(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0169632
(43) 공개일자 2022년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/50 (2015.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/50 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0079945
(22) 출원일자 2021년06월21일
심사청구일자 2021년06월21일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송재준
서울특별시 서초구 신반포로 9, 73동 504호 (반포본동, 주공아파트)
고윤영
서울특별시 양천구 목동동로 339, B904호(목동, 목동트윈빌)
(74) 대리인
특허법인 무한

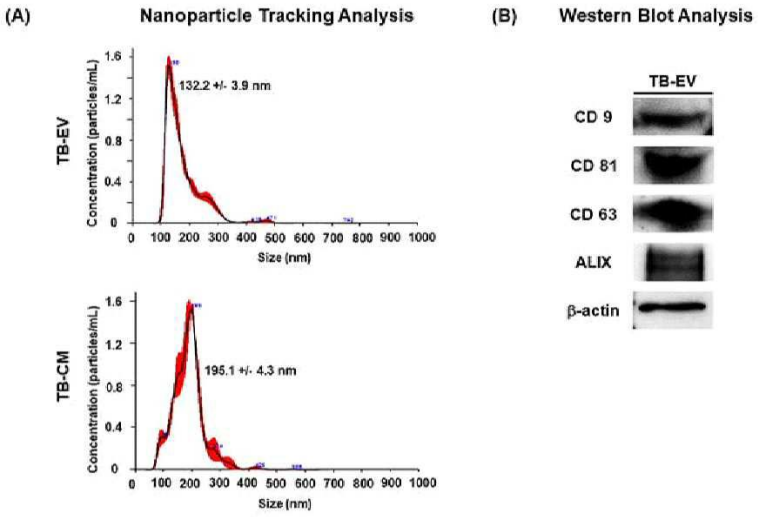
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **피부노화 억제 및 피부재생 촉진 효능을 갖는 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 포함하는 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 인간영양막세포를 배양하여 그 유래물을 제조하는 방법 및 이에 의해 제조된 인간영양막세포 배양액과 이의 유래물 및 이들을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 상기 인간영양막세포 배양액 및 유래물은 피부노화 억제 효과 및 피부재생 촉진효과를 갖는다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 8/982 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/08 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345320078
과제번호	2020R1I1A1A01063168
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	융모막 Trophoblast 유래 엑소좀의 골재생 효능 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 유효성분으로 포함하는, 피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간영양막세포 배양액은 인간영양막세포를 원심분리하여 얻어진 상등액이고,

상기 인간영양막세포 유래물은 상기 인간영양막세포 배양액으로부터 유래된 것인,

피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 인간피부섬유아세포의 세포재생을 1.5배이상 촉진하는,

피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 인간영양막세포 배양액은 총 배양액 부피 기준 10 내지 60%로 포함되는,

피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 인간영양막세포 유래물은 10^4 내지 10^5 입자/mL로 포함되는,

피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 collagen I, collagen III, elastin, 및 fibronectin으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현을 증가시키는,

피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 MMP1 또는 MMP3의 유전자 발현을 억제하는,

피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은,

hsa-miR-183-5p, hsa-miR-30c-2-3p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-320c, hsa-miR-320c, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-760, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-1301-3p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-340-5p, 및 hsa-miR-625-5p로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA를 포함하는,

피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 유효성분으로 포함하는, 피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 화장품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 화장품 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 페이스트, 크림, 겔, 연고, 패치, 파우더, 스프레이, 용액, 현탁액 및 유탁액으로 구성된 그룹에서 선택된 어느 하나의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는,

피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 화장품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부노화 억제 및 피부재생 촉진 효과를 갖는 인간영양막세포(Trophoblasts) 배양액 및 이의 유래물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 태반 속 융모막 세포층 중 영양막세포로부터 제조한 인간영양막세포 배양액과 유래물의 피부노화 억제 및 피부재생 촉진 효능에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 양막(amnion membrane)은 태반을 구성하고 있는 가장 안쪽에 있는 막으로, 양수와 태아를 둘러싸고 있어 태아를 외부의 병원균으로부터 보호하고 양수와 태아의 생체항상성을 유지하여 태아가 정상적으로 성장/발달할 수 있는 환경을 조성하는 역할을 한다. 1910년 Davis가 처음 양막을 생체 재료로 사용한 후(Davis JW et al., Johns Hopkins Hosp Rep, 15; 307, 1910) 화상, 창상 및 안과 수술 후 상처 치유의 목적으로 널리 사용되고 있다(Faulk WP et al., The Lancet, 315(8179):1156-1158, 1980, Mohammadi AA et al., Burns, 39(2):349-353, 2013, Dua HS et, al., Survey of Ophthalmology, 49(1):51-77, 2004). 양막은 표피세포 성장인자 (epidermal growth factor, EGF), 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factor, FGF), 전환 성장인자 (transforming growth factor, TGF-b), 신경 성장인자 (nerve growth factor, NGF) 및 간장 성장인자 (hepatic growth factor, HGF)등을 포함하고 있는 것으로 알려져 있으며 그 자체로 콜라겐으로 구성된 세포외 기질과 상피세포로 구성되어 있다. 또한, 항염증 (anti-inflammation), 항균 (anti-bacterial) 성분을 포함하고 있으며 혈관생성 조절 성분 (angiogenic modulatory properties)들이 존재한다(Hao Y et al., Cornea, 19(3):348-352, 2000).

[0004] 엑소좀 (exosome)은 세포밖 소포체, 세포외 소포 (EVs, extracellular vesicles), 분비성 미세소포 등으로 알려졌으며 세포 간 정보교환을 위해 세포들이 외부 환경으로 분비하는 나노 크기의 소포체이다(Thery C et al., J Extracel Vesic. 2018;7(1):1535750.) 엑소좀은 단백질, 지질, 핵산, 대사물질 등 생물학적 활성을 보이는 다양한 물질들을 포함하여 이러한 기능적 수하물을 운반하는 매개체로 세포 간 소통의 역할을 수행하는 것으로 알려졌다. 최근에는 엑소좀 내 miRNA가 생체 내 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려지기도 하였다(Yanez-Mo M et al., J Extracel Vesic. 2015;4:27066, Colombo M et al., Ann Rev Cell Dev Biol. 2014;30:255-89, Valadi H et al., Nat Cell Biol. 2007;9(6):654-9). 엑소좀은 다양한 체액에서도 발견되어 질병의 진단에도 사용되고 있으며, 비교적 안정적으로 제조와 보관이 가능하여 진단 및 치료제로 개발되고 있다.

[0005] 중간엽줄기세포 (Mesenchymal stem cells, MSCs)는 성체줄기세포로 수정란이나 난자를 이용하지 않기 때문에 윤리적 논란에서 자유로워 활용도가 높고, 자가 중간엽줄기세포를 세포치료제 및 이식에 사용할 경우 면역거부반응을 줄일 수 있다. 줄기세포의 종류를 중간엽줄기세포(MSC), 조혈줄기세포(HSC), 신경줄기세포(NSC), 배아유래줄기세포(ES-derived cells) 등으로 구분하여 임상연구 비율을 분석하였을 때, 중간엽줄기세포가 69%로 전체 임상연구의 최대 다수를 차지하고 있었고, 조혈줄기세포가 13%, 신경줄기세포가 4% 이었다. 이렇듯 배아줄기세포 연구와는 다르게 중간엽줄기세포 치료법은 상당수가 이미 임상 활용 단계에 와 있으며, 해외를 비롯한 많은 연구소들의 성체줄기세포 연구는 이미 파킨슨병, 연골손상, 소경, 암, 척수손상 등 60종 이상의 병을 치료한 결과가 발표되었고 현재 세계적으로 약 300종의 병에 대해서도 임상시험이 진행 중이다. 우리나라도 중간엽줄기세포를 이용하여 뇌졸중치료제, 파킨슨병 진행 억제, 퇴행성 관절염 치료, 간경변 줄기세포 신약 개발, 뼈, 연골 관련 질환 치료, 혈액 관련 질환, 심혈관계 질환 등 여러 임상 분야에 적용되어 활발하게 진행되고 있다. 하지만, 중간엽줄기세포는 여러 조직으로부터 획득은 가능하나, 얻을 수 있는 세포의 양이 매우 적을 뿐만 아니라 수명이 짧아 미분화 능력을 잃어버리며 퇴화되어 버리는 치명적인 단점이 있다. 또한, 체외 상태에서 배양 시 증식이 매우 느려 임상에 이용할 만큼의 양을 확보하기가 어렵고, 체외 배양 시 사용되는 동물유래 serum (Fetal Bovine Serum, FBS)으로 임상 적용에 한계점이 있는 실정이다.

[0006] 줄기세포 유래물 화장품은 줄기세포 활성 성분이 다량 포함되어 피부건강을 되찾을 수 있다는 과학적 연구에 바탕을 둔 새로운 개념의 기능성 화장품 시장을 형성하고 있으며, 기존 줄기세포가 아닌 새로운 대체 세포를 이용한 세포 배양액 화장품으로 줄기세포 수급과 체외 배양의 어려움을 극복하기 위한 대체 세포를 발굴한 것에 의미가 있다. 그러므로 줄기세포처럼 생리활성물질을 다량 분비하는 신 세포주 발굴이 세포유래물 화장품 시장의 현재 과제로 부각되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 중간엽줄기세포의 수급과 생체 외 배양 조건은 대량 생산을 위한 제품화 과정과 임상 적용에서의 문제를 가지고 있었다. 이에, 본 발명자들은 태반 속 융모막 세포층 중 하나인 인간영양막세포 유래물 또는 그 배양액의 피부노화 억제 및 피부재생 촉진 효능을 발견하여

이들을 포함하는 조성물을 발명으로 제공하고자 한다.

[0009] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 유효성분으로 포함하는, 피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물이 제공된다.

[0012] 일 측에 따르면, 상기 인간영양막세포 배양액은 인간영양막세포를 원심분리하여 얻어진 상등액이고, 상기 인간영양막세포 유래물은 상기 인간영양막세포 배양액으로부터 유래될 수 있다.

[0013] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 인간피부섬유아세포의 세포재생을 1.5배이상 촉진할 수 있다.

[0014] 일 측에 따르면, 상기 인간영양막세포 배양액은 총 배양액 부피를 기준으로 10 내지 60%로 포함될 수 있다. 일 측에 따르면, 상기 인간영양막세포 유래물은 10^4 내지 10^5 /ml입자로 포함될 수 있다.

[0015] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 collagen I, collagen III, elastin, 및 fibronectin으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다.

[0016] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 MMP1 또는 MMP3의 유전자 발현을 억제할 수 있다.

[0017] 일 측에 따르면, 상기 조성물은hsa-miR-183-5p, hsa-miR-30c-2-3p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-320c, hsa-miR-320c, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-760, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-1301-3p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-340-5p, 및 hsa-miR-625-5p로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA를 포함할 수 있다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화될 수 있다.

[0019] 본 발명의 또다른 실시예에 따르면, 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 유효성분으로 포함하는, 피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 화장품 조성물이 제공된다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 화장품 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 페이스트, 크림, 겔, 연고, 패치, 파우더, 스프레이, 용액, 현탁액 및 유탁액으로 구성된 그룹에서 선택된 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 포함하는 조성물은, 인간 피부 섬유아세포의 증식과 세포이동을 촉진하여 피부노화 억제 및 피부재생 효능을 가진다.

[0022] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1 은 인간영양막세포 배양액 및 유래물의 NTA분석결과와 엑소좀 마커 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 인간영양막세포 배양액을 0 내지 30%로 처리하였을 때 시간별로 인간피부섬유아세포 배양결과를 나타낸 것이다.

도 3은 인간영양막세포 유래물을 0 내지 10^5 입자/mL(particles/mL)로 처리하였을 때의 인간피부섬유아세포 배양결과를 나타낸 것이다.

도 4는 인간영양막세포 배양액을 총 배양액 부피를 기준으로 10 내지 60%로 처리하였을 때, 인간피부섬유아세포 증식을 보여주는 이미지 및 그래프이다.

도 5는 인간영양막세포 배양액을 중간엽줄기세포 배양액과 동량으로 처리하였을 때, 인간피부섬유아세포 증식을 보여주는 광학현미경 이미지이다.

도 6은 인간피부섬유아세포에 인간영양막세포 배양액과 중간엽줄기세포 배양액을 동량으로 처리하였을 때, 유전자 발현 정도를 비교분석한 결과이다.

도 7은 인간영양막세포 유래물을 처리하여 스크래치 운드 어세이(scratch wound assay)를 진행한 결과이다.

도 8은 인간영양막세포 배양액과 중간엽줄기세포 배양액을 처리하여 스크래치 운드 어세이(scratch wound assay)를 진행한 결과이다.

도 9는 인간영양막세포 유래물을 인간피부섬유아세포에 처리하여 유전자 발현을 PCR로 분석한 결과이다.

도 10은 계대배양으로 노화된 인간피부섬유아세포에 인간영양막세포 배양액과 중간엽줄기세포 배양액을 처리하여 SA-GAL 염색한 이미지와 이를 정량화한 도표이다.

도 11은 자외선처리로 노화된 인간피부섬유아세포에 인간영양막세포 배양액을 처리하여 SA-GAL 염색한 이미지와 이를 정량화한 도표이다.

도 12는 인간영양막세포 유래물 처리시의 유전자 발현 변화와, 이를 PCR 검증한 결과를 나타낸다.

도 13은 중간엽줄기세포 배양액의 RNA 구성과 인간영양막세포 배양액의 RNA 구성을 비교한 것이다.

도 14는 인간영양막세포 유래물에 포함된 상위 20개 miRNA를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0026] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0027] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0028] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0029] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 유효성분으로 포함하는, 피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 약학적 조성물이 제공된다.

[0031] 상기 조성물은 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간영양막세포"는 인간 태반의 일 구성부분으로서, 보다 구체적으로는 배포 외부에 위치한 배자의 외배엽층으로, 난자를 자궁벽에 부착시키며 배자에 영양분을 공급하는 조직을 의미한다. 이것에서 융모막 및 양막이 유래하며, 영양막의 내세포층은 융모를 덮으며, 이를 세포영양막이라 부른다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간영양막세포 배양액"은 상기 인간영양막세포를 체외배양하고 원심분리하여 얻은

상등액을 말하며, 본 명세서의 기재내용 또는 도면에서 TB-CM 또는 TB CM과 같은 의미로 사용된다.

[0034] 상기 체외배양은 바람직하게는 1.5 x 10^6 세포로 75cm^2 배양 컨테이너에서 72시간 배양하는 것일 수 있다.

[0035] 상기 체외배양은 항생제와 배지첨가제 하에 진행될 수 있으며 바람직하게는, 1% 항생제 및 5% 엑소좀 고갈된 FBS(Fetal Bovine Serum) 존재하에 배양될 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간영양막세포 유래물"이란 인간영양막세포가 분비하는 엑소좀, 미세소포체, 마이크로베지클 또는 마이크로파티클 중 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있으며, 인간영양막세포가 외부환경으로 분비하는 막성 소포체로서 내부에 지질, 핵산, 단백질, 대사물질 등 생물학적 활성을 보이는 다양한 물질을 포함할 수 있다. 본 명세서의 기재내용 또는 도면에서 인간영양막세포 유래물은 TB-EV 또는 TB EV와 같은 의미로 사용된다.

[0037] 상기 인간영양막세포 유래물은 상기 인간영양막세포 배양액을 분리정제하여 얻어지는 것일 수 있으며, 바람직하게는 상용화된 엑소퀵(Exoquick) 엑소좀 단리 용액으로 처리하여 얻어질 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용된 용어 "FBS"는 소태아 혈청을 말하며, 세포생장에 필수적인 성장인자, 시토카인, 단백질 등이 다양하게 포함되어 줄기세포용 배지 첨가제로 널리 활용되고 있다.

[0039] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 중간엽줄기세포"는 인간의 다분화능을 가진 기질세포로, 제한적이지만 다양한 분화능을 가지는 줄기세포를 말하며, 유래 조직에 의해 한정되지 않으나, 바람직하게는 골수유래 인간중간엽줄기세포일 수 있다.

[0040] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 인간피부섬유아세포(Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDF)의 세포재생을 1.5배이상 촉진할 수 있다.

[0041] 일 측에 따르면, 상기 인간영양막세포 배양액은 총 배양액 부피를 기준으로 10 내지 60%로 포함될 수 있다.

[0042] 일 측에 따르면, 상기 인간영양막세포 유래물은 10^4 내지 10^5/ml 입자로 포함될 수 있다.

[0043] 본 명세서의 실시예에 따르면, 인간영양막세포 배양액을 총 배양액 부피를 기준으로 20% 내지 30% 처리한 군에서 처리하지 않은 대조군과 비교하여 1.5배 정도 세포증식이 촉진된다. 또한 인간영양막세포 유래물을 10^4 particles/mL이상 처리하였을 때 대조군에 비해 세포증식이 촉진되며, 10^5 particles/mL 처리시 가장 우수한 결과를 보인다.

[0044] 또한 본 명세서의 실시예에 따르면, 상기 인간영양막세포 배양액을 중간엽줄기세포 배양액과 동량으로 처리하는 경우, 인간영양막세포 배양액 처리 시 세포 밀도가 중간엽줄기세포 배양액 처리군보다 증가하여, 중간엽줄기세포 배양액보다 피부증식 촉진 효능이 우수하다.

[0045] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 collagen I, collagen III, elastin, 및 fibronectin으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다.

[0046] 상기 collagen I, collagen III, elastin, 및 fibronectin은 모두 진피층 구성요소인 콜라겐과 엘라스틴, 피브로넥틴을 발현하는 유전자이며, 본 명세서의 실시예에서 검증하는 바와 같이, 인간영양막세포 배양액 처리 시 대조군 및 중간엽줄기세포 배양액 처리군보다 발현량이 증가한다.

[0047] 일 측에 따르면, 상기 인간영양막세포 배양액 또는 인간영양막세포 유래물은 인간피부섬유아세포의 세포이동을 촉진하는 효과를 갖는다.

[0048] 본 명세서의 실시예에서 스크래치 운드 어세이로 평가하는 바와 같이, 인간영양막세포 배양액 및 인간영양막세포 유래물은 대조군 및 중간엽줄기세포 배양액 처리군보다 인간피부섬유아세포의 세포이동을 촉진시킨다.

[0049] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 MMP1 또는 MMP3의 유전자 발현을 억제할 수 있다.

[0050] 상기 MMP1 및 MMP3는 콜라겐, 엘라스틴 및 프로테오글리칸 등 세포외기질 단백질의 저하를 일으키는 MMP(Matrix Metalloproteinase)를 발현하여 피부노화를 촉진하는 마커로 사용되고 있으며, 본 명세서의 실시예를 참조하면, 인간영양막세포 유래물이 상기 MMP1 및 MMP3의 발현을 억제하는 것을 알 수 있다.

[0052] 일 측에 따르면, 상기 조성물은hsa-miR-183-5p, hsa-miR-30c-2-3p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-320c, hsa-miR-320c, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-760, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-1301-3p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-340-5p, 및 hsa-miR-625-5p로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 miRNA를 포함할 수 있다.

[0053] 본 명세서의 실시예에서 검증하는 바와 같이, 인간영양막세포 배양액이 중간엽줄기세포 배양액과 비교하여도 우수한 피부재생 촉진 및 피부노화 억제 효과는, 각 배양액의 miRNA 분포, 보다 구체적으로는 인간영양막세포 배양액에서 세포내 기능을 하는 것으로 알려진 snRNA의 상대량이 중간엽줄기세포 배양액에서의 snRNA의 상대량보다 높음에 기인하는 것으로 보인다. 특히, 인간영양막세포 유래물의 중간엽줄기세포 유래물에 대한 fold change 비율 상위 20개의 miRNA 중 피부재생 및 피부노화와 관련한 miRNA가 19개로 분석되었다.

[0054] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화될 수 있다.

[0055] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 이러한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0056] 상기 약학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 종양내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다.

[0057] 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0058] 상기 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때, 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명의 또다른 실시예에 따르면, 인간영양막세포 배양액 또는 인간영양막세포 유래물을 유효성분으로 포함하는, 피부노화 억제 및 피부재생 촉진용 화장품 조성물이 제공된다.

[0060] 일 측에 따르면, 상기 화장품 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 페이스트, 크림, 겔, 연고, 패치, 파우더, 스프레이, 용액, 현탁액 및 유탁액으로 구성된 그룹에서 선택된 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 실시예1: 인간영양막세포 배양액(Conditioned Medium, CM) 및 유래물(Extracellular Vesicles, EV)제조 프로토콜 확립

[0065] 인간영양막세포는 ATCC로부터 세포 특성 및 균질도가 검증된 세포를 구매하여 RPMI1640 배양액에 1% 항생제, 5% exosome depleted FBS를 넣어 체외 배양하였다. 인간영양막세포는 태반 속 융모막으로부터 분리하여 사용할 수 있으며, 이는 공지된 방법에 의하여 수행하였다(Lucas Sagrillo-Fagundes et al., Journal of Visualized Experiments 2016). 인간영양막세포배양액 제조 조건은 다음과 같다. 1.5×10^6 세포로 $75cm^2$ 배양 컨테이너에서 72시간 배양 후 (50%세포밀도) 배양액을 교체한다. 이후 48시간에 배양액을 수거하여 원심분리기를 이용

하여 상층액 만을 얻고 0.2㎛ 공극(pore) 필터를 이용하여 멸균 후 바로 사용하거나 베지클(vesicle) 분리정제 과정을 진행한다. 동물혈청인 FBS 없이 인간영양막세포 배양액을 수급하기 위해서는 24시간 배양 후 수거하여 원심분리와 필터 멸균 후 사용할 수 있다. 배양액(CM) 중 베지클만을 분리 정제하기 위해 인간영양막세포 배양액 10mL에 2mL의 엑소퀵(Exoquick) 용액 (SBI 제조)을 섞어서 (5:1) 16시간 동안 4° C에서 엑소좀이 분리되도록 한 후 원심분리기를 이용하여 엑소좀을 수집한다. 분리된 엑소좀은 1/10 또는 1/20으로 희석하여 NTA (nanoparticle tracking analysis) 장비를 이용하여 크기와 농도를 분석하였다. 또한, 인간영양막세포 유래물의 엑소좀 마커 분석을 웨스턴 블랏(western blot)으로 실시하여 도 1에 나타내었다.

[0067] 실시예2: 인간영양막세포 배양액 및 유래물의 인간피부섬유아세포 증식 촉진 효과

[0068] 본 발명에서 사용한 인간 피부섬유아세포(Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDF)을 체외(in vitro) 피부재생 실험에 사용하였으며 10%(v/v) FBS(Fetal bonine serum) 및 1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)에서 37 ℃, 5% CO2 습한 환경에서 세포를 배양하였다.

[0069] 인간피부섬유아세포의 재생이 인간영양막세포 배양액 처리에 따라 증가하는 지 확인하고자 NHDF 세포를 같은 수로 부착시킬 때 인간영양막세포 배양액을 총 배양액 부피 기준 0~30%까지 처리하고 24, 72시간 후 세포 증식을 평가하였다. 10%이상 처리부터 유의적으로 세포 증식이 유도되었으며, 72시간 후 20~30% 처리군에서 처리하지 않은 대조군과 비교하여 1.5배 정도의 세포 증식이 촉진되었다. 이를 도 2에 나타내었다.

[0070] 인간영양막세포 유래물 (TB EV)은 0, 10^3 particles/mL, 10^4 particles/mL, 및 10^5 particles/mL의 농도에서 피부세포 증식 효능을 확인하였고 이를 도 3에 나타내었다. 10^5 particles/mL에서 가장 우수한 증식 효능을 보여주었다.

[0071] 또한, 인간영양막세포 배양액을 총 배양액 부피 기준 0, 10, 20, 및 60%로 처리하고 24, 48, 72시간 후 세포의 증식결과를 도 4에 이미지와 도표로 나타내었다. 인간영양막세포 배양액 처리량이 많을수록 인간피부섬유아세포의 증식이 촉진되는 것으로 확인할 수 있었으며, 배양 시간이 증가할수록 또한 피부 세포 증식이 증가하였다. 60% 처리에서도 세포 독성이 없음을 확인할 수 있었다.

[0073] 실시예3: 중간엽줄기세포 배양액과 인간피부섬유아세포 증식 촉진 효능의 비교

[0074] 인간영양막세포 배양액을 중간엽줄기세포 배양액 (MSC CM)과 동량으로 처리 후 NHDF 증식을 관찰한 결과 인간영양막세포 배양액 처리 시 세포 밀도가 보다 증가한 것으로 확인할 수 있었다. 이는 인간영양막세포 배양액이 중간엽줄기세포 배양액보다 피부세포 증식 촉진 효능이 우수하다는 결과이다. 평가 결과는 도 5에 광학현미경 사진으로 나타내었다.

[0076] 실시예4: 인간피부섬유아세포의 유전자 발현 유도 효과

[0077] 인간피부섬유아세포에 인간영양막세포 배양액과 중간엽줄기세포 배양액 처리 24시간 후 피부 진피층 구성 요소인 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 및 엘라스틴(elastin) 발현 유전자의 상대량을 PCR 로 분석하였다. 인간영양막세포 배양액 처리군에서 아무것도 처리하지 않은 대조군 및 중간엽줄기세포 배양액 처리군과 비교하여 CoL1, CoL3, Fibronectin1, 및 Elastin 유전자 발현 변화가 유의적으로 증가하는 것으로 분석되었으며, 이를 도 6에 나타내었다. 도표의 세로축은 대조군을 1로 놓았을 때의 Fold 값이다. 각각 collagen I은 70-fold, collagen III는 5-fold, elastin은 57-fold, fibronectin은 6.8-fold를 나타낸다.

[0079] 실시예5: 세포이동 촉진 효과

[0080] 인간영양막세포배양액 (TB CM)과 유래물 (TB EV)의 인간피부섬유아세포의 세포이동 촉진 효능을 검증하기 위해 스크래치 운드 어세이(scratch wound assay)를 통하여 평가하였다. 동일 수의 NHDF 세포가 부착된 플레이트(plate)에 스크래치(scratch)를 만든 후 인간영양막세포 유래물을 처리하고, 24시간 및 48시간 후 이미지를 관찰하고 세포이동을 정량화하여 평가하여 도 7에 나타내었다.

[0081] 줄기세포배양액 화장품 원료로 사용되고 있는 중간엽줄기세포 배양액 (MSC CM)과 비교하여 세포이동촉진 효능을 검증하기 위한 실험을 진행하였다. 스크래치 운드 어세이로, 동일 수의 NHDF 세포가 부착된 플레이트(plate)에 스크래치(scratch)를 만든 후 인간영양막세포 배양액과 중간엽줄기세포 배양액을 처리하고, 24시간 및 48시간 뒤의 세포이동을 관찰하였다. 그 결과를 도8에 나타내었으며, 인간영양막세포 배양액 처리군에서 보다 빠르게 세포 이동이 발생하는 것을 보여준다(24시간 후 관찰 이미지, 도 8). 특히, 인간영양막세포 배양액 처리 24시간 후 스크래치영역의 80%가 채워지는 것을 확인하였다. 상기 기재와 같이, 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 처리하였을 때, 우수한 세포이동촉진 효과를 확인하였다.

[0083] 실시예6: 피부노화 억제 효과

[0084] 인간피부섬유아세포에 인간영양막세포 유래물을 10^5 particles/mL로 처리 48시간 후 피부노화 촉진 마커인 MMP1과 MMP3 그리고 피부 진피층 구성 요소인 콜라겐과 피브로넥틴1 유전자 발현을 PCR 기법으로 분석하여 도 9에 나타내었다. 인간영양막세포 유래물 처리군에서 MMP1과 MMP3 유전자 발현이 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였고 콜라겐과 피브로넥틴1 유전자는 크게 증가하는 것으로 분석되었다. 이 결과를 통하여 인간영양막세포 유래물이 피부노화를 억제하고 피부 재생을 촉진하는 효능이 대조군 보다 우수함을 확인할 수 있었다.

[0085] 계대배양으로 세포노화가 발생한 NHDF세포에 대해 노화 억제 및 재생효능을 검증하기 위하여, 동일 세포 수의 노화된 NHDF에 인간영양막세포 배양액과 중간엽줄기세포 배양액을 각각 20%(v/v)로 처리한 후 72시간 후에 SA-GAL(Senescence-associated galactosidase) 염색을 통화여 노화 세포수를 이미징하고 정량화하여 도10에 나타내었다. 노화된 세포에서는 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase) 활성이 증가하게 되고 SA-GAL 염색법으로 푸른색이 발색되어 세포노화 지표법으로 사용된다. 인간영양막세포 배양액 처리 시 대조군 및 중간엽줄기세포 배양액 처리군과 비교하여 노화 NHDF 세포의 수가 30~40% 감소하는 것으로 확인할 수 있었으며, 세포 이미지에서도 선명한 세포의 모습을 관찰할 수 있었다.

[0086] 계대배양을 통한 자연노화 뿐만 아니라 자외선(UV)으로 인위적인 노화를 만든 후 인간영양막세포 배양액의 노화 억제 효능을 확인하여 도 11에 나타내었다. 인간영양막세포 배양액은 위와 마찬가지로 20%(v/v)로 처리되었다. UV에 의한 노화 촉진으로 세포사멸 및 노화 세포가 90%이상 나타난 대조군에 비해, 인간영양막세포 배양액을 처리한 군은 UV 노출 전과 후에 각각 처리 시 모두 세포 노화를 억제하는 것으로 나타났다.

[0087] 상기 서술한 바와 같이, 인간영양막세포 배양액 및 이의 유래물을 처리하였을 때, 인간피부섬유아세포 노화를 억제하는 효과를 확인할 수 있었다.

[0088] 피부세포에 스크래치 운드를 만든 후 인간영양막세포 배양액을 20% 처리한 군과 처리하지 않은 군을 48시간 후 유전자 발현 변화를 RNA-시퀀싱(sequencing) 분석으로 확인하였다. RNA-시퀀싱 분석은 인간영양막세포 배양액을 처리하지 않은 군과 비교하여 인간영양막세포 배양액이 처리된 군에서 유의적으로 변화된 유전자를 분석하여 보여준다. 도 12(a)의 도표를 참조하면, 유의적으로 발현이 증가된 유전자가 90개, 발현이 저하된 유전자는 70개였다. 이 160개 유전자를 DAVID 분석 프로그램을 이용하여 세포 내에서 나타날 수 있는 생리적 프로세스(biological process)를 분석하였다(도12(b)). 즉, 인간영양막세포 배양액 처리에 의해 피부세포의 증식, 이동이 촉진되는 현상을 확인하였고, 발현이 변화된 유전자 정보를 통하여 피부세포의 증식 및 이동이 촉진되는 기전을 분석하였다. 결과적으로 시토카인(cytokine) 신호 체계를 통하여 세포 증식 및 이동이 촉진되는 것으로 분석되었다. RNA-시퀀싱 분석 후 도출된 160개 유의적으로 변화된 유전자들을 KEGG 분석 프로그램을 통하여 세포 내 관여 신호 전달계를 분석하여 도 12(c)에 나타내었다. 또한, CXCL 계열 신호전달계가 관련되어 있음을, 도 12(d)에 (스크래치 후 인간영양막세포 배양액 처리된 HNDF의 폴드값 상대량)/(스크래치된 HNDF 대조군의 폴드값)의 도표로 나타내어 검증하였다.

[0089] 또한, 스크래치 운드가 형성된 인간피부섬유아세포에 인간영양막세포 배양액 처리 후 48시간 후 유전자 발현 변화를 확인하여 관련 메커니즘을 연구하였다. 분석 결과 외부 방어 기작과 CXCL 케모카인(chemokine) 관련 신호 전달계가 관련되어 있음을 확인하고 PCR로 검증하여 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0091] 실시예7: miRNA 분석

[0092] 인간영양막세포 유래물이 MSC 유래물과 비교하여 우수한 피부 재생 및 노화 억제 효능을 갖는 이유를 연구하기 위하여 유래물 내의 miRNA 분포를 분석하였다. 분석 결과를 도 13에 나타내었으며, 인간영양막세포 유래물에서

세포 내 기능을 하는 것으로 알려진 snRNA 분포가 70% 이상으로 나타난 반면, MSC 유래물은 snRNA 가 0.7%에 불과하였다.

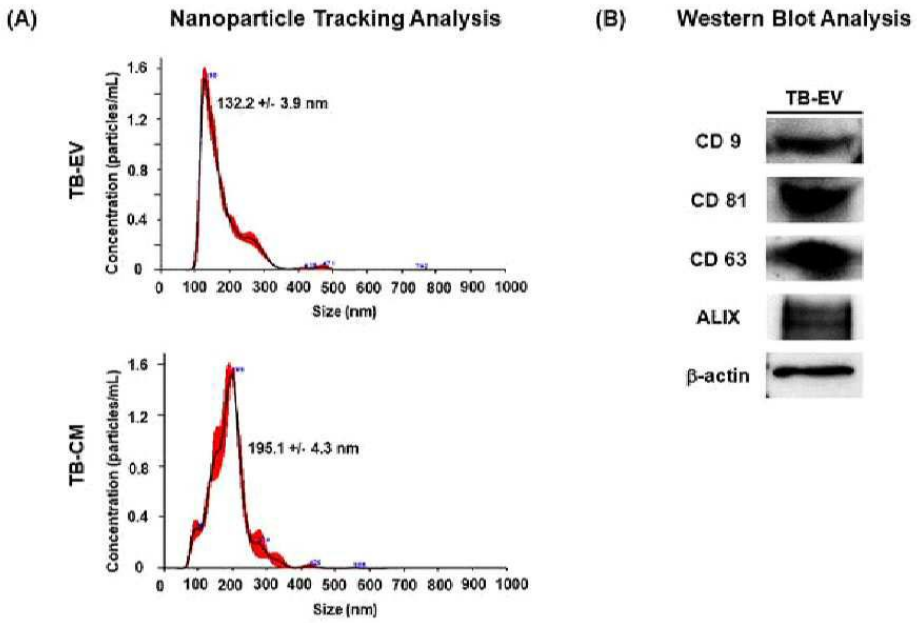
[0093] 또한, 인간영양막세포 유래물의 중간엽줄기세포 유래물에 대한 폴드 체인지(fold change) 비율 상위 20개의 miRNA 중 피부재생 및 피부노화와 관련한 miRNA가 19개로 분석되었다. 세포 증식, 이동, 분비 등 피부재생에 관련된 많은 miRNA가 인간영양막세포 유래물에 포함되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 이를 도 14에 나타내었다.

[0095] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

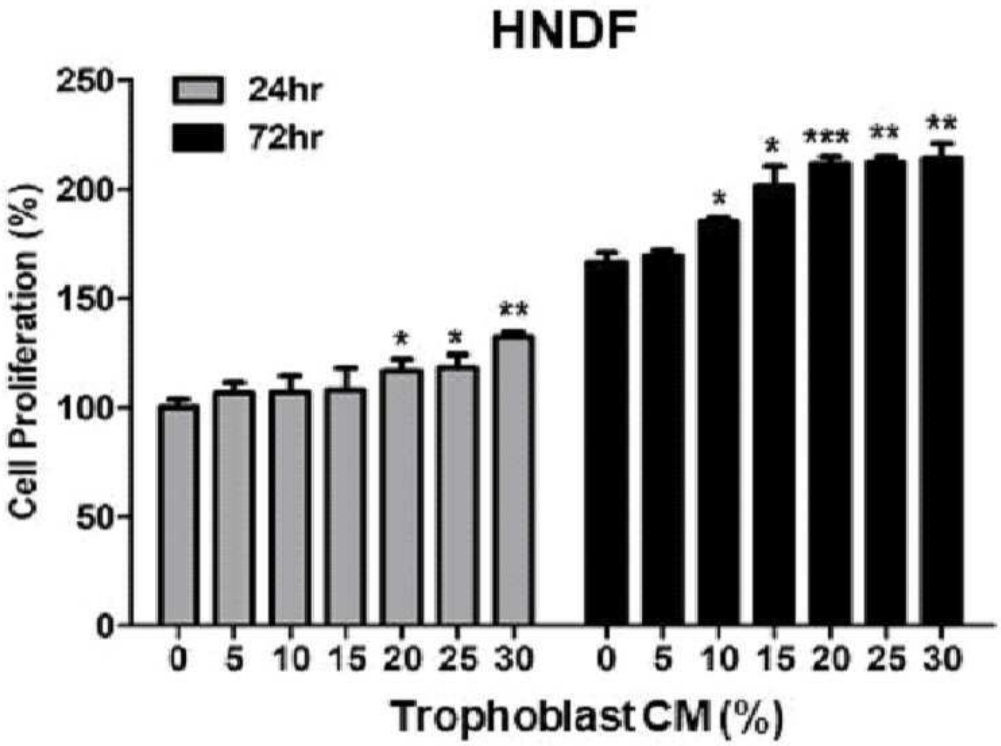
[0096] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

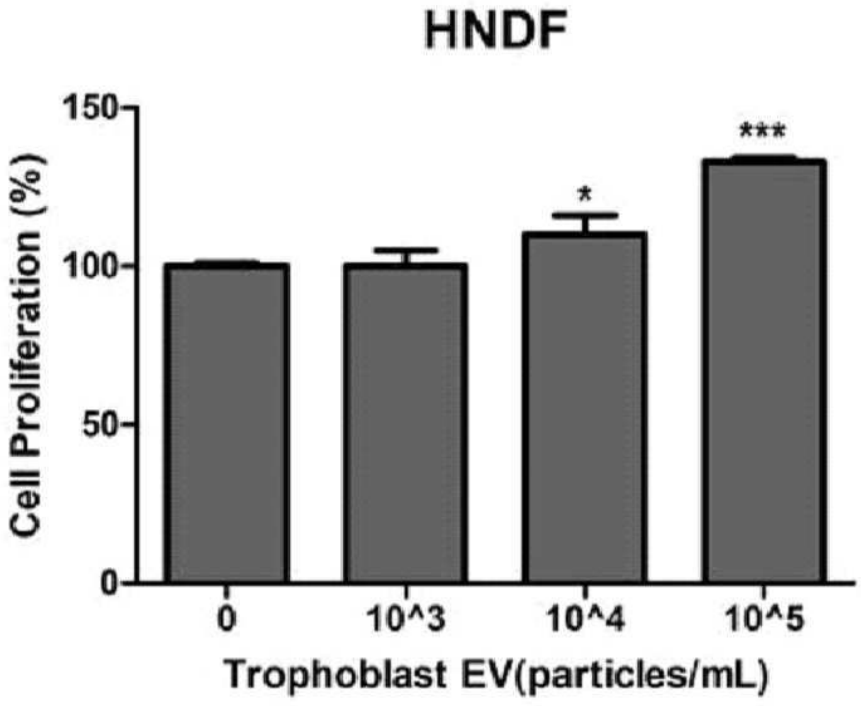
도면1



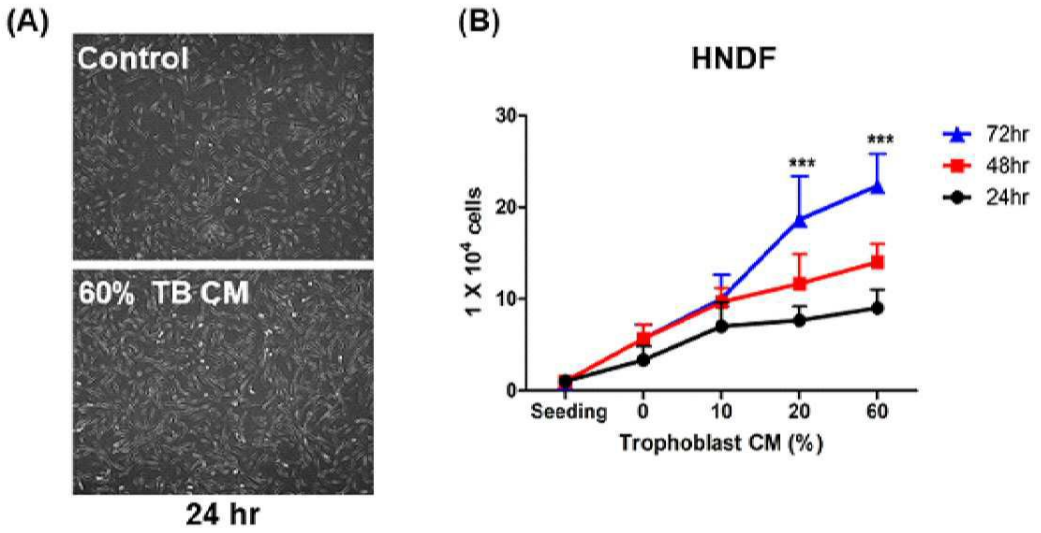
도면2


HNDF
24hr
72hr
Cell Proliferation (%)
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30 0 5 10 15 20 25 30
Trophoblast CM (%)

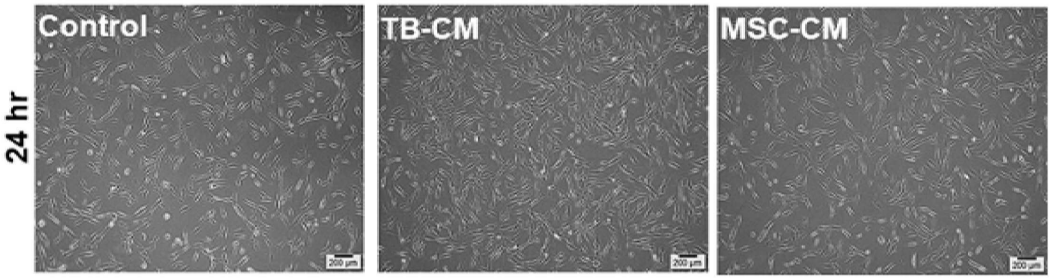
도면3


HNDF
Cell Proliferation (%)
150
100
50
0
0
10^3
10^4
10^5
Trophoblast EV(particles/mL)

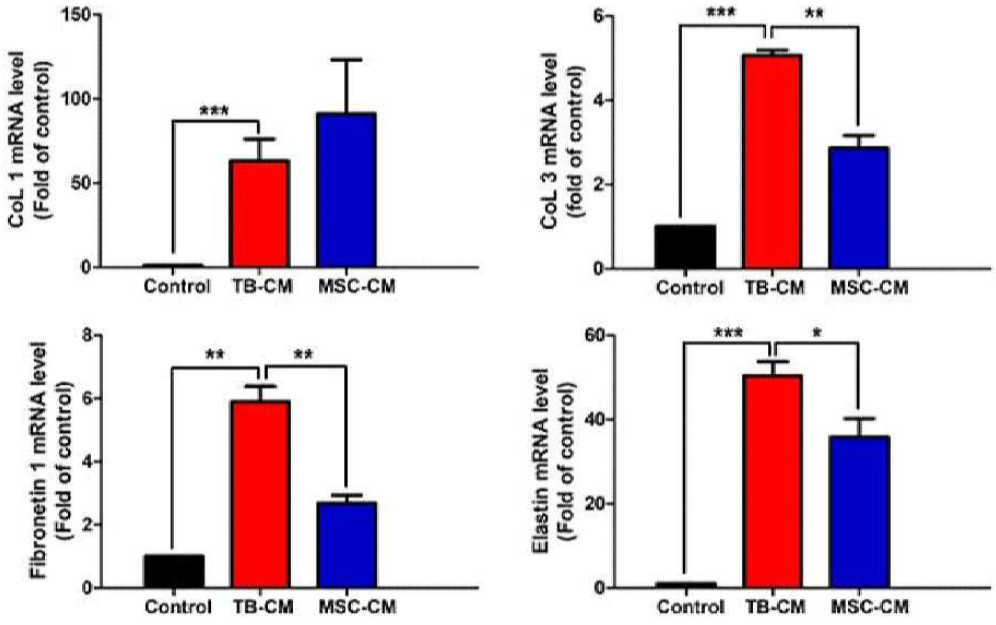
도면4


(A)
Control
60% TB CM
24 hr
(B)
HNDF
1 X 10^4 cells
30
20
10
0
***
***
72hr
48hr
24hr
Seeding
0
10
20
60
Trophoblast CM (%)

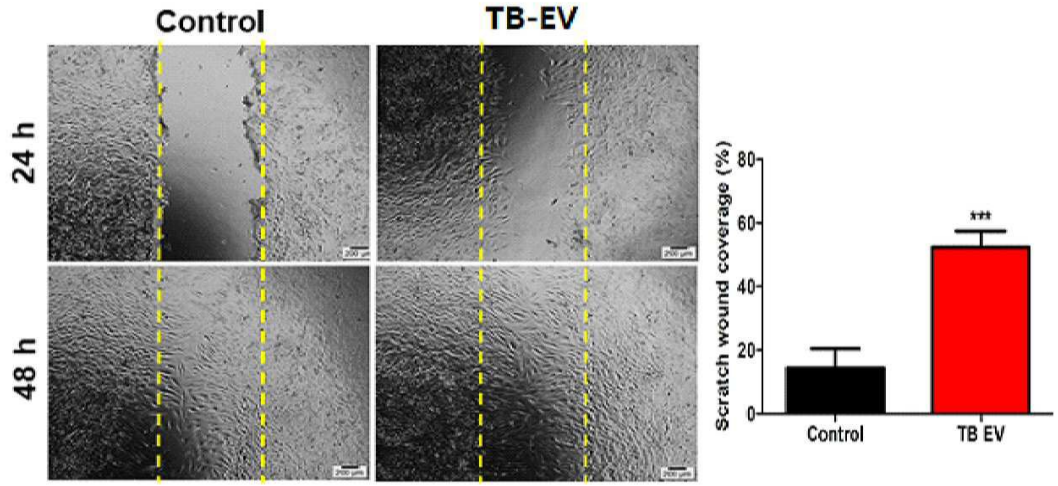
도면5


24 hr
Control
TB-CM
MSC-CM

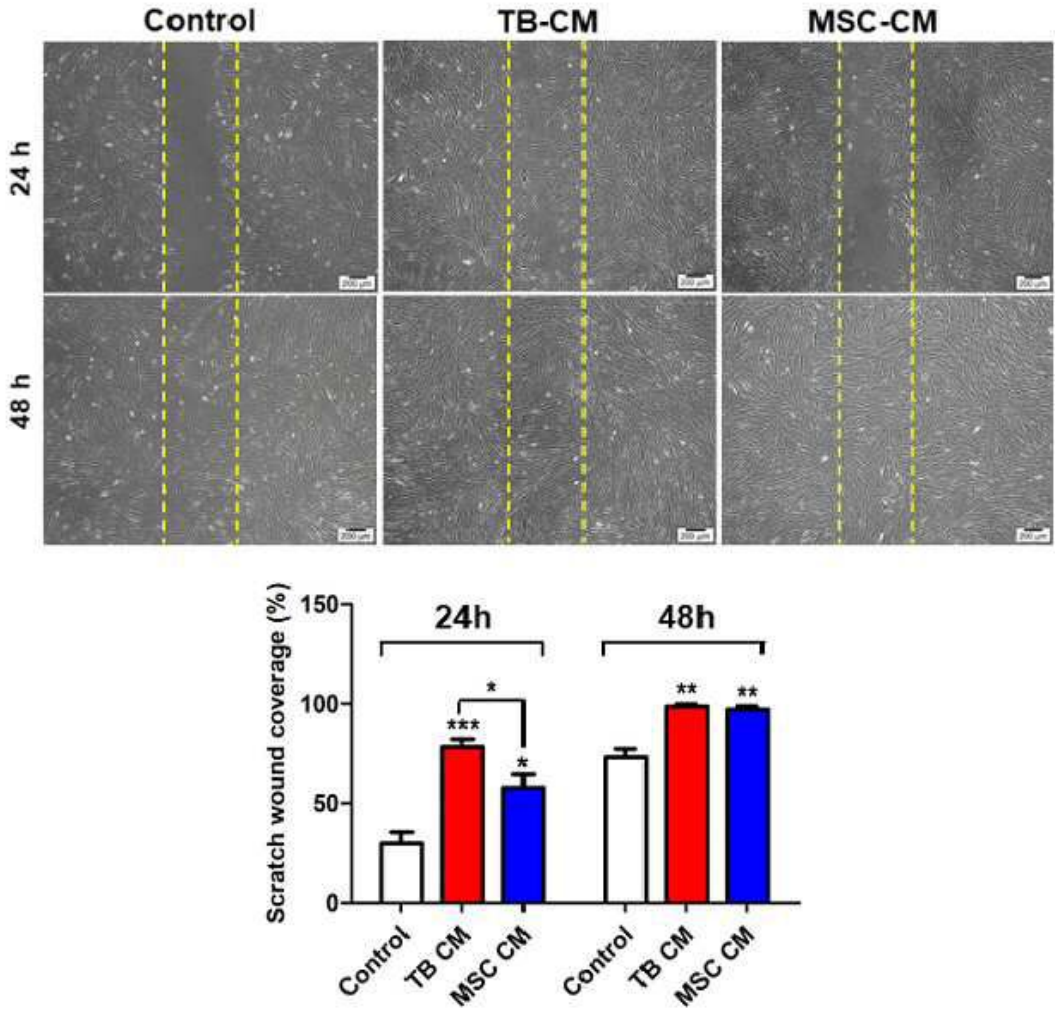
도면6


CoL 1 mRNA level (Fold of control)
150
100
50
0
***
Control
TB-CM
MSC-CM
CoL 3 mRNA level (fold of control)
6
4
2
0
***
**
Control
TB-CM
MSC-CM
Fibronetin 1 mRNA level (Fold of control)
8
6
4
2
0
**
**
Control
TB-CM
MSC-CM
Elastin mRNA level (Fold of control)
60
40
20
0
***
*
Control
TB-CM
MSC-CM

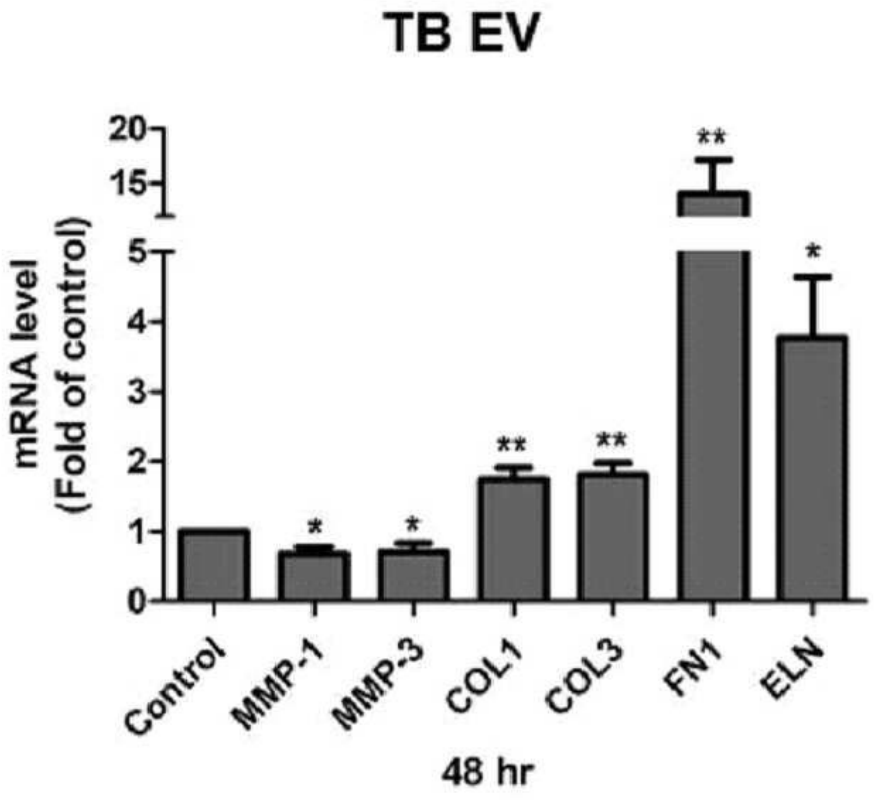
도면7


Control
TB-EV
24 h
48 h
Scratch wound coverage (%)
0
20
40
60
80
***
Control
TB EV

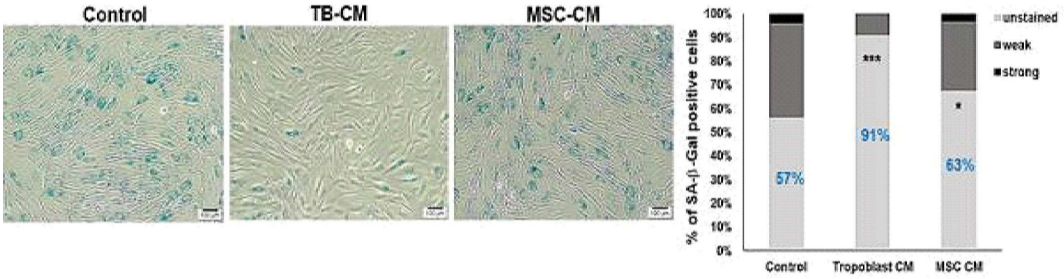
도면8


Control
TB-CM
MSC-CM
24 h
48 h
Scratch wound coverage (%)
0
50
100
150
24h
48h
*
***
*
**
**
Control
TB CM
MSC CM
Control
TB CM
MSC CM

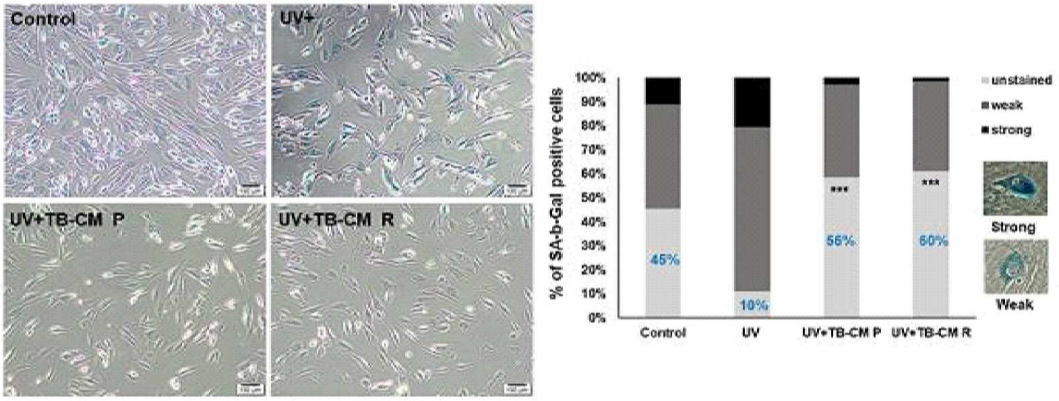
도면9



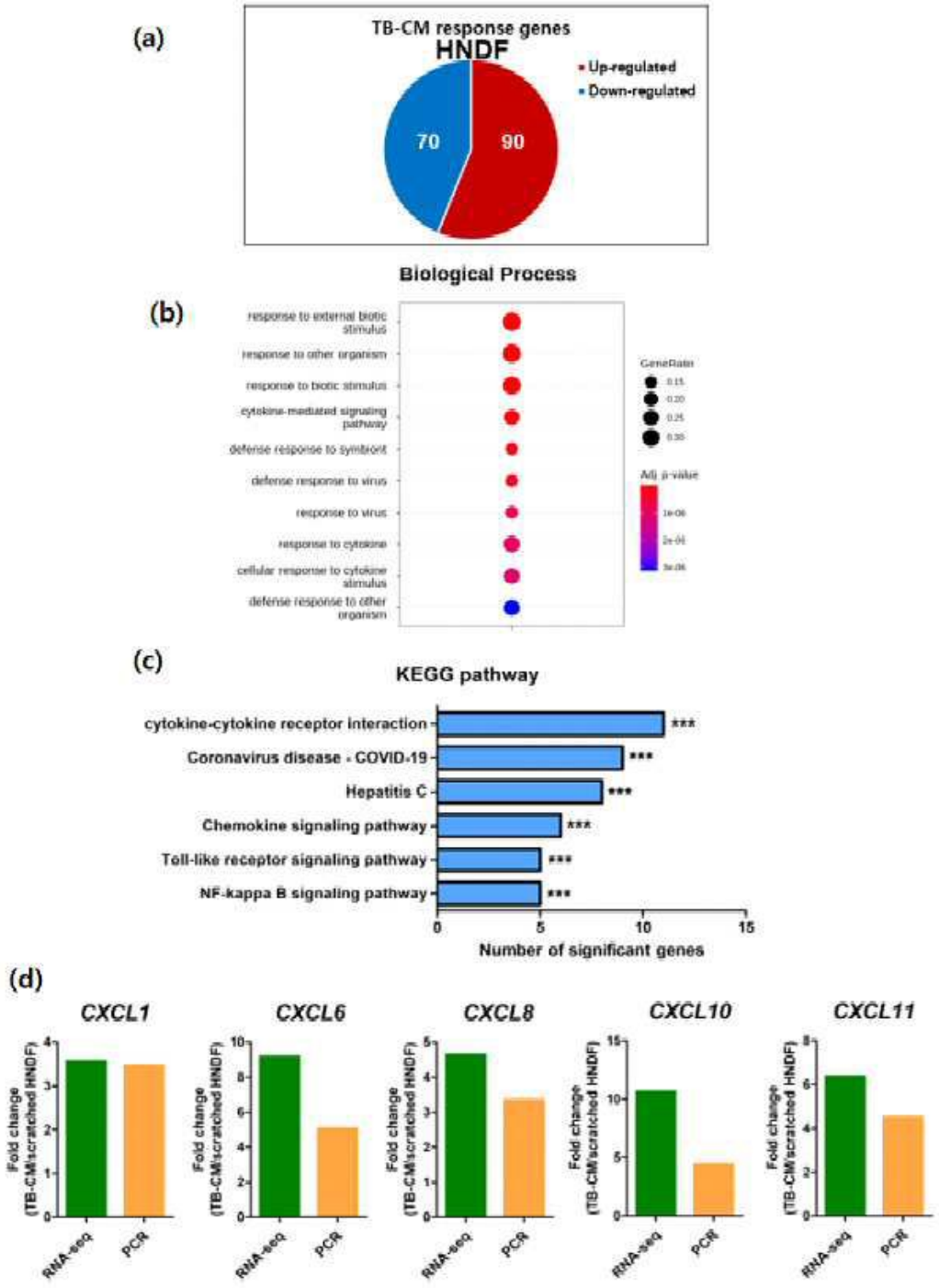
도면10



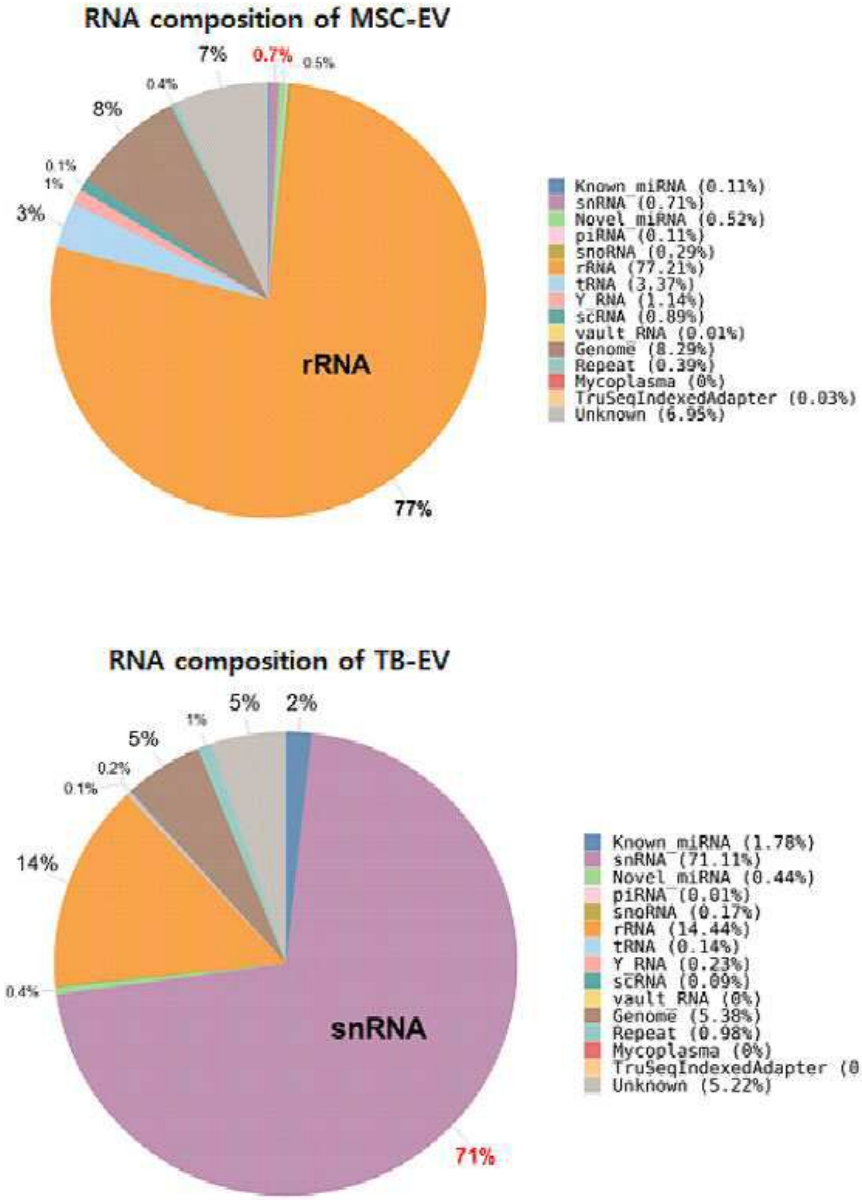
도면11



도면12


(a)
TB-CM response genes
HNDF
Up-regulated
Down-regulated
70
90
Biological Process
(b)
response to external biotic stimulus
response to other organism
response to biotic stimulus
cytokine-mediated signaling pathway
defense response to symbiont
defense response to virus
response to virus
response to cytokine
cellular response to cytokine stimulus
defense response to other organism
GeneRatio
Adj p-value
(c)
KEGG pathway
cytokine-cytokine receptor interaction
Coronavirus disease - COVID-19
Hepatitis C
Chemokine signaling pathway
Toll-like receptor signaling pathway
NF-kappa B signaling pathway
***
0
5
10
15
Number of significant genes
(d)
CXCL1
CXCL6
CXCL8
CXCL10
CXCL11
Fold change (TB-CM/scratched HNDF)
RNA-seq
PCR

도면13


RNA composition of MSC-EV
7%
0.7%
0.5%
0.4%
8%
0.1%
1%
3%
rRNA
77%
Known miRNA (0.11%)
snRNA (0.71%)
Novel miRNA (0.52%)
piRNA (0.11%)
snoRNA (0.29%)
rRNA (77.21%)
tRNA (3.37%)
Y_RNA (1.14%)
scRNA (0.89%)
vault_RNA (0.01%)
Genome (8.29%)
Repeat (0.39%)
Mycoplasma (0%)
TruSeqIndexedAdapter (0.03%)
Unknown (6.95%)
RNA composition of TB-EV
5%
2%
1%
5%
0.2%
0.1%
14%
0.4%
snRNA
71%
Known miRNA (1.78%)
snRNA (71.11%)
Novel miRNA (0.44%)
piRNA (0.01%)
snoRNA (0.17%)
rRNA (14.44%)
tRNA (0.14%)
Y_RNA (0.23%)
scRNA (0.09%)
vault_RNA (0%)
Genome (5.38%)
Repeat (0.98%)
Mycoplasma (0%)
TruSeqIndexedAdapter (0.01%)
Unknown (5.22%)

도면14

Table S1 1. Top 20 significantly up regulated aging-related genes in TB derived EV

	miRNA name	Fold change (TB/MSC)	Gene ontology function	GO number
1	hsa-miR-335-5p	[illegible]	extracellular space	
2	hsa-miR-183-5p	[illegible]	wound healing	GO:0090303
3	hsa-miR-30c-2-3p	[illegible]	wound healing	GO:0090303
4	hsa-miR-296-3p	[illegible]	Skin development, wound healing	GO:0043588, GO:0090303
5	hsa-miR-744-5p	[illegible]	Skin development	GO:0043588
6	hsa-miR-320c	[illegible]	wound healing	GO:0090303
7	hsa-miR-877-5p	[illegible]	Skin development	GO:0043588
8	hsa-miR-1224-5p	[illegible]	Skin development	GO:0043588
9	hsa-miR-423-5p	[illegible]	Skin development, wound healing	GO:0043588, GO:0090303
10	hsa-miR-106a-5p	[illegible]	wound healing	GO:0090303
11	hsa-miR-106b-5p	[illegible]	wound healing	GO:0090303
12	hsa-miR-210-3p	[illegible]	Skin development, cell migration, wound healing	GO:0043588, GO:0030335
13	hsa-miR-760	[illegible]	Skin development, collagen fibril organization	GO:0043588
14	hsa-miR-130b-3p	[illegible]	Skin development, wound healing	GO:0043588, GO:0090303
15	hsa-miR-1301-3p	[illegible]	Skin development, wound healing	GO:0043588, GO:0090303
16	hsa-miR-148b-3p	[illegible]	wound healing	GO:0090303
17	hsa-miR-769-5p	[illegible]	Skin development, wound healing	GO:0043588, GO:0090303
18	hsa-miR-182-5p	[illegible]	Skin development, wound healing	GO:0043588, GO:0090303
19	hsa-miR-340-5p	[illegible]	wound healing	GO:0090303
20	hsa-miR-625-5p	[illegible]	Skin development, wound healing, collagen fibril organization	GO:0043588, GO:0090303

DEG; 288 genes

Functional annotation	Number of significant genes	Association (%)
Cell proliferation	148	51
Cell migration	124	43
Aging	91	32
skin development	34	12
Secretion	108	36