	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0054508 (43) 공개일자 2018년05월24일
<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 8/04</i> (2006.01) <i>A45D 44/00</i> (2006.01) <i>A45D 44/22</i> (2006.01) <i>A61K 8/02</i> (2006.01) <i>A61K 8/41</i> (2006.01) <i>A61K 8/64</i> (2006.01) <i>A61K 8/67</i> (2006.01) <i>A61K 8/97</i> (2017.01) <i>A61Q 19/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 <i>A61K 8/042</i> (2013.01) <i>A45D 44/002</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7027837 (22) 출원일자(국제) 2017년09월27일 심사청구일자 2017년09월28일 (85) 번역문제출일자 2017년09월28일 (86) 국제출원번호 PCT/KR2017/010756 (87) 국제공개번호 WO 2018/074763 국제공개일자 2018년04월26일 (30) 우선권주장 PCT/KR2016/011740 2016년10월19일 대한민국(KR)</p>		<p>(71) 출원인 주식회사 넥스모스 경기도 용인시 수지구 신수로 767, 22층 2207호 (동천동, 분당수지유타워지식산업센터)</p> <p>(72) 발명자 손인식 경기도 성남시 분당구 정자일로 72 청솔마을한라아파트 304동 1104호</p> <p>(74) 대리인 구현서</p>

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **압타머를 이용한 항산화 물질의 산화 방지 방법, 물질, 그 용도**

(57) 요약

본 발명은 항산화물질의 산화방지 방법, 그 물질 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항산화 물질에 압타머를 처리하여 항산화물질의 산화를 방지하는 방법, 그러한 활성을 가지는 압타머 및 그 압타머를 이용한 의약품, 화장품, 및 식품 등의 다양한 분야에 응용에 관한 것이다. 본 발명의 압타머는 비타민C와 같은 항산화 물질의 산화방지 효과를 가져서 본 발명의 압타머는 항산화 물질의 산화방지가 필요한 의약품, 화장품, 및 식품 등의 다양한 분야에서 응용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A45D 44/22 (2013.01)
A61K 8/0212 (2013.01)
A61K 8/41 (2013.01)
A61K 8/64 (2013.01)
A61K 8/671 (2013.01)
A61K 8/676 (2013.01)
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항산화 물질에 압타머를 처리하여 항산화물질의 산화를 방지하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항산화 물질은 비타민 C, 비타민 A, 레티놀, 비타민E, 아스타잔틴, 레스베라티놀, 폴리페놀, 코엔자임 Q10, 펩티드 및 오일로 구성된 군으로부터 선택된 물질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 압타머는 서열번호 1 또는 2에 기재된 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 항산화물질의 산화를 방지하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항산화 물질이 비타민 C인 경우에 상기 압타머는 비타민 C의 락톤 링의 2번째 및 3번째 OH기의 산화를 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

항산화물질의 산화를 방지하는 압타머.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항산화 물질은 비타민 C, 비타민 A, 레티놀, 비타민E, 아스타잔틴, 레스베라티놀, 폴리페놀, 코엔자임 Q10, 펩티드 및 오일로 구성된 군으로부터 선택된 물질인 것을 특징으로 하는 압타머.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 압타머는 서열번호 1 또는 2에 기재된 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 압타머.

청구항 8

- 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 압타머에 아민기를 결합시키는 단계;
- 하이드로젤 모노머의 Hydroxyl 기를 epoxy기를 가지고 있는 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (3-GPTMS)로 silanizing 후 이 epoxy기에 상기 압타머에 결합되어 있는 아민기를 결합시키는 단계; 및
- 상기 하이드로젤 모노머를 중합시키는 단계를 포함하는 압타머가 트랩된 하이드로젤의 제조방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 방법은 상기 a) 단계의 압타머에 결합되어 있는 아민기에 바이오틴을 결합시킨 후 스트랩타비딘을 갖고 있는 입자와 반응시킨 후에 하이드로젤 중합반응시에 상기 압타머를 가지는 입자를 하이드로젤 모노머와 혼합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 압타머가 트랩된 하이드로젤의 제조방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 방법은 하이드로젤의 하이드록시기에 화학적 방법으로 압타머에 붙어있는 아민기나 카르복시기를 결합시키는 것을 특징으로 하는 압타머가 트랩된 하이드로젤의 제조방법.

청구항 11

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 제조된 압타머가 트랩된 하이드로젤.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 하이드로젤 팩은 하이드로젤 표면에 압타머가 부착되고 상기 압타머의 말단에는 특정 성분이 부착된 것을 특징으로 하는 압타머가 트랩된 하이드로젤.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 특정 성분은 피부노화방지, 주름제거, 미백, 또는 보습효과를 가지는 성분인 것을 특징으로 하는 압타머가 트랩된 하이드로젤.

청구항 14

제 11항의 압타머가 트랩된 하이드로젤을 포함하는 화장품 조성물.

청구항 15

제 11항의 압타머가 트랩된 하이드로젤을 피부에 도포하여, 상기 하이드로젤로부터 성분이 결합된 압타머가 피부 내로 침투하게 한 후, 상기 성분이 결합된 압타머가 타겟 물질과 결합한 후 성분을 방출하는 단계를 포함하는 피부에서 분비되는 타겟 물질의 양에 따라 피부 활성 물질의 방출을 조절하는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 타겟 물질은 ATP인 것을 특징으로 하는 피부에서 분비되는 타겟 물질의 양에 따라 피부 활성 물질의 방출을 조절하는 방법.

청구항 17

제 5항의 항산화물질의 산화를 방지하는 압타머를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 항산화 물질은 비타민 C, 비타민 A, 레티놀, 비타민E, 아스타잔틴, 레스베라티놀, 폴리페놀, 코엔자임 Q10, 펩티드 및 오일로 구성된 군으로부터 선택된 물질인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 압타머는 서열번호 1 또는 2에 기재된 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 20

제 17항에 있어서, 상기 식품은 음료, 과자류, 캔디류, 유제품, 껌류, 장류, 빵류, 및 아이스크림으로 구성된 군으로부터 선택된 식품인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 압타머를 이용한 항산화 물질의 산화 방지 방법, 물질, 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항산화 물질들 중 대표적인 성분의 하나인 Ascorbic acid (Vitamin C)는 그것의 자유기의 중성화를 통한 항산화 활성으로 인하여 의약, 화장품 및 식품과 음료 산업에서 널리 사용되고 있다. 식품 보조제 및/또는 의약적 활성 성분으로 사용될 때 AA의 이점은 산업 재해(타이어 및 고무 공장 화장품 제조 공장)에서 발생할 수 있는 ZnO NPs 흡입으로 인해 생기는 급성 폐세포 산화과정을 AA를 첨가한 식수를 공급하여 억제한다고 보고되었다. 수십 조원 규모에 이르는 이들 산업에서는 주요 해결책으로 비타민 C가 공통적으로 사용되는 것으로 알려졌다.

[0003] AA는 그 항산화 능력으로 인해 본질적으로 산화에 의하여 쉽게 분해될 수 있다 AA의 산화에 영향을 미치는 주요 인자는 온도, pH, 산소, 금속 이온, 빛 및 효소 등이다. AA를 주 성분으로 사용하는 산업에서는 이러한 산화 분해되는 특성으로 인해 생산품의 저장 기간 및 효과에 모두 영향을 미치기 때문에 당면한 문제로 오랫동안 인식되어 왔다. 따라서 이들 산업에서 AA의 산화적 분해에 대한 이해 뿐만 아니라 새롭고 더 우수한 방법을 개발하

고 발견하는 것에 많은 연구와 비용이 투자되고 있다.

[0004] 한편 노화를 촉진하는 원인들은 여러 가지가 있으나 그 중에서도 활성 산소계(Reactive Oxygen species: ROS)가 상당히 주요한 원인 중 하나인 것으로 받아들여지고 있다. 이러한 활성 산소는 에너지 대사과정, 면역 반응 등에서 필수 불가결하게 생성되며, 외부의 유해 환경에 의해서도 유발되는 피할 수 없는 자극이다. 활성 산소는 반응성이 매우 커서 체내에서 DNA 변성, 과도한 신호전달 유발 및 단백질 변성 등을 초래하여 건강에 해로운 영향을 누적하는 일련의 반응을 일으키게 된다. 그러나, 이러한 유해한 반응들은 생체 내에 존재하는 항산화 물질(uric acid, vit.C, vit.E 등) 또는 항산화 효소(Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase 등)에 의해 정교하게 그 항상성을 유지하도록 되어 있다. 그러나, 내인성 노화에 따른 항산화 시스템의 노쇠와 지속적인 유해 자극에 의한 활성 산소의 축적은 이러한 균형을 깨뜨려 건강을 해치게 되며 노화를 촉진시키고, 피부질환, 피부암, 동맥경화 및 혈전과 같은 각종 질병을 유발하기도 한다(Laure Rittie et al., Ageing Research Reviews, 1, 705-720, 2002; Cutler RG, Annals of the New York Academy of Sciences, 1055, 93-135, 2005).

[0005] 따라서, 활성 산소계의 형성을 억제하거나, 형성된 활성 산소계를 제거하는 항산화 물질에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 항산화 물질은 인체 내에 자연적으로 존재하는 것과 외부에서 투여해 주는 것으로 나눌 수 있는데 인체 내에 자연적으로 존재하는 항산화 물질로는 과산화 억제효소(superoxide dismutase, SOD), 글루타치온(glutathione), 퍼옥시다아제(peroxidase) 및 카탈라아제(catalase) 등의 효소가 있으며, 외부에서 투여해 주는 것으로는 캄페롤(kaempferol), 카테킨(catechin) 및 제니스테인(genistein) 등의 피토케미컬(phytochemical); 비타민 E, 비타민 C 및 베타카로틴; 및 셀레늄 등의 미네랄이 있다.

[0006] 햇빛으로부터 조사되는 자외선A (UVA)와 자외선B (UVB), 공해물질, 스트레스, 흡연, 음주, 지방성 음식물 등으로 인해 발생하는 유리기 (free radical) 와 활성산소 (oxygen free radical) 등에 의해 세포는 공격을 받으며, 이런 물질들로 부터 적절한 보호가 이루어 지지 않을 경우 세포는 노화하거나 사멸하게 된다. 피부의 경우 이런 물질들로 인해 콜라겐이나 엘라스틴 등의 물질의 생산이 줄어들거나 변성되어서 피부가 탄력을 잃고 주름이 생기게 된다. 이를 방지하기 위해 Vitamin A, C, E 등의 항산화 물질들을 포함한 제제를 피부에 도포, 피부내로 흡수 시킴으로서 이러한 유해 활성물질에 의한 산화를 막는 것이 피부의 노화를 막는 데에 중요한 것으로 공지되어 있다. 하지만 합성 Vitamin C는 공기 중에서 쉽게 산화되어 그 항산화 작용이 사라지게 되는 문제점으로 인해 보관기간이 긴 다양한 제형을 제조하는데 문제가 있다.

[0007] 또한 환원력이 매우 높은 비타민C는 산화전위가 높은 물질에 매우 민감하게 반응하여 비타민C가 급속히 산화된다. 비타민C는 산화됨으로써 그 효능이 훼손됨은 이미 잘 알려진 사실이다. 물은 산화전위가 높아서 비타민C가 매우 민감하게 반응하여 급속히 산화된다.

[0008] 따라서 비타민 C를 포함하는 항산화 물질의 산화를 억제하는 새로운 방법 내지는 물질에 대한 필요성은 오랫동안 존재하여 오고 있다.

[0009] 또한 압타머를 이용하여 항산화 물질의 산화를 방지하는 것은 기존의 방법에 비교하여, 안전하고 혁신적인 새로운 개념의 접근으로서, 이를 각종 산업에 적용하여 효과를 극대화 할 수 있도록 제조가 가능하다. 특히, 기존의 Chemical 기반의 화장품, 영양보조제, 식품 시장을 획기적으로 DNA(BIO) 기반의 시장으로 변화시키는 기폭제가 될 것이다. 또한 각종 산업 부분에서 다양하게 이용될 수 있다. 향후, DNA 시장의 폭발적인 증가와 혁신적인 솔루션을 제공할 것으로 예상된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공고번호 제10-1197677호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출 된 것으로서 본 발명의 목적은 항산화 물질의 산화 방지 방법을 제공하는 것이다.

- [0012] 본 발명의 다른 목적은 항산화 물질의 산화 방지 작용을 하는 물질을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 항산화 성분과 결합된 항산화성분의 산화방지 작용을 하는 물질로 기능화시킨 하이드로겔을 제공하는 것이다. 그 화합물질은 피부 활성 성분의 방출(Release) 속도를 조절하고, 피부에서 분비되는 특정물질의 양에 따라 피부 활성 물질의 방출(Release) 성분을 조절하는 기능을 가진다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 항산화 성분의 산화 방지 작용을 하는 물질을 이용해 화장품, 헤어 영양제, 헤어염색제 및 국소용 피부 치료제 또한 영양보조제로써 용도를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 Vitamin C의 환원 상태를 유지해서 그 항산화 기능을 장기간 유지하게 하는 물질을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 Vitamin C의 환원 상태를 물 등의 액체에서 장기간 유지하게 하는 방법을 통해 식음료 및 식품을 제조하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 항산화 물질에 압타머를 처리하여 항산화물질의 산화 속도를 감소하여 그 환원력을 유지시키는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항산화 물질은 비타민 C, 비타민 A, 레티놀, 비타민E, 아스타잔틴, 레스베라티놀, 폴리페놀, 코엔자임 Q10, 펩티드 및 오일로 구성된 군으로부터 선택된 물질인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 압타머의 한 예로 서열번호 1 또는 2에 기재된 염기서열로 이루어진 것이 바람직하나, 상기 압타머 이외에도 본 발명의 실시예 등을 통하여 입증된 것과 같이 다른 서열을 가지며 본 발명의 목적하고자 하는 효과를 달성하는 모든 압타머는 본 발명의 보호범위에 포함된다.
- [0020] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 항산화 물질이 비타민 C인 경우에 압타머는 비타민 C의 락톤 링의 2번째 및 3번째 OH기의 산화를 억제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0021] 본 발명에서, 압타민은 항산화물질과 압타머의 복합체라 정의한다. 예를들어 압타민 C는 비타민C와 압타머의 복합체를 의미한다.
- [0022] 1.Aptamer 기반의 Hydrogel을 이용한 화장품 응용 예
- [0023] 본 발명은 항산화물질의 산화 속도를 감소시키는하는 압타머를 제공한다.
- [0024] 본 발명은 a) 상기 본 발명의 압타머에 아민기를 결합시키는 단계;b) 하이드로젤 모노머의 Hydroxyl 기를 epoxy기를 가지고 있는 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (3-GPTMS)로 silanizing 후 이 epoxy기에 상기 압타머에 결합되어 있는 아민기를 결합시키는 단계;및 c) 상기 하이드로젤 모노머를 중합시키는 단계를 포함하는 압타머가 트랩된 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 a) 단계의 압타머에 결합되어 있는 아민기에 바이오틴을 결합시킨 후 스트렙타비딘을 갖고 있는 입자와 반응시킨 후에 하이드로젤 중합반응시에 상기 압타머를 가지는 입자를 하이드로젤 모노머와 혼합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0026] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 하이드로젤의 하이드록시기에 화학적 방법으로 압타머에 붙어있는 아민기나 카르복시기를 결합시키는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 또 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 압타머가 트랩된 하이드로젤을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로젤은 하이드로젤 표면에 압타머가 부착되고 상기 압타머의 말단에는 특정 성분이 부착된 것을 특징으로 하고, 상기 특정 성분은 피부노화방지, 주름제거, 미백, 보습 효과를 가지는 성분을 특징으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0029] 또한 본 발명의 특정 성분은 어떠한 종류의 추출물, 활성물질에 상관없이 화장품에서 사용되는 모든 원료를 사용할 수 있다. 그 예로, 미백에 좋은 녹차추출물, 감초추출물, 닥나무추출물, 상백피추출물, 황금추출물, 푸에리라리아추출물, 홍삼추출물과 노화예방에 좋은 살구추출물, 오일추출물, 오렌지추출물, 레몬추출물, 대나무추출물 구아바추출물 로즈마리추출물 산수유추출물, 영지추출물 은행추출물 서시옥속산추출물 자음단추출물, 보습에 좋은 모과추출물, 백련초추출물, 파프리카추출물, 알로에추출물, 수세미추출물, 해초추출물, 항산화 효과가

있는 당근추출물, 대두추출물, 자몽씨추출물, 포도씨추출물, 마치현추출물, 주름개선에 도움이 되는 캐비어, 석류, 인삼추출물, 피부재생에 도움이 되는 복숭아추출물, 천궁추출물, 아토피에 좋은 병풀추출물, 캐모마일추출물, 자초근추출물, 고삼추출물, 당귀추출물, 여드름에 좋은 박하추출물, 삼백초추출물, 어성초추출물, 작약추출물, 향염 및 향균에 좋은 목초 액, 민들레추출물, 카렌둘라추출물, 황백피추출물, 탕자추출물, 황금추출물, 회향추출물, 컴프리추출물, 모공수축에 도움을 주는 율피추출물, 녹차추출물, 보습기능을 하는 글리세린, 판테놀, 히아루론산, 세라마이드, 베타글루칸, 미백효과가 있는 알부틴, 비타민C, 화이텐스, 레티놀, 아스타잔틴, 레스베라티놀, 폴리페놀, 탄력에 좋은 엘라스틴, 콜라겐, 코엔자임Q10, 이펙틴, EGF, 항염증 향균제인 프로폴리스, 알란토인, 피토스탄, 인프라스, 항산화제 비타민E(천연토코페롤) ROE(로즈마리오일추출물), 자몽씨추출물 등 다양한 추출물이 적용된다.

- [0030] 또 본 발명은 상기 본 발명의 압타머가 트랩된 하이드로젤을 포함하는 화장품 조성물을 제공한다.
- [0031] 또 본 발명은 상기 본 발명의 압타머가 트랩된 하이드로젤을 피부에 도포하여, 상기 하이드로젤로부터 성분이 결합된 압타머가 피부 내로 침투하게 한 후, 상기 성분이 결합된 압타머가 타겟 물질과 결합한 후 피부에서 분비되는 타겟 물질의 양에 따라 피부 활성 물질의 방출을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 타겟 물질은 ATP인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0033] 본 발명의 압타머로 기능화시킨 항산화물질을 Hydrogel에 트랩시켜서, 비타민C, 펩타이드, 레티놀 등 피부 미백, 주름개선, 노화방지 등에 탁월한 효능이 증명된 물질의 산화를 억제하며, 젤로부터 서서히 방출하므로, 보다 향상된 효과를 기대할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 압타머-하이드로젤을 이용한 화장품 원료/재료의 용도를 다음과 같이 요약된다.
- [0035] 널리 알려진 바와 같이, 비타민C, 펩타이드, 레티놀 등 기능성 화장품의 주요 재료로 사용되는 물질들의 경우 매우 불안정한 물질들로서 공기중에 노출될 경우 쉽게 산소와 결합하여(산화) 그 기능을 빠르게 상실하게 된다. 압타머를 통해 이들 물질을 캡슐화하도록 하여 그 물질들과 산소와의 결합(산화작용)을 억제하도록 하여 물질들을 최대한 안정하게 지속(기능의 지속)시키는 역할을 부여한다.
- [0036] 압타머를 통해 피부 활성 성분의 방출(Release) 속도를 조절하는 것이다. 대개의 Hydrogel의 경우 치밀하지 않은 구조로 인해 여러 종류의 물질에 대한 투과율이 높고 이에 따라 포함된 물질을 쉽게 내보내게 된다. 특정 피부 활성 물질과 반응하는 압타머를 Hydrogel에 포함시킬 경우, 압타머의 물질에 대한 결합력을 조절 함으로서 이 물질의 분비 속도를 조절할 수 있음이 실험적으로 증명되어 있다.
- [0037] 피부에서 분비되는 특정물질의 양에 따라 피부 활성 물질의 방출(Release) 성분을 조절하는 기능이다. 애포타센싱(Aptasensing)이라 불리는 이 기술은 피부의 여러 상태를 보다 먼저 감지해서 그 상태에 맞추어 피부에 필요한 물질을 방출(Release)시키는 방법으로 미용 및 치료 등 여러 방면에 이용이 가능한 방법이다. 피부의 온도에 따라 다른 농도로 분비되는 ATP를 감지하거나, 피부의 상태에 따라 분비되는 사이토카인(Cytokines) 등을 압타머가 감지한 후 이에 맞춰 피부 활성 성분을 분비하는 시스템을 구현할 수 있다. 이에 따라 적당량의 항노화 물질을 분비하도록 함으로서 지속시간을 조절하거나 피부에 불필요한 과부하를 줄일 수 있도록 디자인할 수 있다.
- [0038] 압타머란 single strand DNA나 RNA의 삼차원구조를 이용해 특정 물질을 검출하는 방법으로 항원-항체 반응과 비슷하나 물질의 사이즈가 훨씬 작고, 다양한 방법으로 그 활성을 조절할 수 있으며, 항체에 비해 생산과 보관이 용이한 장점이 있다. 또한 항체와 달리 사이즈가 아주 작은 화학물질(비타민)등에 결합하는 압타머를 합성할 수도 있으며 화학적 합성에 의해 제조되므로 그 효능을 일정하게 유지하는 데 용이하다.
- [0039] Vitamin C는 수용성의 6개의 탄소 화합물로, furan 링의 3-,4-, 탄소가 dihydroxy 폼으로 존재하는 환원형과 이부위가 각각 산화된 semidehydroascorbic acid와 dehydroascorbic acid가 있다.
- [0040] 본 발명의 압타머(RNA나 DNA)를 구성하는 염기와 Vitamin C의 hydroxyl group의 수소결합 결합을 통해 Vitamin C의 환원 상태를 유지하게 된다(도 1).
- [0041] 본 발명의 압타머와 결합하여 환원상태를 유지하고 있는 Vitamin C를 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산, 펩티드 등을 포함하는 크림 타입 혹은 하이드로젤 타입의 다양한 제형의 피부미용 조성물과 영양보조제에 사용할 수 있다.
- [0042] 본 발명은 또한 피부의 상태나 외부자극에 따라(예컨대 자외선이나 피부의 온도나 산도) 다르게 반응하는 압타머를 통해(Aptasensing) 피부의 다양한 컨디션에 따라 Vitamin C를 서서히 방출하게 하는 방법을 포함한다. 예

컨데 피부의 자외선 조사에 따라 압타머의 구조가 바뀌면 결합된 Vitamin C가 방출되게 하거나, 피부의 온도나 산도의 변화에 따라 ATP양이 바뀔 때 이에 결합하는 압타머의 구조가 바뀜으로서 Vitamin C를 방출하게 하는 방법 등을 포함한다.

[0043] 또 본 발명은 상기 본 발명의 압타머와 항산화물질 복합체를 유효성분으로 포함하는 다양한 제형 (SERUM, Gel, lotion, cream, toner, Mask pack 등등) 화장품과 헤어 영양제 및 염색제에 사용하는 것을 포함한다.

[0044] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화장료 조성물은 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산, 및 펩티드 중 하나 이상을 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0045] 2.Aptamer 또는 압타머-항산화 성분 복합체를 이용한 영양보조제

[0046] 본 발명은 상기 본 발명의 압타머와 항산화 물질 복합체 또는 압타머를 단독으로 유효성분으로 포함하는 영양 보조제 조성물을 제공한다.

[0047] 본 발명의 영양 보조제에 적합한 비타민의 예는 비타민 A, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 K, 비타민 B 6 , 비타민 B 12 , 티아민, 리보플라빈, 비오틴, 폴산, 니아신, 판토텐산, 이들의 혼합물 등이다. 영양 보조제 조성물에 포함될 적합한 미네랄 영양소의 예는 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 인, 황, 염소, 철, 구리, 요오드, 아연, 셀레늄, 망간, 크롬, 몰리브덴, 불소, 코발트, 이들의 화합물에서 선택되는 한가지이상의 원소를 보유하는 것들이다.

[0048] 다양한 허브도 영양 보조제로 사용될 수 있다. 일반적으로, 허브는 다양한 의약이나 식이 보조제 특성을 갖는 것들로부터 선택된다. 일반적으로, 허브는 의약품 또는 풍미용으로 사용될 수 있는 방향족 식물이나 식물의 일 부분이다.

[0049] 또 본 발명은 항산화 물질에 압타머를 결합시켜 항산화물질의 환원 상태를 유지하여 산화속도를 지연시키는하는 방법을 제공한다.

[0050] 이하 본 발명을 설명한다.

[0051] 본 발명은 Vitamin C와 마찬가지로 Vitamin A(Retinol), Vitamin E, 아스타잔틴, 레스베라티놀, 폴리페놀, 코엔자임 Q10, Peptide, Oil 등 산화에 매우 불안정한 항산화 물질들을 압타머와 결합하여 영양보조제로 제조 사용할 수 있다. 이를 통하여 물질들의 산화(부패)를 방지하게 함으로써 그 물질들이 요구하는 효과를 최대한 유지하도록 한다. 또한, 이를 압타센싱을 통해 목표로 하는 조건에서 방출하도록 함으로써 그 효과를 최대한 증가시킬 수 있다.

[0052] 또한 본 발명은 그 항산화 성분에 맞게 개발된 압타머와 항산화성분 복합체로 제공하거나 활성상태의 압타머와 항산화성분을 개별적으로 제공한다.

[0053] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항산화 물질은 비타민 C, 비타민 A, 레티놀, 비타민E, 아스타잔틴, 레스베라트롤, 4'-아세톡시레스베라트롤(Acetoxy Resveratrol), 카테킨, 각종폴리페놀류, 에피갈로카테킨 갈레이트, 코엔자임 Q10, 유비퀴놀, 유비퀴논, 오메가 3, 및 오일로 구성된 군으로부터 선택된 물질인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0054] 3.Aptamer 및/또는 항산화 물질 복합체를 이용한 식음료 및 식품 조성물

[0055] 본 발명은 상기 본 발명의 압타머와 항산화물질 복합체를 유효성분으로 포함하거나 음료에 압타머를 단독으로 포함하는 음료 조성물을 제공한다.

[0056] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산, 및 펩티드 중 하나 이상을 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0057] 또 본 발명은 상기 본 발명의 압타머 및/또는 항산화물질을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0058] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식품 조성물은 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산, 및 펩티드 중 하나 이상을 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0059] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식품 조성물은 과자류, 캔디류, 유제품, 껌류, 또는 장류, 빵류, 또는 아이스크림인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0060] 또 본 발명은 상기 본 발명의 압타머를 식품에 첨가하여 식품을 제조하는 방법을 제공한다.

[0061] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 식품, 음료 조성물은 체내에 흡수되어 압타머의 구조가 바뀌면 결합된 비타민 C가 방출되게 하거나, 체내의 환경 변화에 따라 ATP양이 바뀔 때 이에 결합하는 압타머의 구조가 바뀌므로서 비타민 C를 방출하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

발명의 효과

[0062] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 압타머는 비타민C와 같은 항산화 물질의 산화방지 효과를 가지며, 본 발명의 압타머가 트랩된 하이드로젤은 압타머를 통해 피부 활성 성분의 방출(Release) 속도를 조절하고, 피부에서 분비되는 특정물질의 양에 따라 항산화물질의 방출(Release) 성분을 조절하는 기능을 가질 것으로 예상된다.

[0063] 본 발명의 압타머는 비타민C와 같은 항산화 물질의 산화방지 효과를 가지며, 본 발명의 압타머 단독 또는 압타머와 항산화물질의 복합체는 예를 들어, Vitamin C (ascorbic acid)에 선택적으로 결합하는 압타머를 이용해 Vitamin C의 환원 상태를 유지해서 그 항산화 기능을 장기간 유지하게 하여 다양한 제형의 기능성 화장품과 경구용 영양보조제 (dietary supplements) 등에 이용할 수 있다. Vitamin C 에 선택적으로 결합하는 압타머를 이용해 작은 양의 Vitamin C 로도 지속적이고 극대화된 항산화 효과를 기대할 수 있다.

[0064] 또한 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명은 Vitamin C (ascorbic acid)에 선택적으로 결합하는 압타머를 이용해 Vitamin C 등 생리활성 성분의 환원 상태를 유지해서 그 항산화 기능을 장기간 유지하게 하여 다양한 건강 음료, 항산화 음료 및 항산화 식품 등에 이용할 수 있다.

[0065] 또한 압타머를 이용하여 항산화 물질의 산화를 방지하는 것은 기존의 방법에 비교하여, 안전하고 혁신적인 새로운 개념의 접근으로서, 이를 각종 산업에 적용하여 효과를 볼 수 있도록 제도가 가능하다. 특히, 기존의 Chemical 기반의 화장품, 영양보조제, 식품 시장을 획기적으로 DNA(BIO) 기반의 시장으로 변화시키는 기폭제가 될 것이다. 향후, DNA 시장의 폭발적인 증가와 혁신적인 솔루션을 제공할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 압타머 (RNA나 DNA)를 구성하는 염기와 Vitamin C의 hydroxyl group의 수소결합 결합을 통해 Vitamin C의 환원 상태를 유지하는 그림,

도면 2-4; 압타머 A,B,C 관련 실험 데이터로, 도 2는 DHA 검출 방해 분석을 나타낸 그림으로 각 압타머 존재에서 DHA 검출(OPDA 형광)의 시간 경과 그래프임. 압타머 B 및 C에 대한 그래프는 대조군과 다소 차이가 있고, 압타머 A는 대조군에서 벗어나지 않아서 22번이 검출 분석을 방해하지 않는다는 것을 나타낸다.

도 3은 산화제에 대한 압타머들에 의한 AA의 산화적 보호를 나타낸 그림, 10.3 μM CuSO₄, 103.3 μM NaIO₄, 10.3 μM H₂O₂, 및 103.3 μM TEMPOL에서 대조군들과 압타머 A의 오버레이, 도 4는 AA에 대한 압타머 적정을 나타낸 그림, 적정 데이터는 AA의 산화적 보호가 압타머 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 나타낸다.

도 5는 vitaminwater®에서 시간 경과에 따른 AA 보호를 나타낸 그림으로, vitaminwater®에서 168시간 동안 압타머 A 존재 및 부존재 하에서 AA의 분해를 비교한 그래프.

도면 6-14 ; 압타머 #1,2,3 관련 시험 데이터, 도6부터 8까지는 본 발명의 세 개의 압타머가 과산화수소수에 의한 비타민C 산화를 방지하는 것을 보여주는 그림, 도 9 내지 14는 본 발명의 압타머의 AA(ascorbic acid) 및 DHA(dehydroascorbic acid)에 대한 해리 상수(KD) 그래프,

도 15 내지 16은 본 발명의 압타머를 이용한 기능성 스마트 하이드로젤 제조 방법을 나타낸 그림,

도 17 내지 19는 본 발명의 압타머가 트랩된 하이드로젤을 애플센싱 과정을 나타낸 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하 본 발명을 비한정적인 실시예를 통하여 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0068] 본 발명에서는 타겟(AA)을 신속하게 산화되지 않기 위하여, 모든 버퍼와 용액들을 Chelex® 100 resin (BioRad)에서 1시간 교반하고, 0.2 μm 필터(Sarstedt)를 통하여 여과하였고, N₂ gas (Praxair)로 10분간 살포하여 우발적인 금속을 제거한 분자 생물학 급 워터(Phenix Research)를 사용하여 제조하였다.

- [0069] 실시예 1: DNA aptamer 선택 및 서열 분석
- [0070] Ascorbic Acid SELEX:
- [0071] Ascorbic acid에 대한 9 라운드의 SELEX를 $\sim 10^{15}$ 독특한 올리고뉴클레오타이드로 구성된 DNA library (BasePair Biotechnologies)를 사용하여 수행하였다. 사용된 버퍼 조성은 다음과 같다: 50 mM Sodium Acetate pH 5.5 (Sigma), 1 mM MgCl₂ (Sigma), 0.05% Tween 20 (Sigma), 1% BSA (Sigma) 및 1 mM glutathione (Sigma). The stringency of the SELEX의 스트린전시를 타겟에 대한 압타머의 결합시간을 감소시키고, 버퍼 조성을 변경하고 자유 분자 용출에서 타겟의 농도를 감소시켜 변경하였다. DHA에 대한 네가티브 선택을 풍부한 (enriched) 라이브리리로부터 산화형태의 Ascorbic acid에 결합하는 압타머들을 제거하기 위하여 수행하였다.
- [0072] 실시예 2: ascorbic acid 산화 산물들에 대한 형광 분석
- [0073] ascorbic acid의 산화를 Vislisl 등(Vislisl, J.M., Schafer, F.Q. and Buettner, G.R. (2007) Analytical biochemistry, 365, 31-39)에 기재된 방법을 변형하여, 산화된 산물 dehydroascorbic acid (DHA)를 검출하여 역으로 측정하였다.
- [0074] 요약하면, 압타머들(41.3 μ M)을 산화제(10.3 μ M for CuSO₄ (EM Science) 및 H₂O₂ (Sigma), 103.3 μ M for TEMPOL (Sigma) 및 NaIO₄ (Sigma)) 첨가 전에 상온에서 30분간 4X 농도에서 AA (10.3 μ M)로 배양하였다. OPDA dye (Sigma)를 첨가하기 전에 산화제 샘플의 첨가 후 상온에서 10분간 배양하였다. 염료(954.6 μ M) 샘플 첨가 직후 대조군이 수렴될 때까지 60초 간격으로 45분간 SpectraMax® i3X plate 리더(Molecular Devices)로 여기 345 nm; 방출: 425 nm 조건에서 읽었다. 스크리닝 데이터가 AA 보호를 나타내고, 산화 산물(DHA) 또는 분석 염료(OPDA)의 간섭이 없다는 것을 확인하기 위해, 형광 분석을 DHA (10.3 μ M) (Sigma)를 AA의 자리에서 배양된 선택된 압타머로 반복하였다. 모든 분석을 50mM sodium acetate (Sigma), 1% BSA (Sigma), 0.05% Tween 20 (Sigma), 1 mM MgCl₂ (Sigma) adjusted to pH 5.5로 보정하여서 수행하였다. 모든 형광 분석들은 블랙 384-웰 플레이트(greiner bio-one)에서 수행하였다. 각 샘플을 3회 반복 수행하였다.
- [0075] 실시예 3: AA에 대한 압타머 적정
- [0076] 최적 압타머(A)의 유효 농도를 결정하기 위하여 그것을 AA (10.3 μ M)에 대해 적정하였다. AA에 대한 압타머의 상대적인 농도는 10x, 5x, 2x, 1x, 0.5x, 0.25x 및 0.1x (103 μ M에서 1.03 μ M 압타머)이었다. 모든 압타머/AA 혼합물을 10.3 μ M CuSO₄ 첨가 전에 30분간 상온에서 배양하고, 샘플을 954.6 μ M OPDA의 첨가 전에 10분 더 상온에서 배양하였다. 플레이트를 ex: 345nm; em: 425nm에서 45분간 읽었고, 매 60 s 마다 데이터를 모았다. 각 샘플을 3회 반복 수행하였다.
- [0077] 실시예 4: 압타머 친화도 측정
- [0078] ascorbic acid 및 dehydroascorbic acid와 같은 물질들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. AA 및 DHA에 대한 압타머에 대한 친화도 측정은 MST(microscale-thermophoresis)를 사용하여 수행하였다 (Jerabek-willemsen M et al. Assay and drug development technologies. 2011;9(4):342-53). 요약하면 Cy5-컨쥬게이트된 압타머(5nM)를 50uM에서 1.53n M까지 타겟(AA 또는 DHA)의 16 연속 희석과 배양하였다. 스캐닝 모세관 튜브(4uL/튜브)로 로딩하기 전에 15분 동안 혼합물을 배양하였다. 각 샘플의 형광을 Monolith NT.115 MST 장치(NanoTemper Technologies)를 사용하여 열 구배에 노출시키는 동안 측정하여 결합 곡선을 만들었다. 각 분석은 3회 반복 수행하였다.
- [0079] 실시예 5: 질량 분광법
- [0080] 샘플 제조:
- [0081] 압타머 A (50uM)를 vitaminwater® (kiwi-strawberry) (Glaxo, Coca-cola)에 배양하였다. 샘플을 상온에서 배양하고 10uL를 0h, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 및 168h에서 수집하였다. Ascorbic acid (Cerilliant Cat# V-038) 및 dehydroascorbic acid (Sigma-Aldrich Cat#261556) 대조군을 LC-MS/MS 분석 동안 AA 및 DHA 안정성을 모니터링하기 위하여 각 시점 전 후에 주사하였다. 각 샘플 및 대조군을 각 샘플 및 대조군을 ascorbic acid 내부 표준물질 C13 (Toronto Research Chemicals Cat#A786992)로 200ng/mL 최종 농도로 스파이크하였다. AA 스톡 용액(Cerilliant 1 mg/mL in acetonitrile:H₂O, 50:50)을 10ug/mL 및 AA-C13로 1000ng/mL로 희석하였다. 10uL의 AA (2ug/mL)를 90uL의 AA-C13로 1000ng/mL로 희석하여 각각 AA 및 AA-C13로부터 최종 농도 1000ng/mL 및 900ng/mL를 얻었다. DHA 대조군을 900ng/mL의 AA-C13로 1ug/mL의 최종 농도로 제조하였다. 10uL의 각 시점

샘플을 동일한 내부 표준물질 용액에서 1:200로 희석하여서 LC-MS/MS로 분석하였다.

[0082] LC-MS/MS 파라미터(MRM):

[0083] 인식(Acquisition)을 Eksigent μ UHPLC (Eksigent, Redwood City, CA, USA)로 커플되고 50 μ m iD 캐필러리를 가지는 전자분무 인터페이스를 구비한 ABSciex QTRAP 6500 (ABSciex, Foster City, CA, USA)로 수행하였다. Analyst 1.6.3 소프트웨어를 'Low mass hardware configuration'에서 그 장치를 조절하고 데이터 가공 및 인식을 위하여 사용하였다. 최적화된 MRM 파라미터들을 Ascorbic acid, Ascorbic acid-C13 및 DHA를 모니터링하기 위하여 사용하였다. 샘플을 2 μ L 루프로 루프 오버필링하여서 주사하고 LC-MS/MS로 분석하였다. 분리는 45° C에서 유지되는. Gemini C18 from Phenomenex 50mm x 0.5mm 상에서 수행하였다. 3.5 min LC 구배 동안, 이동상은 용매 A (10mM TBA 및 15mM acetic acid in water) 및 용매 B (10mM TBA 및 15mM acetic acid in methanol)로 구성되고 유속은 30 μ L/min이었다. 구배는 100:0 A:B에서 시작하였다. TBA를 이온 페어링 시약으로 사용하였고, 각 샘플들을 3회 반복 분석하였다.

[0084] 상기 실시예의 결과는 아래와 같다.

[0085] DNA aptamer 선택

[0086] SELEX 방법에 의하여 생산된 풍부한 라이브러리의 바이오정보 분석은 후보 aptamer를 얻었고, 이들 상위 20개로부터 산화로부터 AA를 보호하는 능력을 스크리닝하였다.

[0087] 후보 aptamers에 의한 AA의 산화적 보호

[0088] aptamer 풀의 스크리닝

[0089] 이 분석에서 DHA의 축적/검출은 AA의 산화를 나타낸다. 따라서 만약에 aptamer가 산화로부터 AA를 보호한다면 생성된 신호가 포지티브(no aptamer) 대조군보다 더 낮을 것이다. AA 및 산화제, 포지티브 대조군(AA plus oxidizer) 및 네가티브 대조군 (AA minus oxidizer)으로 혼합된 각 후보 aptamer의 오버레이 그래프를 도 2에서 나타내었고., 각 타일은 여러 aptamer 후보물질을 나타낸다. 20 개 aptamer 중에서 포지티브 대조군 미만의 명확한 차이를 가져서 AA의 보호 효과가 확실한 3 개를 스크리닝하였고(aptamers A, B 및 C) 이들은 각각 22번, 27번 및 44번에 대하여 30분 동안 AA 산화가 $35 \pm 13\%$, $43 \pm 9\%$ 및 $25 \pm 8\%$ 감소되었다(n=3).

[0090] 검출 분석에 방해하는 aptamer를 결정

[0091] 스크리닝으로부터 얻은 상위 3 aptamer(A, B 및 C)를 aptamer들이 스스로 검출 분석에 방해하는지를 결정하기 위하여 산화된 AA 산물인, DHA에 대해서 분석하였다. aptamer A는 DHA 대조군 그래프에서 벗어나지 않았고 그것은 검출 방법을 방해하지 않는다는 것을 시사한다. 그러나 aptamer B 및 C는 대조군 그래프와 약간의 차이를 나타내고 이것은 이들 aptamer에 대한 스크리닝에서 생성된 데이터가 믿을 수 없다는 것을 시사한다(도 2). 신뢰할 수 있는 데이터를 만들기 위해서, 모든 추가 실험은 aptamer A만을 사용하여 수행하였다.

[0092] 산화제들에 대한 aptamer 스크리닝

[0093] aptamer A의 4 종의 산화제(CuSO_4 (10.3 μ M), NaIO_4 (103.3 μ M), H_2O_2 (10.3 μ M) 및 TEMPOL (103.3 μ M))에 대한 AA를 보호하는 능력을 평가하였다. 각 산화제의 적정을 포지티브 및 네가티브 대조군 사이에 적절한 테스트 윈도우를 만드는 최저 농도를 결정하기 위하여 AA (10.3 μ M)에 대해서 수행하였다(데이터 도시 안함). aptamer 22번은 NaIO_4 존재에서 산화에 대한 보호에 실패(도 3, top right)하였지만, 각각 $19 \pm 6\%$ 및 $51 \pm 7\%$ 의 AA의 상대적인 산화의 감소를 H_2O_2 및 TEMPOL에 대해 나타내었다(도 4, bottom panels). 또한, CuSO_4 에 대한 재분석(증가된 장치 세팅을 가지고)은 초기 스크리닝보다 19% 이상인 $54 \pm 5\%$ 산화 감소를 나타내었다(도 3, top left) (n=3).

[0094] AA에 대한 aptamer A의 적정

[0095] aptamer A를 ascorbic acid와 10x, 5x, 2x, 1x, 0.5x, 0.25x 및 0.1x의 상대적인 농도에서 배양하였다. 적정 데이터는 포지티브 및 네가티브 대조군에 대해 오버레이로 작도하였다(도 4). 적정은 용량 의존적으로 작용하였다. 가장 낮은 두 농도(0.1x 및 0.25x)에서는 산화 보호 효과가 관찰되지 않았고, 산화 보호 효과는 AA에 대한 aptamer의 비율이 증가함에 따라서 증가하였다. 산화 보호 정도는 테스트한 범위에서 안정상태를 나타내지 않았고, 따라서 aptamer A에 의한 AA의 최대 보호 효과는 AA의 10x 이상 농도에서 일어났다.

[0096] aptamer 친화도 측정

- [0097] AA 및 DHA에 대한 압타머 A의 결합 친화도를 MST로 측정하였고, 검출된 KD 값들은 각각 AA 및DHA에 대해 987.9 nM 및 189.7 nM이었다(n=3).
- [0098] vitaminwater®에서 AA의 산화 보호
- [0099] 데이터 통합과 정량화는 곡선 아래 면적(AUC)를 사용하여 MultiQuant software (ABSciex)로 수행하였다. AA 기 반 정량화는 168h 시간 경과에 대해 측정하였다(도 5). 시간 경과 끝에서, 대조군 및 압타머 A 처리된 샘플에서 각각 초기 AA의 $21.9 \pm 6.6\%$ 및 $47.5 \pm 0.5\%$ 가 남았다(n=3). AA 반감기는 대조군 및 압타머 A 처리된 샘플에서 각각 $84 \pm 10\text{h}$ 및 $141 \pm 14\text{h}$ 이었다. 이것은 압타머 A의 첨가가 vitaminwater®에서 AA의 반감기를 168% 증가시킨다는 것을 의미한다.
- [0100] 또한 상기 Vitaminwate 음료가 pH 2.5 이기 때문에 이 pH 농도에서도 압타민이 작용한다는 것을 의미한다.
- [0101] 실시예 6: 환원상태의 Vitamin C에 결합하는 압타머 군 구축
- [0102] SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 과정을 통해 1013 개로 구성된 DNA 압타머 라이브러리로부터 환원상태의 ascorbic acid에 대해 선택적으로 결합하는 압타머를 찾는 실험을 다음의 조건에서 진행하였다. Ascorbic acid의 환원 상태를 유지한 상태에서 SELEX를 진행하기 위해, ~pH 5.5 정도로 유지하며 glutathione 을 넣어주었다.
- [0103] 이 조건 하에서 비타민C의 99% 이상이 산화된 dehydro ascorbic acid (DHA)가 아니 환원된 L-ascorbic acid 상태로 유지가 되었다. 위의 반응 조건에서 SELEX를 진행하여 선택된 압타머 전체를 Next Generation Sequencing 을 진행한 후 분석한 결과, 3000개 이상의 2차구조군으로 이뤄진 압타머를 얻을 수 있었다.
- [0104] 실시예 7: 압타머를 통한 비타민 C 산화방지 정량분석
- [0105] 이차 구조의 종류에 따라 20개의 개별 압타머를 선택하여 비타민C의 산화 방지 실험을 진행하였다. Annealing buffer에 녹인 압타머를 95 oC 로 가열한 후 서서히 온도를 상온으로 내리면서 압타머의 이차 구조를 만든 후, 환원된 L-ascorbic acid와 혼합하여 압타머가 L-ascorbic acid와 결합할 수 있도록 약 30분간 반응시켰다. 이후 과산화수소수를 첨가하여 산화조건을 만들어 준 후 L-ascorbic acid의 산화를 형광염료인 OPDA (o-phenylenediamine) 를 첨가하여 측정하였다. L-ascorbic acid의 산화물인 DHA가 OPDA와 반응하여 생성된 DHA-OPDA로부터의 형광량을 측정하여 DHA의 생성 정도를 정량 분석할 수 있다. 위의 조건에서 DHA-OPDA의 형광량을 매 34초마다 25분 동안 측정하였다.
- [0106] 이 중 세 개의 모든 압타머는 과산화수소수에 의한 비타민C 산화를 방지하였다. 12번 압타머는 약 40 %의 산화를 방지하였고, 8번은 약 20 %, 10번은 약 40 %의 산화를 방지 효과를 보였다. 이러한 실험 및 다른 경험에 근거하여, 세 개의 압타머가 비타민C에 직접 반응하여, 비타민C의 산화를 방지한다는 결론을 내릴 수 있다 (도 6 내지 8 참조).
- [0107] 실시예 8: 본 발명의 압타머의 ascorbic acid (AA) 및 dehydroascorbic acid (DHA)에 대한 steady-state 용액 해리 상수(KD) 결정
- [0108] 해리 상수는 MST(microscale thermophoresis)를 사용하여 결정하였다.
- [0109] 본 실시예는 양 타겟에 대한 어세이 버퍼에서 세 압타머에 대한 MST 데이터 및 계산된 KD를 포함한다. ascorbic acid 및 dehydroascorbic acid를 포함하는 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였고, 버퍼 제조 전에, 탈이온수를 Chelex-100 레진으로 1시간 동안 처리하여 우발적인 금속을 제거하였다. Chelex 처리 후, 그 물을 산소를 최소화하기 위하여 질소 가스로 10분간 살포한 후 밀봉하여 보관하였다. 이 물을 모든 수용액에 사용하였다. 최종 버퍼는 50 mM sodium acetate, pH 5.5, 1 mM MgCl₂, 및 0.05% Tween-20이고, 양 AA 및 DHA 모두는 버퍼에서 e5 uM 에서 153 pM (최종) (압타머 #10 & #12에 대해) 또는 50 uM 에서 1.53 nM (최종) (for 압타머 #8)에서 1:1 계대 희석에서 분석하였다. 각 Cy5-conjugated 압타머의 최종 농도는 20 nM이다.
- [0110] 각 기술적인 두번 희석물을 NanoTemper Technologies GmbH (Munich, Germany) 사의 Monolith NT.115 MST 장치에서 2회 측정하였다.
- [0111] 그 결과는 도 9 내지 14에 나타내었다. 각 데이터 포인트는 평균과 맞춤 곡선(fitted curve; 검은 선)과 함께 도에서 나타낸다. 각 그래프의 수직 파선은 KD를 나타낸다.
- [0112] 상기 결과를 통하여 하기와 같은 결론을 추론하였다.

- [0113] 1)압타머 #2 & 1은 AA vs DHA에 대하여 더 우수한 선택성을 가지는 반면, #8은 DHA에 대해서 AA보다 약간 더 우수한 선택성을 가진다.
- [0114] 2) 압타머 #3 세 압타머의 AA vs DHA에 대한 가장 우수한 선택성을 가진다.
- [0115] 3) 압타머 #1은 산화로부터 AA의 보호에는 최고이었으나 AA vs DHA의 최소 선택성을 가졌다.
- [0116] 실시예9: 압타머와 하이드로젤의 트랩
- [0117] 본 발명의 압타머를 Hydrogel에 트랩시키는 방법은 우선 압타머에 붙여놓은 아민기에 Biotin을 붙인 후에, 이와 결합하는 스트렙타비딘을 갖고 있는 파티클로 기능화한 후 Hydrogel을 소성할때 20% 비율로 섞어서 Hydrogel에 압타머 파티클을 트랩시키는 방법이 있다. 이 방법은 압타머와 Hydrogel간의 화학적 결합이 일어나지 않으며 구현하기가 비교적 단순한 방법이라 할 수 있다.
- [0118] 또 다른 방법으로는, Hydrogel의 Hydroxyl 기에 화학적 방법으로 압타머에 붙어있는 아민기나 카르복시기를 붙이는 방법으로 이는 압타머를 화학적으로 Hydrogel에 결합시키는 방법이 있다.
- [0119] 그 외 Hydrogel의 화학적 성분을 조절함으로써, 또는 압타머에 결합시키는 작용기를 바꾸어 줌으로서 다양한 형태의 결합을 가져 올 수 있다.
- [0120] 구체적인 트랩 방법으로는 a) 압타머에 아민기를 결합시키는 단계;b) 하이드로젤 모노머의 Hydroxyl 기를 epoxy 기를 가지고 있는 3-glycidoxypopyltrimethoxysilane (3-GPTMS) 로 silanizing 후 이 epoxy기에 상기 압타머에 결합되어 있는 아민기를 결합시키는 단계;및 c) 상기 하이드로젤 모노머를 중합시키는 단계를 포함하는 압타머가 트랩된 하이드로젤을 제조할 수 있다.
- [0121] 한편, 현재 보습효과로 많이 사용되고 있는 콜라겐하이드로젤을 위와 같은 방법으로 압타머-콜라겐하이드로젤로 만들어, 센싱(감지)후에 성분을 더욱 천천히 방출(Release)하는 기능을 추가할 수 있다. 예로, 피부노화방지를 위해 쓰이는 Teprenone 이나 Caprylic Acid 등을 압타머-콜라겐 하이드로젤로 서서히 피부에 공급한다거나 세포에서 분비되는 피부 노화 관련 사이토카인의 양에 따라서 분비하도록 함으로 스마트 센싱(감지) 기능을 추가할 수 있다.
- [0122] 실시예 10: 본 발명의 압타머 기반 비타민 C 함유 음료 제조
- [0123] 멸균 정제수 1000g에 본 발명의 압타머 비타민 C 복합체 1g, 올리고당 500g, 글리신 2g, 타우린 2g, 구연산나트륨0.2g을 첨가하여 혼합한 후 정제수를 재차 첨가하여 총 중량이 2000g이 되도록 하였다.
- [0124] 그런 다음 상기의 성분들이 첨가된 용액을 80rpm으로 1시간 동안 교반시킨 후 진공상태에서 용기에 충전하여 압타머와 결합된 비타민 C가 함유된 비타민 음료를 제조하였다.
- [0125] 비교예로 상기 실시예 10과 모든 공정은 동일하고 본 발명의 압타머 비타민 C 복합체 대신에 비타민 C(영국 DSM) 1g을 사용하여 음료를 제조하였다.
- [0126] 실험예 1: 관능검사
- [0127] 상기 실시예 10에서 제조한 본 발명의 비타민 음료와 비교예의 음료에 대해 맛, 향기, 전체적인 기호도와 같은 관능검사를 측정하고 그 결과를 아래의 표 1에 나타내었다.
- [0128] 상기에서 관능검사는 식품 관련 분야에서 3년이상 종사한 관능검사 요원 20명(남여 각각 10명)으로 하여금 5점 척도법에 의해 측정한 것으로 각각의 항목에 대한 수치는 관능검사 요원이 매긴 점수의 총합을 관능검사 인원수로 나눈 후 이를 소수둘째 자리에서 반올림하여 나타내었다.

표 1

항목	맛	향	전체적 기호도
실시예 4	4.1	4.1	4.1
비교예	4.0	4.0	4.0

- [0130] 표 1은 실시예 음료 및 비교예 음료의 관능검사 결과
- [0131] 관능검사는 수치가 높을수록 관능성이 우수함을 의미한다.

[0132] 상기의 표 1에서 알 수 있는 바와 같이 기존의 비타민 음료와 본 발명의 비타민 음료는 관능검사에서 큰 차이는 없으나 본 발명의 음료가 약간 더 높은 검사 결과를 나타내었다.

[0133] 실험예 2: 본 발명의 음료의 피로 개선 효과

[0134] 만성 피로 증상이 있는 사람 50명(남자 20명, 여성 30명)에게 상기 실시예 4에서 제조한 본 발명의 비타민 음료와 비교예의 음료를 2주 동안 매일 150ml 씩 섭취시킨 후 피로개선 효과에 대한 설문을 실시하고 그 결과를 아래의 표 2에 나타내었다.

표 2

항목	A	B	C	총계(명)
실시예 4	45	3	2	50
비교예	35	10	5	50

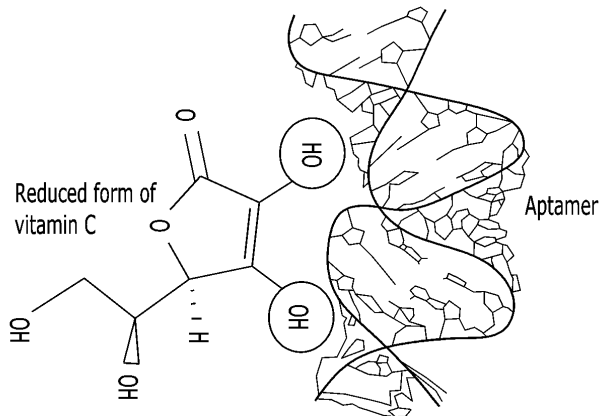
[0136] 표 2는 실시예 4 및 비교예의 피로 개선 효과(단위 : 명)에 대한 표이고, 표에서, A : 피로 개선 효과 있음, B : 피로 개선 효과 없음, C : 잘 모르겠음

[0137] 상기 표 2에서 보는 바와 같이 실시예 10에서 제조한 비타민 음료 및 종래 방법에 의해 제조한 비교예의 음료 모두 피로 개선효과가 있으나, 비교예의 음료에 비해 본 발명의 실시예 4에서 제조한 비타민 음료의 피로 개선 효과가 더 좋았다. 이는 비타민 C의 항산화 활성의 유지를 통하여 본 발명의 음료가 피로개선에 더 효과가 있는 것을 시사한다.

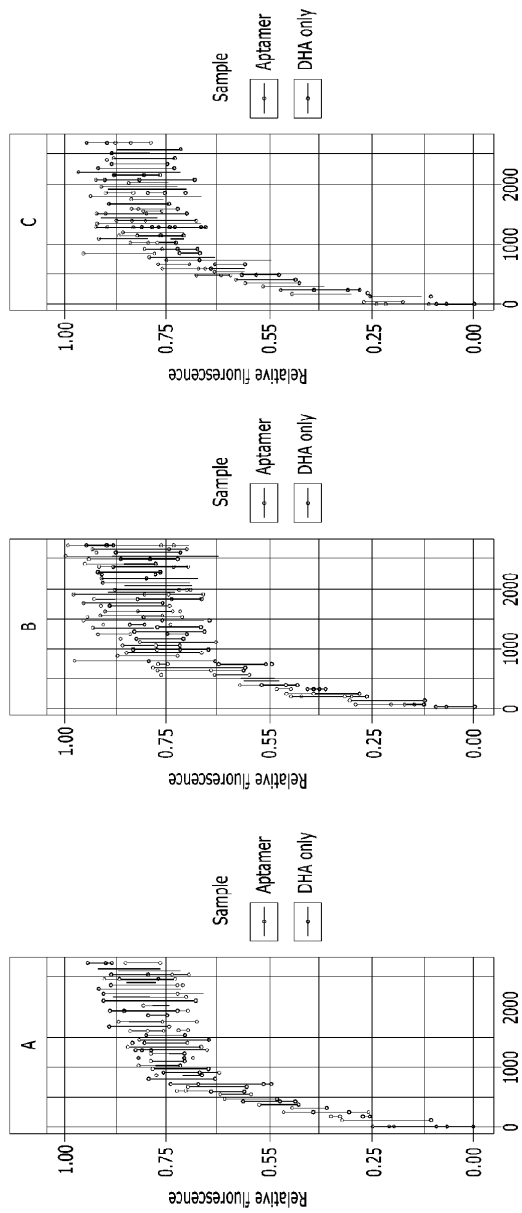
[0138] 상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

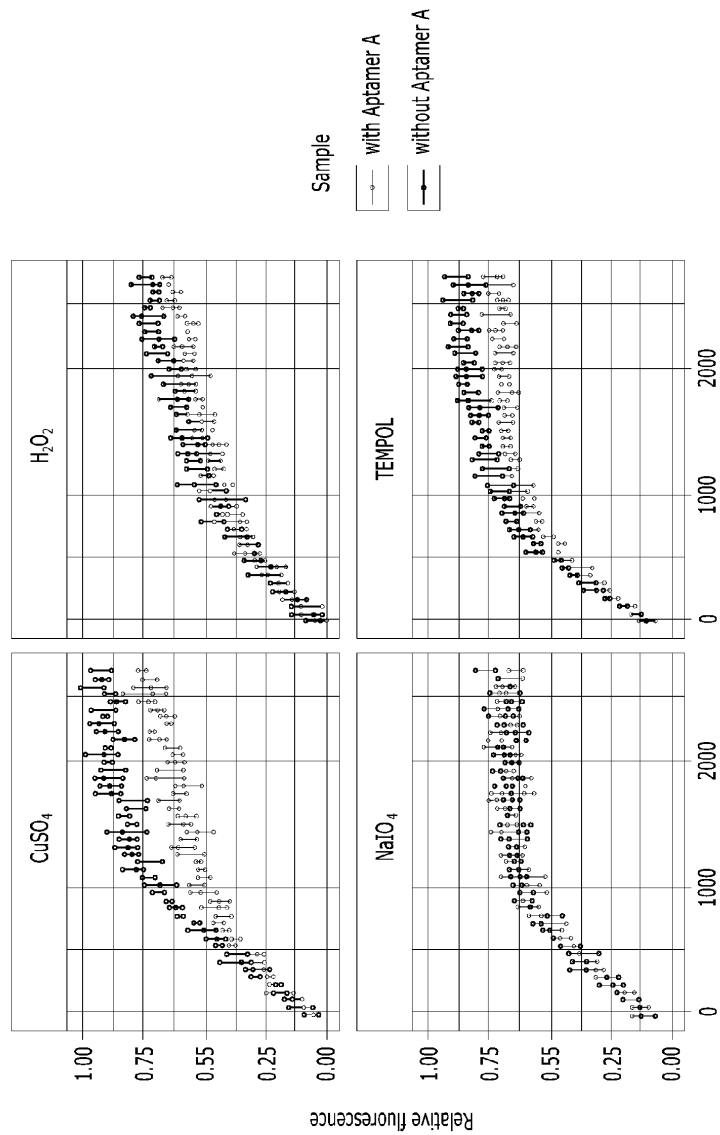
도면1



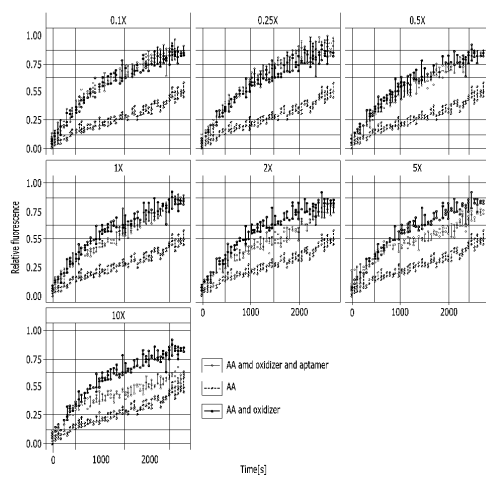
도면2



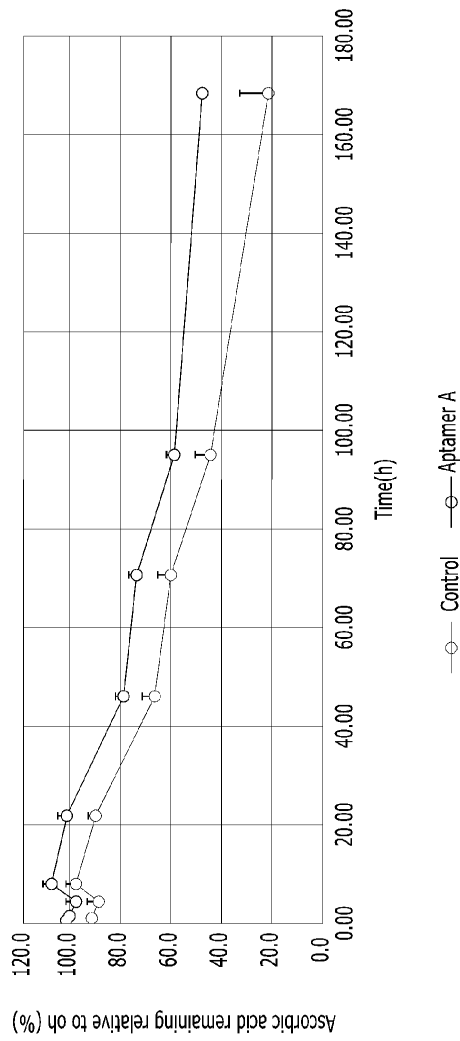
도면3



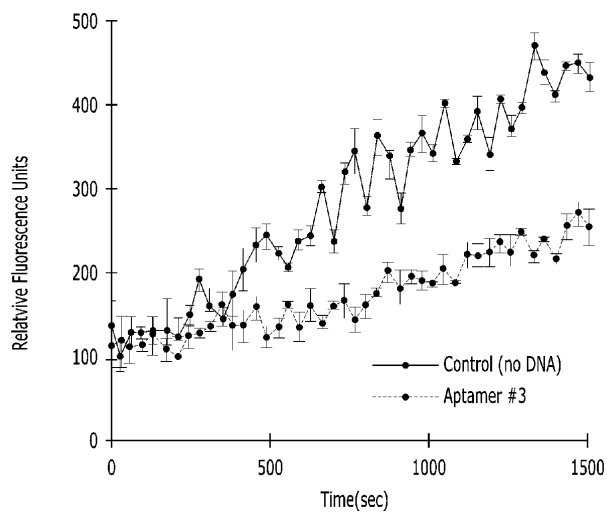
도면4



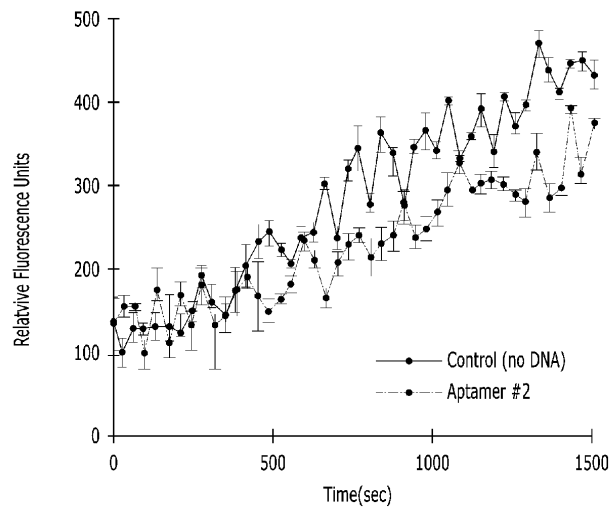
도면5



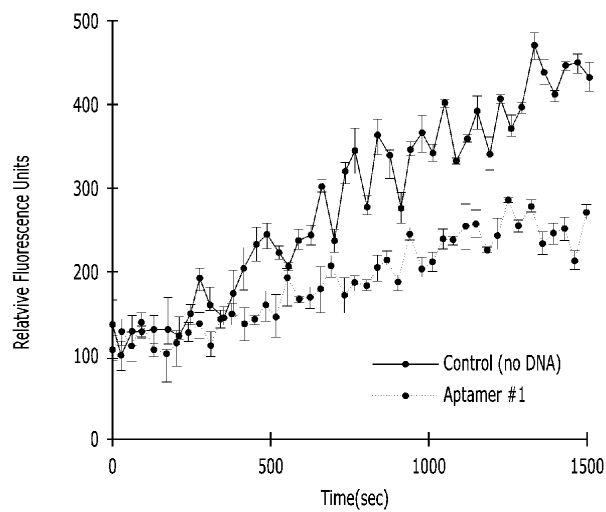
도면6



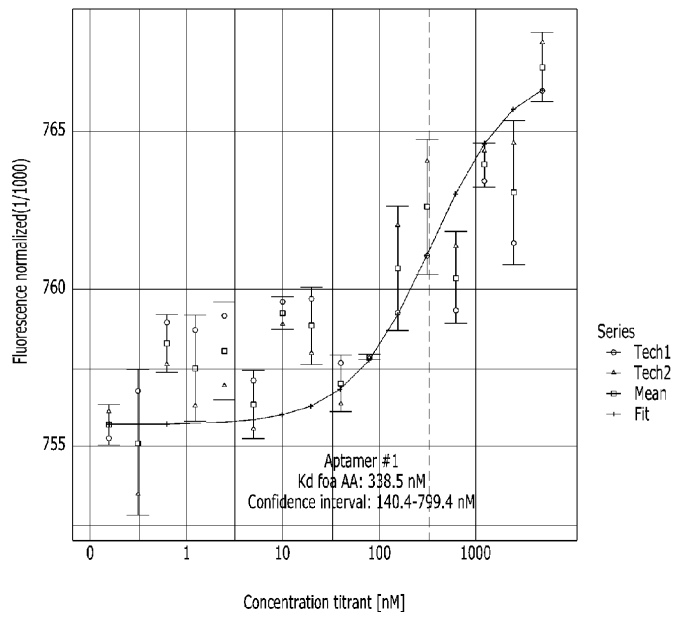
도면7



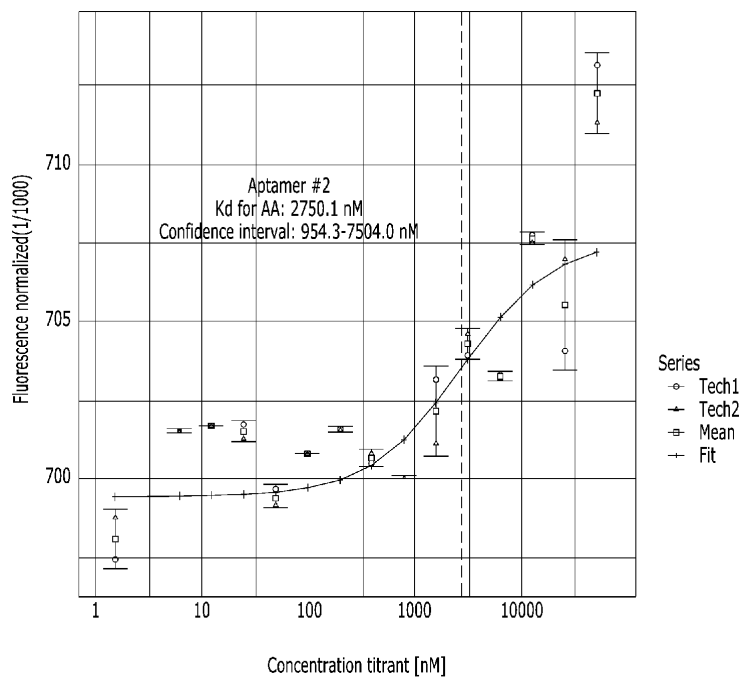
도면8



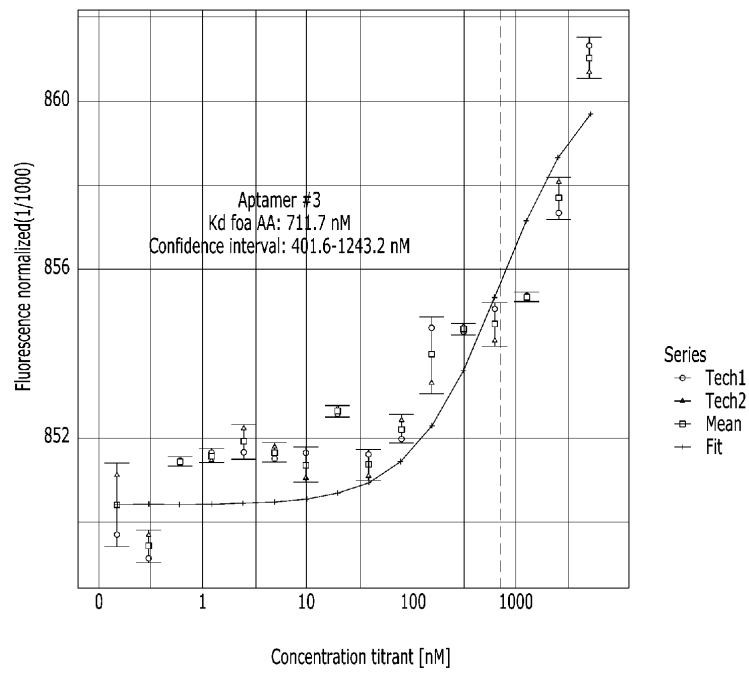
도면9



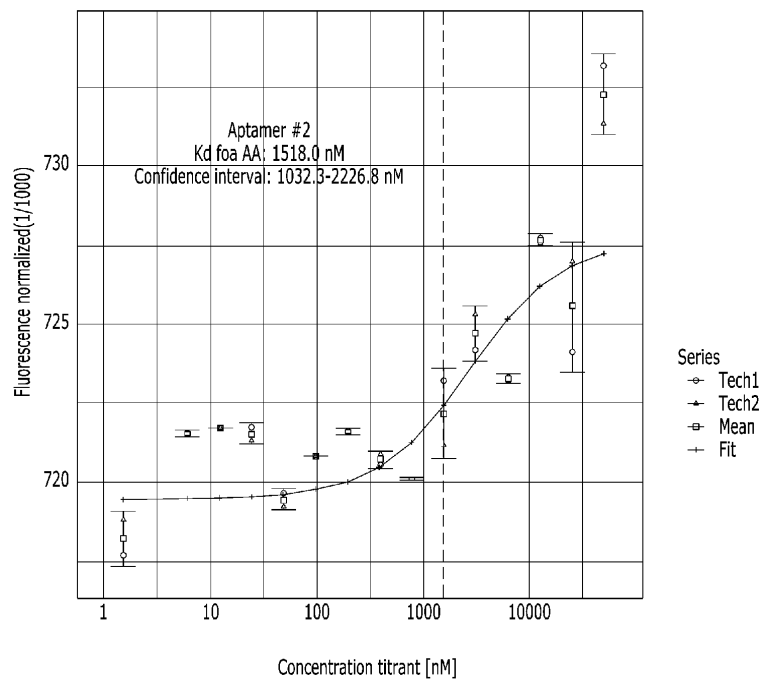
도면10



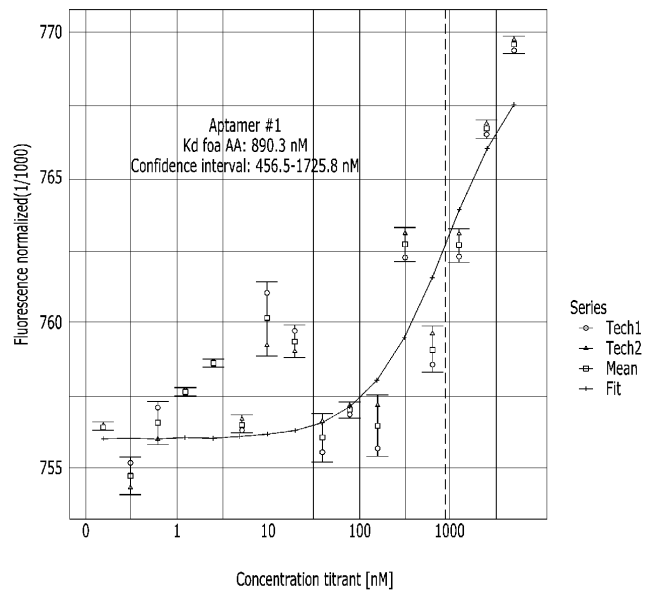
도면11



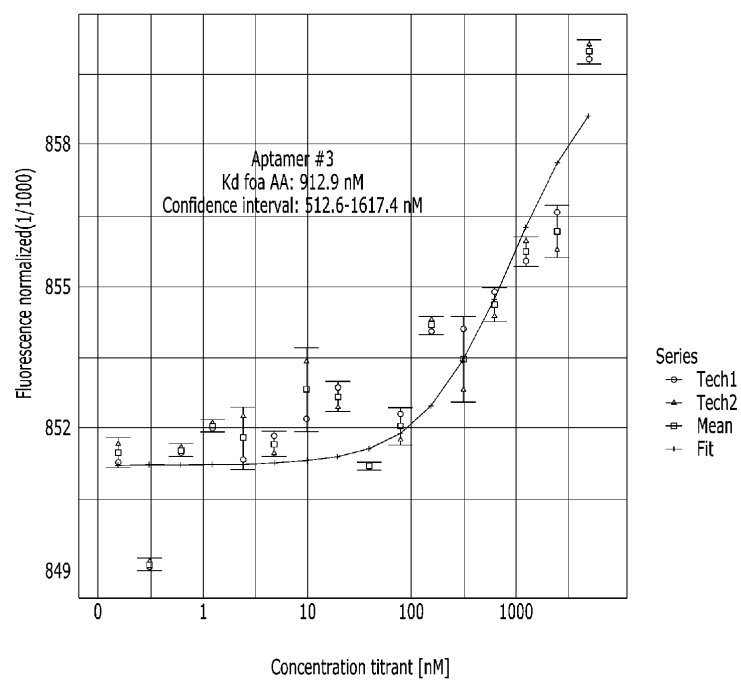
도면12



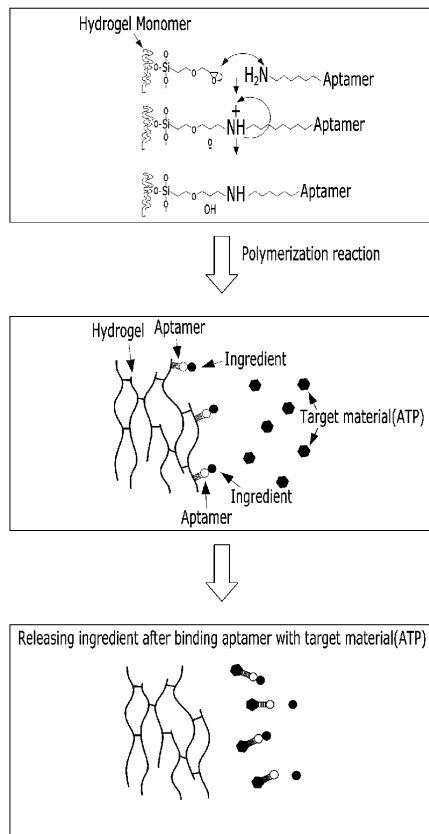
도면13



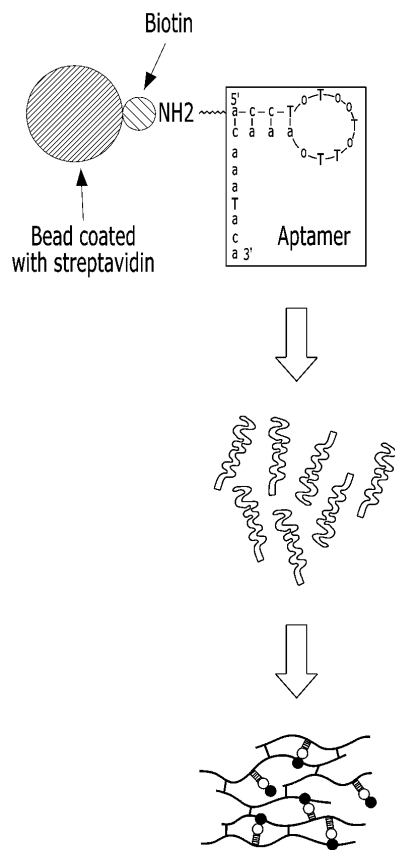
도면14



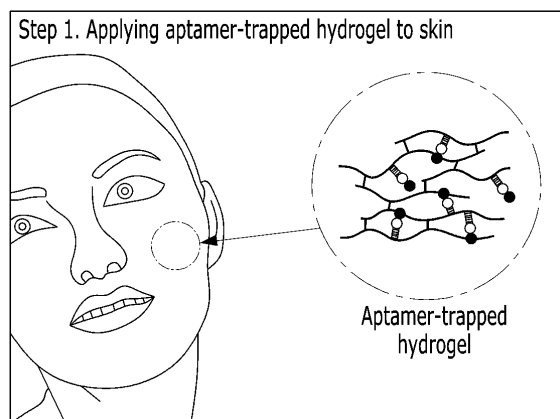
도면15



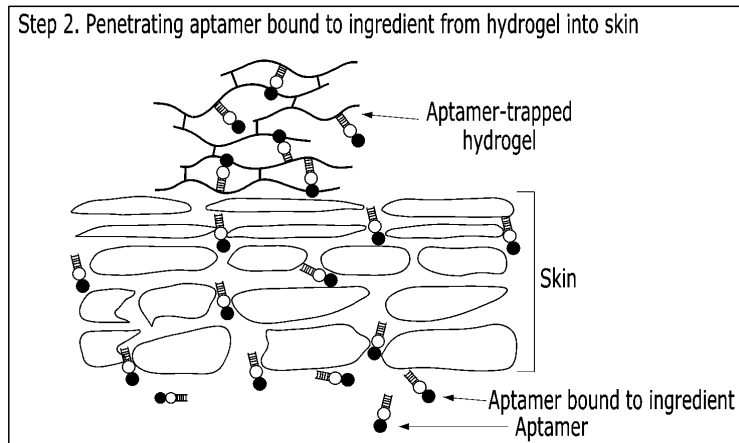
도면16



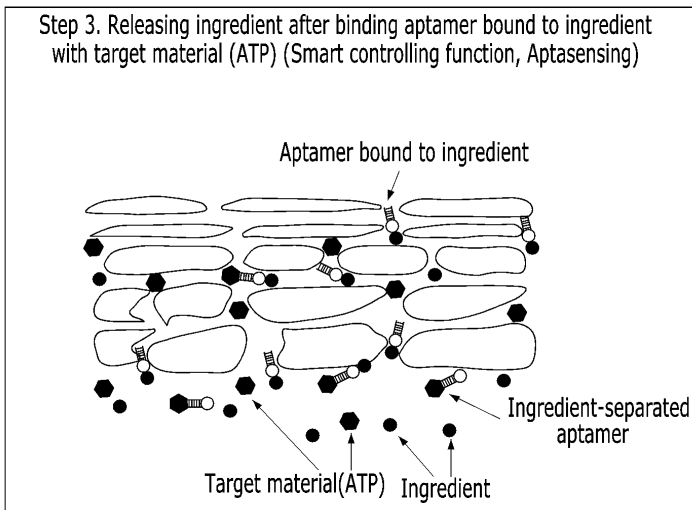
도면17



도면18



도면19



서열 목록

- <110> NEXMOS CO.,LTD.
- <120> Method for inhibiting oxidation of antioxidant using aptamer, the material and use of the same
- <130> OP17-0032HSPCT
- <150> PCT/KR 2016/011740
- <151> 2016-10-19
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Aptamer

<400> 1

agagctcgcg ccggagttct caatgcaaga gc

32

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aptamer

<400> 2

gtggaggcgg tggccagtct catacgcggc ag

32