시 서초구 남부순환로 2183, 101동 401호

【발명자】

【성명】 변영주

【성명의 영문표기】 Youngjoo, Byun

【주민등록번호】 700622-1XXXXXX

【우편번호】 34049

【주소】 대전광역시 유성구 엑스포로 448, 206동 408호

【발명자】

【성명】 이기용

【성명의 영문표기】 LEE, Ki Yong

【주민등록번호】 760414-2XXXXXX

【우편번호】 30100

【주소】 세종특별자치시 달빛1로 206, 909동 2703호

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1345366487

【과제번호】 2020R1A6A1A0304195411

【부처명】 교육부

【과제관리(전문)기관명】 한국연구재단

【연구사업명】 대학중점연구소지원사업

【연구과제명】 융복합기반기술을 이용한 감염병 매개곤충 제어 플랫폼 구축

【과제수행기관명】 인천대학교 산학협력단

【연구기간】 2020.05.01 ~ 2024.04.30

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1345362117

【과제번호】 2019R1A6A1A03031807

【부처명】 교육부

【과제관리(전문)기관명】 한국연구재단

【연구사업명】 대학중점연구소지원사업

【연구과제명】 약과학연구소

【과제수행기관명】 고려대학교 세종산학협력단

【연구기간】 2019.06.01 ~ 2028.02.29

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1711185822

【과제번호】 2021R1A2C1004298

【부처명】 과학기술정보통신부

【과제관리(전문)기관명】 한국연구재단

【연구사업명】 중견연구지원사업

【연구과제명】 미토콘드리아 대사 기반 통합적 노화 제어

【과제수행기관명】 인천대학교 산학협력단

【연구기간】 2021.03.01 ~ 2024.02.29

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1465041030

【과제번호】 HP23C0024

【부처명】 보건복지부

【과제관리(전문)기관명】 한국보건산업진흥원

【연구사업명】 혁신성장피부건강기반기술개발사업

【연구과제명】 활성 산소 억제를 통한 피부 역노화 기술 개발

【과제수행기관명】 인천대학교 산학협력단

【연구기간】 2023.07.01 ~ 2025.12.31

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 차준용

(서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】	0 면	46,000 원
【가산출원료】	29 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	9 항	625,000 원
【합계】		671,000원
【감면사유】	전담조직(50%감면)[2]	
【감면후 수수료】		335,500 원
【첨부서류】	1. 기타첨부서류[위임장_고려대세종산단]_1통	

1 : 기타첨부서류

[PDF 파일 첨부](#)

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

비티신 B를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물{ANTI-AGING COMPOSITION COMPRISING VITISIN B}

【기술분야】

【0001】 본 발명은 항노화 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 노화에 관한 연구는 과거로부터 현재에 이르기까지 지속되고 있다. 이는 노화가 질병을 일으킬 수 있는 질병 유발인자 중 하나이기 때문이다. 세포분열이 정지된 상태가 영구적으로 지속되는 단계를 세포의 노화로 규정하며, 이는 근본적인 노화의 기작으로서 암, 동맥경화 및 퇴행성관절염과 같은 노화에 따른 질병들을 유발하는 원인으로 조명되고 있다. 노화에 대한 연구 초기 생물학자들은 생체 조직의 노화는 더 이상 분화하지 않는 세포들에 의한 주변세포들의 복구 기작의 억제에 의한 것이라 추측하였다. 더 이상 분화하지 않는 세포란 현재는 노화세포(senescent cells; SNC)라 불리며, 노화세포는 손상된 세포조직의 복구에 참여하지 않을 뿐만 아니라, 노화세포에서 분비되는 물질들에 의한 염증세포의 이동, 세포외부환경(extracellular matrix)의 재구성, 원치 않는 세포 사멸 및 섬유증(fibrosis) 등을 유발한다고 알려져 있다. 이러한 노화세포는 노화에 따라 자연스

롭게 축적되며, 이는 세포조직의 손상을 누적시키게 된다.

【0003】 현재 연구되는 기술들은 노화세포를 선택적으로 제거할 수 있으며, 이는 수많은 노화 관련 질환을 예방하고 치료하는 방법을 개발하는데 있어 많은 가능성을 제공하게 되었다. 치료법을 크게 나누어 보면 senolysis, 면역을 통한 노화세포의 제거 그리고 SASP의 무력화 등이 있다. 이 중에서 노화세포의 영구적인 제거는 SASP의 지속적인 감소를 유도할 뿐만 아니라 만일 노화세포가 살아남아 야기할 수 있는 암 생성의 위험성 또한 감소시킬 수 있다. 하지만, 이러한 기술들을 적용하기에 앞서 고려해야 될 사항들이 있다. 우선, 어떤 세포로부터 어떤 방법으로 노화세포를 유도하여 어떤 질병모델에 적용해야 할지 고려해야 한다. 그리고 실제 마우스 실험에 적용 시에 스트레스를 주거나, 수술을 통해 노화세포를 유도하거나 또는 나이 든 마우스를 이용하기도 하는데, 이중 어떤 방법으로 유도해야 할지도 중요할 것이다. 하지만 여전히 노화에 대한 연구는 그 성과를 아직 맺지 못하고 있고, 이에 따라서 노화를 억제시킬 수 있는 신규한 물질이나 방법의 개발이 필요한 실정이다.

【0004】 레스베라트롤(resveratrol)은 식물이 곰팡이나 해충과 같은 악조건에 직면했을 때 생성되는 파이토알렉신으로 분류되는 폴리페놀계 화합물의 일종인 stilbenoid 계열 물질이다. 이 물질은 인체의 여러 질병에 도움이 된다고 알려져 있다. 예를 들어 항암, 항바이러스, 신경 보호, 항노화, 항염, 그리고 수명 연장 등의 효과가 보고되고 있다. Resveratrol tetramer 화합물인 vitisin B는 화장품 산업에서 피부의 역노화에 사용될 수 있으며, 이를 활용해 안티에이징 화장품 개발이

가능하다. 이러한 제품은 노화로 인한 주름 개선, 피부 탄력 향상, 주근깨 및 색소 침착 감소 등 다양한 효과를 제공한다. 또한, 이러한 화장품은 피부를 보호하고 노화의 영향을 완화하여 피부를 더욱 건강하게 유지한다.

【0005】비티신 B(Vitisin B)는 또한 항염증 및 항산화 성분을 활용하여 피부를 보호하고 진정시키는 화장품 부가제로 활용될 수 있다. 또한, 항노화 효과를 통해 피부 질환 치료제나 의료용 피부 치료제의 개발도 가능하다.

【0006】두 번째로, 건강과 항노화 분야에서 유용하게 활용될 수 있다. 이러한 화합물은 질병 예방, 면역 강화, 대사 기능 향상과 같은 다양한 효과를 가질 수 있다. 건강식품이나 보조제의 성분으로 사용됨으로써 직접 섭취하면 피부 뿐만 아니라 전체적인 건강에 도움이 될 수 있다.

【선행기술문헌】

【특허문헌】

【0007】(특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-2576222호

(특허문헌 0002) 한국 공개특허 제10-2013-0067507호

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

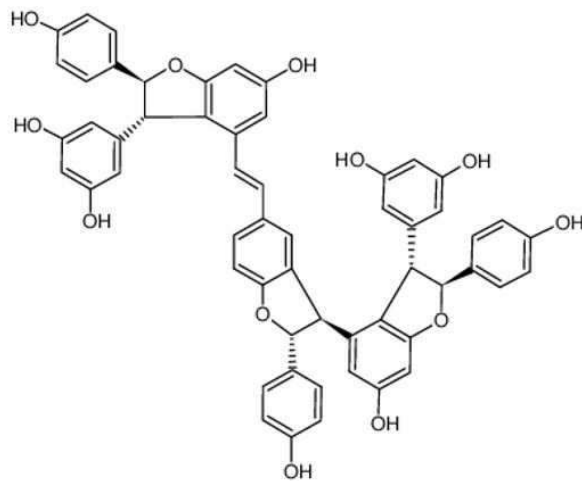
【0008】노화는 세포의 미토콘드리아에서 발생하는 활성산소종(ROS)의 증가로 특징지어진다. 이러한 양상은 피부 노화 과정에서도 관찰된다. 화학적 조성물

은 주로 ROS 수준을 완화하는 물질을 포함하고 있지만, 이러한 특성을 가진 화합물은 상대적으로 제한적이다. 본 발명에서는 vitisin B를 이용하여 노화된 섬유아세포에서 유의미한 ROS 감소가 확인되었다. 확인된 vitisin B의 최적화된 농도는 다양한 노화 지표의 상당한 회복을 보여주고 있다. 결론적으로 이 발명은 vitisin B가 노화된 섬유아세포에서 ROS를 감소시키고 미토콘드리아 기능을 회복하는 세노몰릭 메커니즘의 증거를 제공한다.

【과제의 해결 수단】

【0009】 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물을 제공한다;

【0010】 [화학식 1]



【0011】

【0012】 상기 노화는 미토콘드리아의 기능 이상에 의하여 유발되는 것을 특징으로 한다.

【0013】 상기 조성물은 노화 섬유아세포내 ROS(Reactive Oxygen Species)를 감소시키는 것을 특징으로 한다.

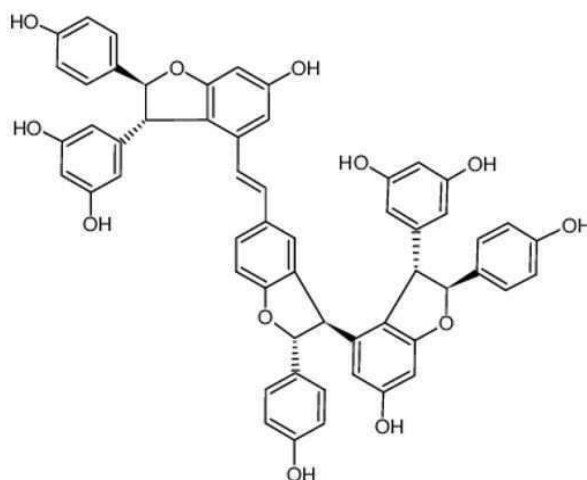
【0014】 상기 조성물은 세포내 미토콘드리아 질량(mitochondrial mass)을 감소시키고, 미토콘드리아 막 전위(MMP)를 증가시키는 것을 특징으로 한다.

【0015】 상기 조성물은 자가 포식 흐름(autophagy flux)과 세포자살(Apoptosis)을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

【0017】 상기 조성물은 자가형광 autofluorescence)을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

【0018】 하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아 기능 저하로 인해 유발되는 세포노화 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다;

【0019】 [화학식 1]

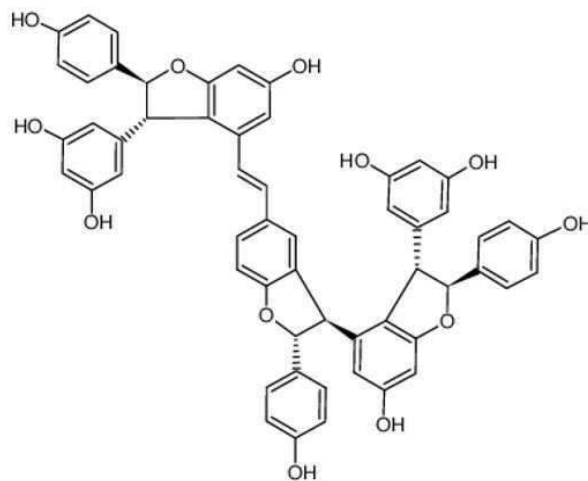


【0020】

【0021】 상기 미토콘드리아 기능 저하로 인해 유발되는 세포노화 관련 질병은 프리이드라이히 실조(Friedreich's Ataxia)(FRDA), 콩팥 요세관 산증(renal tubular acidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병, 근위축 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS), 헌팅톤병(Huntington's disease), 전반적 발달 장애(developmental pervasive disorder), 청력 소실(hearing loss), 난청(deafness), 당뇨병, 비만, 당뇨병성궤양, 인슐린저항성, 간지방증(지방간염)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0022】 하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 피부노화 억제용 화장료 조성물을 제공한다;

【0023】 [화학식 1]



【0024】 .

【발명의 효과】

【0025】 본 발명의 유효성분인 비티신 B의 경우, 노화 섬유아세포내 ROS(Reactive Oxygen Species)를 감소시키고, 세포내 미토콘드리아 질량

(mitochondrial mass)을 감소시키고, 미토콘드리아 막 전위(MMP)를 증가시키고, 자가형광 autofluorescence)을 감소시키고, 자가포식을 활성화시키는 효과를 나타내므로, 미토콘드리아에 의하여 유발되는 세포 노화를 억제하고, 따라서 상기 비티신 B는 미토콘드리아 기능 저하로 인해 유발되는 세포노화 관련 질병의 예방 또는 치료용 조성물 또는 피부노화 억제용 화장품 조성물로 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

【0026】 도 1은 ROS 스크리닝을 통해 비티신 B의 활성산소종 감소 확인 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 Cell proliferation assay를 통해 ROS를 감소시키는 비티신 B의 최적 농도 탐색 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 최적화된 비티신 B의 세포 독성 평가 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 최적화된 비티신 B의 미토콘드리아 관련 지표 개선 확인 결과 그래프이다.

도 5는 최적화된 비티신 B의 기타 노화 지표 개선 확인 결과를 나타내는 그래프이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0027】 본 발명자는 [화학식 1]의 비티신 B가 노화 섬유아세포내 ROS(Reactive Oxygen Species)를 감소시키고, 세포내 미토콘드리아 질량(mitochondrial mass)을 감소시키고, 미토콘드리아 막 전위(MMP)를 증가시키고, 자

가형광(autofluorescence)을 감소시키고, 자가포식을 활성화시키는 효과를 나타내므로, 미토콘드리아에 의하여 유발되는 세포 노화를 억제하는 효과를 나타내므로, 미토콘드리아에 의하여 유발되는 세포 노화를 억제하고, 따라서 상기 비티신 B는 미토콘드리아 기능 저하로 인해 유발되는 세포노화 관련 질병의 예방 또는 치료용 조성물 또는 피부노화 억제용 화장품 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다.

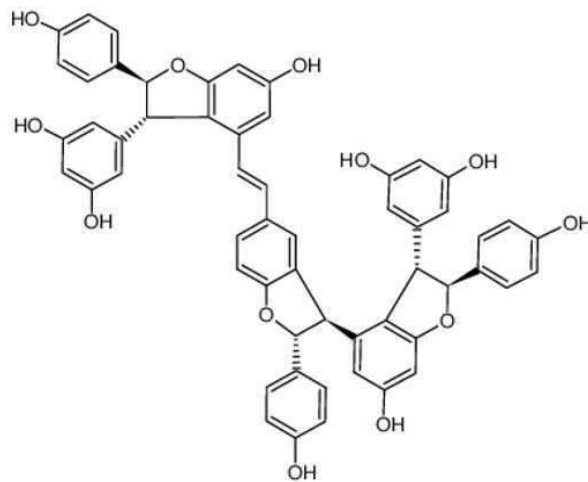
【0028】 따라서 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물을 제공한다.

【0029】 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 세포노화 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

【0030】 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 세포노화 관련 질병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

【0031】 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 피부노화 억제용 화장품 조성물을 제공한다.

【0032】 [화학식 1]



【0033】

【0034】 상기 노화는 미토콘드리아의 기능 이상에 의하여 유발되는 것을 특징으로 한다.

【0035】 미토콘드리아 기능 저하로 인해 유발되는 세포노화 관련 질병은 프리드리히 실조(Friedreich's Ataxia)(FRDA), 콩팥 요세관 산증(renal tubular acidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병, 근위축 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS), 헌팅톤병(Huntington's disease), 전반적 발달 장애(developmental pervasive disorder), 청력 소실(hearing loss), 난청(deafness), 당뇨병, 비만, 당뇨병성궤양, 인슐린저항성, 간지방증(지방간염)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0036】 상기 세포노화 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 유효 성분 유효량에 1종 또는 2종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 통상적인 담체 또는 1종 또는 2종 이상의 첨가제를 선택하여 통상적인 제형의 조성물로 제조할 수 있다.

【0037】 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 항산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.

【0038】 본 발명에 있어서, 상기 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 사용이 가능하며, 구체적으로는 희석제로는 유당(lactose monohydrate), 트레할로스(Trehalose), 옥수수 전분(cornstarch), 콩기름(soybean oil), 미결정 셀룰로오스(microcrystalline cellulose) 또는 만니톨(D-mannitol)이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate) 또는 탈크(talc)가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐 피롤리돈(PVP:polyvinyl pyrrolidone) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC: hydroxypropylcellulose) 중에서 선택함이 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메틸셀룰로오스칼슘(Ca-CMC: carboxymethylcellulose calcium), 전분글리콜산나트륨(sodium starchglycolate), 폴라크릴린칼륨(polacrylin potassium) 또는 크로스포비돈(cross-linkedpolyvinylpyrrolidone)중에서 선택함이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨(sorbitol) 또는 아스파탐(aspartame) 중에서 선택되고, 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨(Na-CMC: carboxymethylcellulosesodium), 베타-싸이클로덱스트린(β -cyclodextrin), 백납(white bee's wax) 또는 잔탄검(xanthan gum) 중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산메칠(methyl p-hydroxy benzoate, methylparaben), 파라옥시안식향산프로필(propylp-hydroxybenzoate, propylparaben), 또는 소르빈산칼륨(potassium sorbate) 중에서 선택하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

【0039】 본 발명의 약학적 조성물은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기에서 '약학적으로 유효한 양'이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 염증성 질환의 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 말한다. 또한, 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.

【0040】 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 본 발명의 조성물은 상기 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다.

【0041】 상기 식품 조성물은 음료(차 또는 알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지, 콘드비프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예:

된장, 간장, 소스 등) 등일 수 있다.

【0042】 또한, 상기 식품 조성물은 건강기능식품일 수 있으며, 상기 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.

【0043】 피부 노화는 그 요인에 따라 1) 환경 변화와는 무관하게 나이가 들어감에 따라 피부의 구조와 생체의 생리학적 기능이 저하되어 자연적으로 유발되는 내인성 노화(intrinsic aging)와 2) 자외선, 건조한 공기, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS), 스트레스 등의 외적 요인에 의해 유발되는 외인성 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있는데, 내인성 노화는 잔주름, 피부 건조증, 탄력 감소 등의 경미한 임상 특징을 나타내고, 외인성 노화는 굵고 깊은 주름과 함께 잔주름까지도 많이 발생하는 임상 특징을 나타내므로, 이러한 피부 탄력 감소나 주름(wrinkle)은 위와 같은 피부 노화의 대표적인 증상이라 할 수 있다. 따라서 상기 피부 노화는 피부 주름 발생 또는 피부 탄력 감소일 수 있다.

【0044】 즉, 피부 노화 예방 또는 개선은 피부 주름 개선, 피부 탄력 증진, 항산화 또는 항염증일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

【0045】 본 발명의 화장료 조성물에는 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들, 예를 들면 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제, 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제,

습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 등과 같은 통상적인 보조제나 담체가 통상적으로 사용되는 양으로 포함될 수 있다.

【0046】 본 발명의 화장료 조성물은 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등과 같이 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형으로 제조될 수 있다. 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있고, 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 상기 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다. 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에

톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다. 상기 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

【0048】 이상의 본 발명은 이하의 실시예를 통해 보다 구체적으로 설명된다. 그러나 본 발명은 실시예에 한정되지 않고 어떠한 형태로든 구체화될 수 있다. 소개된 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제시되는 것이다.

【0050】 <실험예>

【0051】 1. 세포 배양

【0052】 이 연구에서는 인간 진피 섬유아세포(HDF, PCS-201-010, ATCC, Manassas, VA, USA)를 사용했다. 세포를 10% 소 태아 혈청(SH30919.03; Hyclone, Waltham, MA, USA)과 100U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신(SV30079.01; Hyclone)이 보충된 25mM 포도당을 함유하는 Dulbecco 변형 이글 배지에서

배양했다). 노화 섬유아세포의 개체수가 두배가되는 시간이 14일을 넘었을 때로 정의했다. 세포 생존력 및 세포수는 Cedex HiRes 분석기(05650216001, Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 평가되었다.

【0054】 2. ROS 스크리닝

【0055】 노화 섬유아세포를 T25 플라스크에서 배양했다. 라이브러리의 구성 요소를 최종 농도 $4\mu\text{M}$ 로 희석하고 4일마다 플라스크에 추가했다. 시약 처리 12일 후 ROS 스크리닝을 실시했다. ROS 스크리닝을 위해 DHR123(D23806; Thermo Fisher Scientific)을 T25 플라스크에 첨가하고 30분 동안 배양했다. 배양 후 DPBS (20-030-CV; Corning, NY, USA)를 플라스크 첨가하고 세척 단계를 2회 수행하였다. 염색된 노화 섬유아세포를 유세포 분석을 통해 분석했다.

【0057】 3. 세포증식 측정

【0058】 노화 섬유아세포는 96웰 플레이트에서 웰당 1,000개 세포의 밀도로 성장했다. 라이브러리의 구성 요소를 최종 농도 $0.25 \sim 4\mu\text{M}$ 로 희석하고 4일마다 웰에 추가했다. 약물 처리 12일 후, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 두 번 세척하고 $50\mu\text{l}$ 의 0.2% SDS에 용해시켰다. 플레이트를 37°C 에서 1시간 동안 배양하였다. GelGreen® 핵산 겔 염색($150\mu\text{l}$)(DW 중 1:1,000; 41005; Biotium, Fremont, CA, USA)을 웰에 첨가했다. VICTOR Multilabel Plate Reader (2030-0050,

PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 형광 강도를 측정하여 세포 수를 결정했다. 각 실험 그룹에 대해 12회 반복 실험의 평균 및 표준 편차를 결정했다.

【0060】 4. 유세포분석 (FACS)

【0061】 FACS 분석은 Cell to in vivo 이미징을 위한 Core 시설에서 BD LSR II(LSR II, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)에 의해 수행되었다. FACS를 이용한 실험방법을 다른 문단으로 나누어 자세히 설명된다.

【0063】 5. 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 측정

【0064】 미토콘드리아 막 전위 측정을 위해 세포를 0.6 μ g/ml JC-10 (ab112134; abcam, Waltham, MA, USA)과 함께 37°C에서 30분간 배양하였다. 염색 후, 유세포 분석을 통해 측정되었다.

【0066】 6. ROS, 미토콘드리아 질량 및 리포푸신 측정

【0067】 미토콘드리아 ROS의 정량화를 위해 세포를 3 mM DHR123 (10056-1; Biotium)가 포함된 배지에서 37°C에서 30분간 배양했다. 미토콘드리아 질량의 정량을 위해 세포를 50 μ M MitoTracker deep red (M46753, Thermofisher scientific)이 포함된 배지에서 37°C에서 30분간 배양했다. HDF에서 리포푸신을 측정하려면 염색되지 않은 세포를 사용되었다. 이후 유세포 분석을 통해 측정되었다.

【0069】 7. 오토파고솜 측정

【0070】 자가포식 플릭스는 이전에 설명한 대로 CYTO-ID®(ENZ-51031-0050, Enzo Lifescience, Farmingdale, NY, USA) 자가포식 검출을 사용하여 회사 프로토콜에 따라 염색했고, 유세포 분석을 통해 측정했다.

【0072】 8. 해마 분석

【0073】 Seahorse XFe96 분석기(Aglient Technolony, Santa Clara, CA, USA)는 제조업체의 프로토콜에 따라 사용되었다. 1×10^4 개의 세포를 XFe96 세포 배양 플레이트(101085-004; Aglient Technolony)의 각 웰에 분배한 후 37°C의 온도에서 16시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양했다. 다음으로 배지를 seahorse XF DMEM pH 7.4(103680-100, Aglient Technolony)로 교체했다. 세포의 산성화율(ECAR)은 Seahorse XF Glycolytic Stress Test 키트(103020-100, Aglient Technolony)를 사용하여 측정되었다. ECAR은 mpH/min으로 보고되었다. 센서 카트리지는 Seahorse XFe96 세포의 플릭스 분석 키트(102416-100, Agilent Technology)에 사용되었다. 해마 분석은 이전에 설명한 대로 수행하였다(Kang, Park, Choi, Kim, et al., 2017). 노화 세포의 대사 변화를 유도하기 위해 AZD7545 (S7517; Selleckchem, Houston, TX, USA)를 20 μ M의 농도로 사용했다.

【0075】 <실시예>**【0076】 1. 각 화합물의 비교**

【0077】 노화된 세포는 미토콘드리아 기능 이상으로 인해 과도한 ROS 생성 및 축적이 발생하는 특징이 있다. 본 발명에서는 유세포 분석을 통해 ROS를 유의미하게 감소시키는 효과를 가진 천연물 추출물을 찾아보았다.

【0078】 Vitisin B는 음성 대조군(DMSO 그룹) 대비로 약 65% 정도의 ROS 감소를 나타냈다(도 1). 이는 vitisin B가 노화된 세포에서 과도하게 생성된 ROS를 유의미하게 줄일 수 있는 효과를 보인다는 것을 의미한다.

【0080】 2. 비티신 B의 농도 최적화

【0081】 노화세포는 세포주기의 정지를 또다른 특징으로 가지고 있다. 따라서, 세포증식에도 효과가 있는지 확인하기 위해 유의미한 ROS 감소 효과가 있었던, 비티신 B의 농도 최적화를 하기 위해 0~10 μM 농도로 cell proliferation assay를 진행했다. 비티신 B는 0.5 μM 농도에서 가장 유의미한 세포증식을 나타냈다(도 2). 이는 0.5 μM 농도에서 세포증식 회복 효과가 가장 좋았음을 시사한다.

【0083】 3. 비티신 B의 세포 독성 평가

【0084】 ROS 및 cell proliferation을 유의미하게 노화를 개선시켰던 비티신 B에 대해서 세포 독성여부를 확인하기 위해 세포 독성평가가 진행되었다. 세포 독

성평가는 Cell viability를 12일간 4일 간격으로 측정되었다. 0.5 μ M 농도의 비티신 B 군은 DMSO 군과 유의미한 차이가 발견되지 않았다(도 3). 이 결과는 비티신 B의 노화 세포에 독성을 나타내지 않음을 시사한다.

【0086】 4. 비티신 B의 미토콘드리아 관련 지표 개선 확인

【0087】 세포 노화와 노화 가속화는 기능 장애가 있는 미토콘드리아에서 생성된 과도한 ROS를 특징으로 한다. 본 발명자는 농도 최적화된 비티신 B의 ROS 감소효과를 확인하기 위해 유세포 분석기를 사용하여 ROS를 측정했다. 최적화된 비티신 B 또한 노화 섬유아세포의 ROS를 유의미하게 감소시켰다(도 4A).

【0088】 미토콘드리아는 세포 내에서 융합과 분리가 반복되는데, 노화로 인한 미토콘드리아 기능이상 발생 시 분리기능이 저하되어 융합된 상태로 유지되기도 한다. 또한 노화된 세포에서는 기능이상인 생긴 미토콘드리아를 제거하기 위해 미토파지(mitophagy)가 증가하는데, 노화가 진행되었을수록 이 기능에 이상이 생겨 미토콘드리아 질량(mitochondrial mass)이 증가한다.

【0089】 이에 본 발명자는 미토콘드리아 질량(mitochondrial mass)을 염색하여 유세포분석기로 측정했다. 그 결과, 노화 섬유아세포에 비해 유의미한 미토콘드리아 질량 감소가 확인되었다(도 4B). 노화 섬유아세포에서 미토파지의 기능 회복을 통해 기능 이상 미토콘드리아를 제거하고, 세포 전체의 미토콘드리아 기능과 활성을 회복하였음을 시사한다.

【0090】 미토콘드리아 기능 이상이 생기면, 미토콘드리아 전자전달계 이상으로 내막과 외막 사이공간(막사이 공간)의 H^+ potential이 감소한다. 이는 효율적인 에너지 생산이 불가능해 미토콘드리아 기능이상 지표로써 사용되어진다. 본 발명에서는 JC-10 염색을 한 후 유세포 분석을 통해 MMP(mitochondrial membrane potential)이 측정되었다. 최적화된 비티신 B는 노화 섬유아세포에서 유의미한 MMP 증가가 확인되었다 (그림 4C). 이는 비티신 B가 유의미하게 미토콘드리아 기능 회복시킴을 시사한다.

【0092】 5. 비티신 B의 기타 노화 지표 개선 확인

【0093】 기능 장애가 있는 소기관을 제거하는 것은 세포 내부의 중요한 과정 중 하나이다. 전통적으로 세포는 자가포식 시스템을 통해 기능 장애가 있는 소기관을 제거한다. 그러나 세포 노화가 진행됨에 따라 리소좀과 자가포식 시스템에 문제가 발생하여 정상적인 과정이 기능하지 못하게 된다. 기능 장애가 있는 세포의 축적으로 인해 세포 노화가 가속화된다.

【0094】 본 발명에서는 최적화된 비티신 B가 자가포식 시스템을 개선하는지 확인하기 위해 실험을 수행했다. 최적화된 비티신 B는 노화 섬유아세포에서 autophagosome을 유의미하게 증가한 것을 보여주었다(도 5A). 이러한 결과는 노화된 섬유아세포에서 비티신 B에 의해 활성화된 미토파지를 통한 리소좀/자가포식 시스템의 복원을 시사한다.

【0095】 리소좀과 autophagosome의 융합을 통해 자가포식이 진행되기 때문에 자가포식 시스템이 개선됨에 따라 autolysosome의 증가로 리소좀 양이 감소한 것이 확인된다(도 5B).

【0096】 리포푸신은 리소좀 내의 고분자 물질로, 주로 철 축매 산화 과정으로 인해 형성된 가교 단백질 잔기로 구성된다. 분해되지 않고 세포외유출을 통해 제거될 수 없기 때문에 유사분열 후 세포 내 리포푸신 축적은 불가피하다. 리포푸신은 노화 동안 세포 내에 축적된다. 리포푸신의 개선은 노화 개선의 지표로 볼 수 있다.

【0097】 따라서 본 연구에서는 노화섬유아세포의 리포푸신을 유세포분석법을 이용하여 측정하였다. 최적화된 비티신 B는 노화 섬유아세포의 자가형광 값을 유의미하게 감소시켰다(도 5C). 노화 섬유아세포의 자가형광 감소는 축적된 리포푸신 감소를 시사한다.

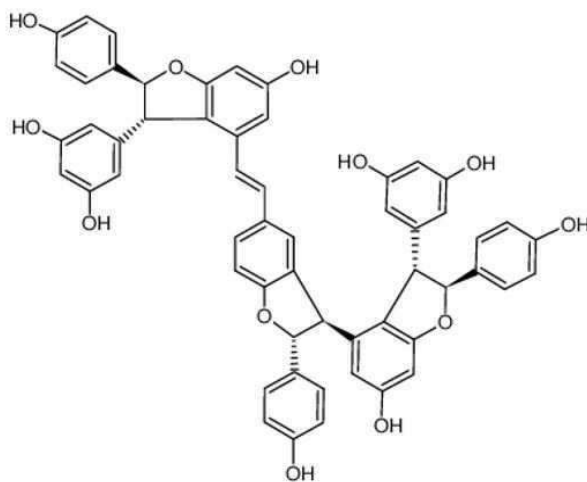
【0099】 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

【청구범위】

【청구항 1】

하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 향노화 조성물;

[화학식 1]



【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 노화는 미토콘드리아의 기능 이상에 의하여 유발되는 것을 특징으로 하는 향노화 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 조성물은 노화 섬유아세포내 ROS(Reactive Oxygen Species)를 감소시키는 것을 특징으로 하는 항노화 조성물.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포내 미토콘드리아 질량(mitochondrial mass)을 감소시키고, 미토콘드리아 막 전위(MMP)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 항노화 조성물.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 조성물은 자가 포식 흐름(autophagy flux)과 세포자살(Apoptosis)을 증가시키는 것을 특징으로 하는 항노화 조성물.

【청구항 6】

제1항에 있어서,

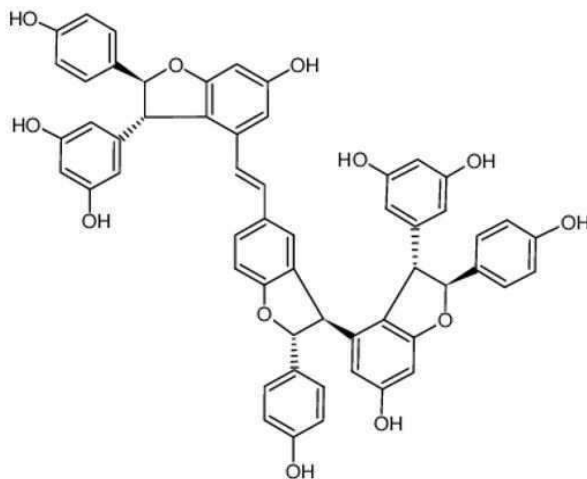
상기 조성물은 자가형광(autofluorescence)을 감소시키는 것을 특징으로 하

는 항노화 조성물.

【청구항 7】

하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아 기능 저하로 인해 유발되는 세포노화 관련 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물;

[화학식 1]



【청구항 8】

제7항에 있어서,

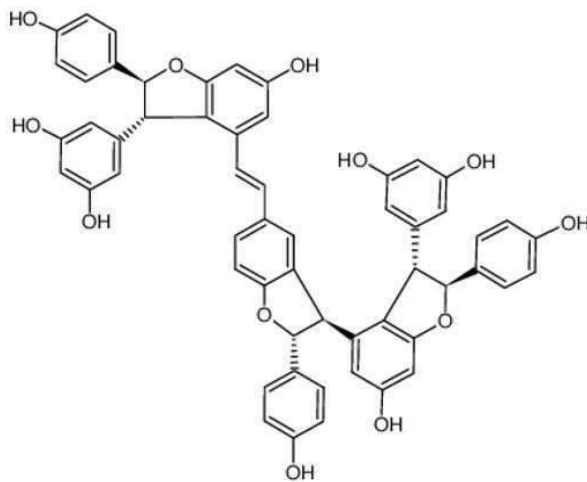
상기 미토콘드리아 기능 저하로 인해 유발되는 세포노화 관련 질병은 프리이드라이히 실조(Friedreich's Ataxia)(FRDA), 콩팥 요세관 산증(renal tubular acidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병, 근위축 측삭 경화증

(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS), 헌팅톤병(Huntington's disease), 전반적 발달 장애(developmental pervasive disorder), 청력 소실(hearing loss), 난청(deafness), 당뇨병, 비만, 당뇨병성 궤양, 인슐린저항성, 간지방증(지방간염)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

【청구항 9】

하기 [화학식 1]로 표시되는 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 피부노화 억제용 화장품 조성물;

[화학식 1]



【요약서】**【요약】**

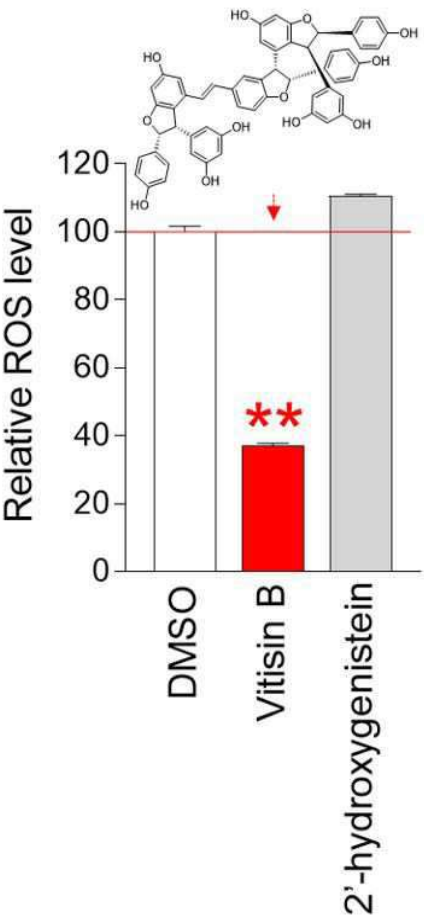
본 발명은 비티신 B를 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물에 관한 것으로, 상기 유효성분인 비티신 B의 경우, 노화 섬유아세포내 ROS(Reactive Oxygen Species)를 감소시키고, 세포내 미토콘드리아 질량(mitochondrial mass)을 감소시키고, 미토콘드리아 막 전위(MMP)를 증가시키고, 자가형광 autofluorescence)을 감소시키고, 자가포식을 활성화 시키는 효과를 나타내므로, 미토콘드리아에 의하여 유발되는 세포 노화를 억제하고, 따라서 상기 비티신 B은 미토콘드리아 기능 저하로 인해 유발되는 세포노화 관련 질병의 예방 또는 치료용 조성물 또는 피부노화 억제용 화장품 조성물로 사용될 수 있다.

【대표도】

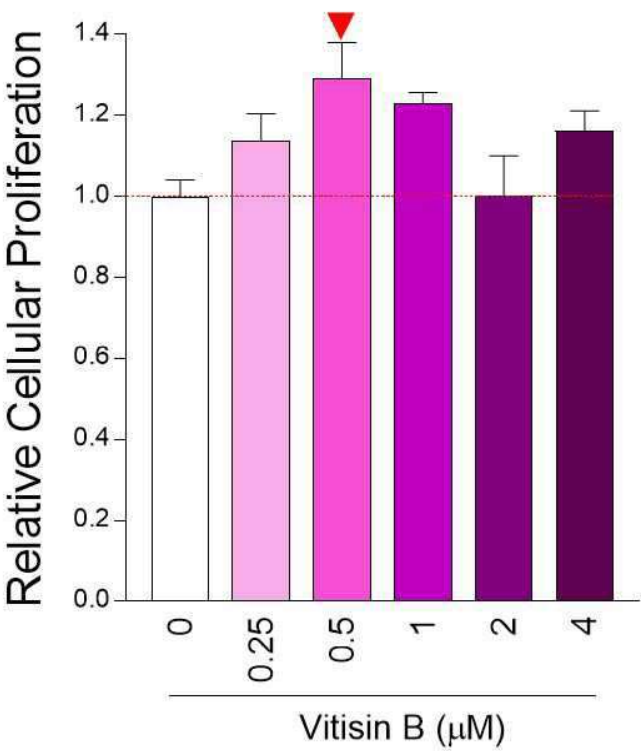
도 1

【도면】

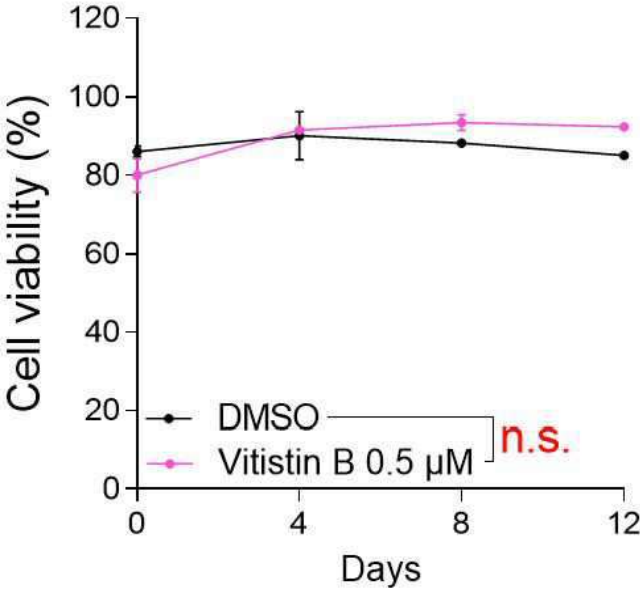
【표 1】



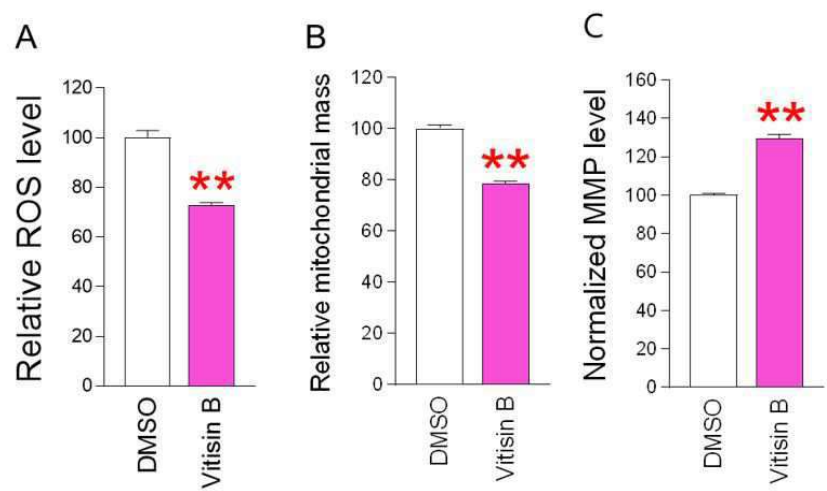
【Fig 2】



【Fig 3】



【표 4】



【표 5】

