

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2019년 12월 12일 (12.12.2019) WIPO | PCT

WO 2019/235784 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/0797 (2010.01) A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/006578

(22) 국제출원일: 2019년 5월 31일 (31.05.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0064704 2018년 6월 5일 (05.06.2018) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)
[KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 홍성희 (HONG, Sung Hoi); 04973 서울시 광진구 아차산로70길 61 503-1201, Seoul (KR). 황인식 (HWANG, In Sik); 04710 서울시 성동구 왕십리로33길 12-1, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

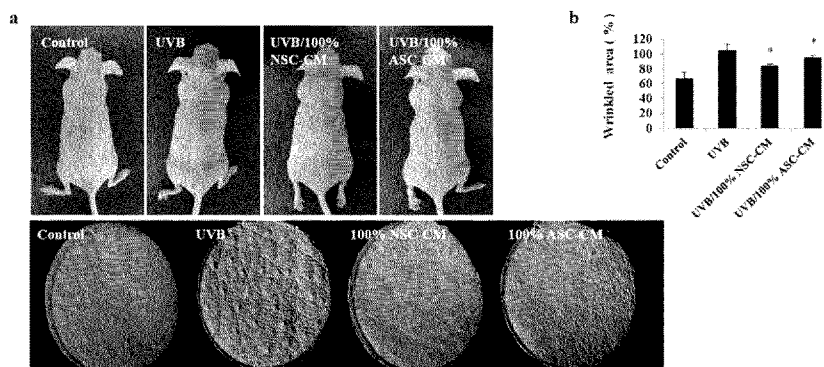
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: COSMETIC COMPOSITION FOR ANTI-AGING OR WRINKLE REDUCTION COMPRISING CULTURE BROTH OF NEURAL STEM CELLS AS ACTIVE INGREDIENT AND METHOD OF PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭: 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 항노화 또는 주름억제용 화장품 조성물 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method of preparing a culture broth of neural stem cells, having excellent abilities of reducing skin wrinkles or increasing skin elasticity, the culture broth comprising high concentrations of TIMP-1 and TIMP-2 capable of inhibiting the expression and activity of matrix metalloproteinases (MMPs) involved in collagen decomposition in the dermis. The culture broth of neural stem cells according to the present invention, which comprises, as active ingredients, high concentrations of TIMP-1 and TIMP-2 and low concentrations of various MMPs, restores the synthesis of collagen and elastin by suppressing the expression and activity of MMPs inhibiting collagen formation, and thus is useful as a composition for reducing skin wrinkles or increasing skin elasticity.

(57) 요약서: 본 발명은 진피내 콜라겐 분해에 관여하는 MMPs (matrix metalloproteinases)의 발현 및 활성을 억제할 수 있는 TIMP-1 및 TIMP-2를 고농도로 함유하는 피부주름 개선능 또는 피부탄력 증진능이 우수한 신경줄기세포 배양액의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 고농도의 TIMP-1, TIMP-2 및 저농도의 다양한 MMPs를 유효성분으로 함유하는 신경줄기세포 배양액은 콜라겐 생성을 억제하는 MMPs의 발현 및 활성을 억제함으로써 콜라겐과 엘라스틴의 합성을 회복시키므로, 피부주름 개선 또는 피부탄력 증진용 조성물로 유용하다.



WO 2019/235784 A1

명세서

발명의 명칭: 신경줄기세포 배양액을 유효성분으로 함유하는 항노화 또는 주름억제용 화장품 조성물 및 이의 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 고농도의 TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1), TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) 및 저농도의 다양한 MMPs를 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선능 또는 피부탄력 증진능이 우수한 신경줄기세포 배양액의 제조방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 진피내 콜라겐 분해에 관여하는 다양한 종류의 MMPs (matrix metalloproteinases) 발현의 감소와 활성을 억제할 수 있는 TIMP-1 및 TIMP-2를 고농도로 함유하는 신경줄기세포 배양액의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 피부는 외부 환경으로부터 인체를 보호하고, 다양한 생리적 기능을 담당한다. 피부는 크게 총 3개의 층인 표피, 진피 및 피하지방층으로 구성되어 있다. 표피는 주로 각질을 형성하는 세포와 멜라닌 색소를 생성하는 멜라닌 세포로 구성되며, 진피는 주로 콜라겐과 엘라스틴 탄력섬유로 구성되어 있는 결합조직과 기질로 이루어져 있으며, 근육, 모낭, 혈관, 신경 등이 그 속에 포함된다.
- [4] 피부 노화의 원인은 나이의 증가에 의해 발생하는 내부적인 원인과 외부 환경 등에 의해 유발되는 외부적인 원인이 있다. 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있는 콜라겐 (collagen)은 피부의 섬유아세포에서 생성되어 진피의 90%를 구성하고, 연령 및 자외선과 같은 외부 자극에 의해서 감소한다고 알려져 있다 (S.D. Shapiro., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10, 1996; Naylor EC *et al.*, *Maturitas*, 2011). 노화가 진행되거나 외부 자외선에 지속적으로 노출시 콜라겐을 포함한 결합조직을 분해하는 MMPs (matrix metalloproteinase)의 발현 및 활성의 증가로 피부 진피 조직내의 콜라겐 분해를 촉진시켜서, 콜라겐의 함량이 저하되는 원인으로 알려져 있다 (A. Mauviel., *J Cell. Biochem.*, 1993; T Quan *et al.*, *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009). 이때, MMPs의 발현 조절은 전사인자 (transcription factors) AP-1과 NFkB가 MMPs 유전자의 프로모터 (promoter)에 작용하여 하는 것으로 알려져 있다 (G.J. Fisher & J.J. Voorhees., *J Investig Dermatol Symp Proc.* , 1998; K. Abeyama *et al.*, *J Clin. Invest.* 2000). 또한, 조직내 콜라겐의 항상성 유지시 MMPs의 활성을 억제하는 TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)의 균형이 중요하게 작용한다.
- [5] TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)는 1, 2, 3, 4형이 존재하며, 생체내 존재하는 MMPs의 억제제 역할을 한다. 이 중에서 TIMP-1은 콜라게네이즈 타입 IV중 92 kDa의 MMP-9의 잠복형 (pro form) 및 MMP-1과 결합하여 MMP를

비가역적으로 억제한다고 알려져 있으며, TIMP-2는 콜라게네이즈 타입 IV중 72 kDa의 MMP-2 잠복형 (pro form)과 활성형 (active form)과 모두 결합하며, 특히 모든 MMPs의 활성형을 억제한다고 보고되어 있다 (Y.A. Declerck *et al.*, *Biochem. J.* 1993; W. Bode *et al.*, *Ann. NY Acad Sci.* 1999).

[6] 또한, 엘라스틴 (elastin)은 주름생성에 관여하는 중요한 섬유조직으로 콜라겐과 함께 피부 탄력에 관여한다고 알려져 있으며, 엘라스틴의 분해는 엘라스타아제라는 효소의 영향으로 조절된다고 알려져 있다 (J.H. Chung *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 117, 2001).

[7] 이에, 본 발명자들은 피부 주름 개선, 방지 및 피부 탄력 증진시킬 수 있는 조성물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 성체줄기세포인 신경줄기세포를 배양하여 피부 속 콜라겐의 합성 저해 및 분해를 촉진하는 다양한 MMPs의 기능을 비가역적으로 억제하는 TIMP-1, TIMP-2가 고농도로 존재하고, 다양한 MMPs가 저농도로 존재하는 신경줄기세포의 배양액 조성물을 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[8]

[9] 발명의 요약

[10] 본 발명의 목적은 콜라겐 생성을 억제하는 MMPs를 저농도로 함유하고, MMPs의 발현 및 활성을 억제하여 콜라겐과 엘라스틴의 합성을 회복시킬 수 있는 TIMP-1 및 TIMP-2를 고농도로 함유하는 피부주름 개선능 또는 피부탄력 증진능이 향상된 신경줄기세포 배양액의 제조방법 및 상기 배양액을 포함하는 화장품 조성물을 제공하는데 있다.

[11]

[12] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (a) 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)를 불멸화(immortalized)시키는 단계; 및 (b) 상기 불멸화 신경줄기세포를 비유도성 배지에서 배양하여 배양액을 수득하는 단계를 포함하는 TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 및 TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2)를 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선능 또는 피부탄력 증진능이 향상된 신경줄기세포 배양액의 제조방법을 제공한다.

[13] 본 발명은 또한, TIMP-1 및 TIMP-2를 포함하는 신경줄기세포의 배양액을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선용 또는 피부탄력 증진용 화장품 조성물을 제공한다.

[14] 본 발명은 또한, TIMP-1 및 TIMP-2를 포함하는 신경줄기세포의 배양액을 이용한 피부주름 개선 또는 피부탄력 증진 방법을 제공한다.

[15] 본 발명은 또한, 피부주름 개선 또는 피부탄력 증진에 사용하기 위한 TIMP-1 및 TIMP-2를 포함하는 신경줄기세포의 배양액의 용도를 제공한다.

[16] 본 발명은 또한, 피부주름 개선용 또는 피부탄력 증진용 화장품 조성물의 제조에 사용하기 위한 TIMP-1 및 TIMP-2를 포함하는 신경줄기세포의 배양액의

용도를 제공한다.

[17]

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 신경줄기세포 배양액을 인간 체세포에 처리시 세포독성 (cytotoxicity)이 없음을 WST-1를 통해서 확인한 것이다.

[19] 도 2는 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 인간 체세포에 처리시 UVB로 인해 증가된 활성산소 (ROS; reactive oxygen species)가 감소하는 것을 형광마이크로플레이트 판독기 (fluorescence microplate reader)를 이용하여 측정한 것이다.

[20] 도 3은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 인간 체세포에 처리시 UVB로 인해 증가된 활성산소 (ROS; reactive oxygen species)가 감소하는 것을 형광현미경 (fluorescent microscope)를 이용하여 분석한 것이다.

[21] 도 4는 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 인간 체세포에 처리시 UVB로 인해 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 발현이 억제됨을 qPCR을 통해 확인한 것이다.

[22] 도 5는 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 인간 체세포에 처리시 UVB로 인해 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 발현이 억제됨을 웨스턴블롯을 통해 확인한 것이다.

[23] 도 6은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 인간 체세포에 처리시 UVB로 인해 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 활성이 억제됨을 자이모그램 (zymography)을 통해 확인한 것이다.

[24] 도 7은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 인간 체세포에 처리시 UVB로 인해 감소된 콜라겐 (pro-collagen)이 다시 증가됨을 확인한 것이다.

[25] 도 8은 신경줄기세포 배양액내 MMPs의 활성을 억제하는 TIMP-1, TIMP-2를 확인한 것이다.

[26] 도 9는 제조합 단백질 TIMP-1, TIMP-2 및 신경줄기세포 배양액에 TIMP-1, TIMP-2 항체를 통해서 블록킹한 (neutralizing) 후, MMPs의 활성 억제를 확인한 것이다.

[27] 도 10은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 증가된 주름이 다시 감소함을 육안으로 확인한 것이다.

[28] 도 11은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 증가된 주름이 다시 감소함을 주름부위 면적 측정으로 확인한 것이다.

[29] 도 12는 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 증가된 ROS (reactive oxygen species)가 감소하는 것을 확인한 것이다.

[30] 도 13은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시

UVB로 인해 감소된 진피내 콜라겐 (collagen) 및 엘라스틴 (elastin)이 다시 증가함을 확인한 것이다.

- [31] 도 14는 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 진피내 콜라겐 (collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 발현이 감소함을 면역형광염색으로 확인한 것이다.
- [32] 도 15는 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 진피내 콜라겐 (collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 발현이 억제됨을 확인한 것이다.
- [33] 도 16은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 진피내 콜라겐 (collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 활성이 억제됨을 확인한 것이다.
- [34] 도 17은 신경줄기세포 배양액이 MMPs 발현을 조절하는 전사인자(transcription factors) 중 NFkB를 통해서 조절됨을 확인한 것이다.
- [35] 도 18은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 전사인자의 감소로 인해 진피내 콜라겐 (collagen)의 생성이 회복됨을 확인한 것이다.
- [36] 도 19는 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 유발되는 DNA 손상 (damage)을 DNA 수선 효소 (repair enzymes)중의 하나인 Rad50을 통해서 손상이 회복됨을 웨스턴블롯으로 확인한 것이다.
- [37] 도 20은 신경줄기세포 배양액을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 유발되는 DNA 손상 (damage) 정도를 γ H2AX로 확인한 것이다.
- [38] 도 21은 신경줄기세포 배양액과 지방줄기세포 배양액 각각의 노화억제 및 주름생성 억제효과를 비교한 것으로, (a)는 세포독성을 확인한 것이며, (b)는 각각의 배양액 처리시 MMPs 유전자의 RNA 발현 수준을 확인한 것이다.
- [39] 도 22의 (a)는 신경줄기세포 배양액과 지방줄기세포 배양액 각각 내에서 방출되는 MMP-1의 양을 비교한 것이며, (b)는 각각의 배양액을 UVB가 노출된 인간 체세포에 처리한 후, MMPs 단백질의 양을 확인한 것이다.
- [40] 도 23은 신경줄기세포 배양액과 지방줄기세포 배양액 내에 존재하는 (a) 전체 단백질의 양 및 (b) TIMP-1, TIMP-2의 양을 비교한 것이다.
- [41] 도 24는 신경줄기세포 배양액과 지방줄기세포 배양액 각각을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리하여 (a) UVB로 인해 생성된 주름의 억제 정도를 육안으로 확인 및 (b) 주름부위 면적을 측정하여 비교한 것이다.
- [42] 도 25는 신경줄기세포 배양액과 지방줄기세포 배양액 각각을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 (a) UVB로 인해 진피내 콜라겐 (collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 발현 억제 비교 및 (b) 진피내 콜라겐 (collagen)의 생성 또는 복원을 비교한 것이다.
- [43] 도 26은 신경줄기세포 배양액과 지방줄기세포 배양액 각각을 UVB가 노출된

암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 감소된 진피내 콜라겐 (collagen) 및 엘라스틴 (elastin)의 증가 정도를 비교한 것이다.

[44] 도 27은 신경줄기세포 배양액과 지방줄기세포 배양액 각각을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 UVB로 인해 진피내 콜라겐 (collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 발현의 감소를 면역형광염색으로 확인한 것이다.

[45] 도 28은 신경줄기세포 배양액과 지방줄기세포 배양액 각각을 UVB가 노출된 암컷 SKH-1 마우스에 처리시 (a) UVB로 인해 유발되는 DNA 손상 (damage)을 DNA 수선 효소 (repair enzymes)중의 하나인 Rad50을 통해서 손상이 회복됨을 웨스턴블롯으로 비교한 것이며, (b) 및 (c)는 UVB로 인해 유발되는 DNA 손상 (damage) 정도를 γ H2AX로 비교한 것이다.

[46]

[47] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[48] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[49]

[50] 본 발명에서는 인간 뇌의 뇌실영역 (ventricular zone)에서 추출한 신경줄기세포 (neural stem cells, NCSs)를 배양하여 수득한 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액을 자외선(UVB)에 노출된 인간 섬유아세포 (human dermal fibroblast)와 마우스에 처리하였다. 그 다음, 자외선(UVB)에 노출된 인간 섬유아세포 및 마우스 피부 조직에서 진피내 콜라겐의 분해에 관여하는 MMP-2 (matrix metalloproteinase 2), MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) 및 MMP-1 (matrix metalloproteinase 1)의 발현 및 활성이 신경줄기세포 배양액에 의해 억제되는 것을 확인하였으며, 이러한 MMPs의 억제에 의해 콜라겐의 합성이 복구 또는 촉진되는 것을 확인하였다. 아울러, 상기 콜라겐 합성의 복구 및 촉진을 통해 피부주름의 개선 또는 피부탄력을 증진시키는 유효성분으로 TIMP-1 및 TIMP-2가 고농도로 신경줄기세포 배양액에 포함되어 있음을 확인하였다.

[51] 따라서, 본 발명은 일관점에서 (a) 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)를 불멸화 (immortalized)시키는 단계; 및 (b) 상기 불멸화 신경줄기세포를 비유도성 배지에서 배양하여 배양 액을 수득하는 단계를 포함하는 TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 및 TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2)를 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선능 또는 피부탄력 증진능이 향상된 신경줄기세포 배양액의 제조방법에 관한 것이다.

[52] 본 발명에 있어서, 상기 배양액을 제조하기 위한 신경줄기세포는 그 종류에 제한을 받지 않는다. 바람직하게는 태아에서 유래한 성체 줄기세포이고, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 태아 뇌의 뇌실영역 (ventricular zone)에서 추출한

- 신경줄기세포를 사용하여 신경줄기세포 배양액을 제조하였다.
- [53] 본 발명에 있어서, 신경줄기세포 배양액이란 외배엽 줄기세포의 일종인 신경줄기세포를 계대배양하여 수득한 세포에서 방출되는 성분을 포함하는 물질이다.
- [54] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 TIMP-3 또는 TIMP-4를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [55] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 MMP-1 (matrix metalloproteinases-1), MMP-2 (matrix metalloproteinases-2), MMP-3 (matrix metalloproteinases-3) 및 MMP-9 (matrix metalloproteinases-9)의 발현 또는 활성을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [56] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 신경줄기세포 배양액내 TIMP-1, TIMP-2 성분이 MMPs (matrix metalloproteinases)의 발현 및 활성을 저해하여 주름개선, 방지 및 피부 탄력 증진에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 신경줄기세포 배양액에서 얻은 상등액을 사이토카인 어레이 및 웨스턴블롯을 통해 확인하였다.
- [57] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 신경줄기세포 배양액내 TIMP-1, TIMP-2 성분이 활성형 MMPs의 억제하여 주름 생성 개선 및 피부 탄력 증진에 관여하는 것을 젤라틴 자이모그램 (gelatin zymography) 통해서 확인하였다.
- [58] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 신경줄기세포 배양액, 제조합 단백질 TIMP-1 또는 TIMP-2를 각각 또는 함께 처리하거나, 항체를 통해서 각각 또는 함께 블로킹한 다음, 콜라게네이즈 타입 IV중 92 kDa의 MMP-9 및 72 kDa의 MMP-2 잠복형 (pro form)과 활성형 (active form)에 결합하여 MMPs의 활성형을 억제하는 것을 확인하였다.
- [59] 본 발명에서는 신경줄기세포 배양액내 TIMP-1, TIMP-2 성분의 주름 생성 개선 및 피부 탄력 증진 효과를 확인하기 위해서, 암컷 SKH-1 마우스의 등에 1주부터 4주까지는 UVB (30mJ/cm)를 3회/1주 처리한 다음 PBS (phosphate buffered saline) 및 신경줄기세포 배양액을 등에 각각 200 μ l (v/v)씩 도포하였다. 이후 5주부터 12주까지는 UVB (30mJ/cm)를 1회/1주 처리한 다음, PBS 및 신경줄기세포 배양액을 200 μ l (v/v)씩 도포하였다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 피부조직의 콜라겐 또는 엘라스틴을 회복시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [61] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 피부조직의 활성산소 (reactive oxygen species) 생성을 억제 또는 DNA 손상을 복구하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [62] 본 발명에서 사용되는 용어, '주름개선'은 피부의 주름 및 탄력과 관련된 능력을 유지 또는 강화시키는 것을 의미한다. 피부의 구조 중에서 진피층에 존재하는 교원섬유(collagen: 콜라겐)와 탄력섬유(elastin: 엘라스틴)가 그 역할을 하는 주요 단백질로서 피부 탄력을 주관하는데, 콜라겐의 생합성은 피부의 내,

외적 영향을 받게 된다. 구체적으로 피부 내적 요인으로는 자연 노화로 인하여 세포 활성이 감소되며, 콜라겐 섬유의 감소가 일어나고, 외적 요인으로는 자외선의 과량 조사 및 스트레스 등으로 인하여 생성된 활성 산소가 단백질의 티올기 (thiol: -SH)와 반응하여 효소의 활성을 저해하거나, 콜라겐, 엘라스틴 등을 분해시키는 효소(Matrix Metalloproteinases-1: MMP-1)인 콜라게나아제의 발현을 증가시켜 피부의 주름을 증가시키는 한편 탄력을 감소시키는 결과를 야기한다.

- [63] 본 발명의 신경줄기세포 배양을 위한 배지는 당업계에서 알려진 기본 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM (α -Minimal essential Medium), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Isocove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 가장 바람직하게는 DMEM 배지일 수 있다.
- [64] 또한, 상기 기본 배지에는 5 ~ 10% (v/v)의 FBS를 포함하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 배양하였다.
- [65] 본 발명에 있어서, 상기 비유도성 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum) 및 1% penicillin/streptomycin이 포함된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [66] 본 발명의 조성물의 제조는 통상적으로 사용되는 어떠한 방법으로도 제조될 수 있으며, 신경줄기세포를 단리하고 배양하고 분리하는 과정은 본 발명의 방법에 한정되지 않고 당업계에서 통상적으로 수행되는 방법으로 실시가능하다.
- [67]
- [68] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액은 TIMP-1, TIMP-2를 유효성분으로 함유하므로 MMPs 발현 및 활성형 MMPs를 억제하여 주름개선, 방지 및 피부 탄력 증진용 조성물로 사용될 수 있다.
- [69] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 및 TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2)를 포함하는 신경줄기세포의 배양액을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선용 또는 피부탄력 증진용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [70] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포의 배양액은 TIMP-3 또는 TIMP-4를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [71] 또한, 상기 신경줄기세포의 배양액은 MMP-1 (matrix metalloproteinases-1), MMP-2 (matrix metalloproteinases-2), MMP-3 (matrix metalloproteinases-3), MMP-9 (matrix metalloproteinases-9), MMP-7 (Matrilysins), MMP-10 (Stromelysins) 및 MMP-13 (Collagenase)를 저농도로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [72] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서

추출된 신경줄기세포를 불멸화시켜 얻는 세포이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 태아 뇌의 뇌실영역 (ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)를 이용하고 이를 불멸화 (immortal)시켜 세포를 얻었다. 이를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 및 1% penicillin streptomycin이 포함된 비유도성 배지에 배양하여 비접착성 세포들은 제거하였다. 상기 과정으로 배양된 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)를 계대배양하는 과정에서 배양액을 수득하고 이를 원심분리하여 상등액을 여과를 통해서 수득하였다.

- [73] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포의 배양액은 MMP-1 (matrix metalloproteinases-1), MMP-2 (matrix metalloproteinases-2), MMP-3 (matrix metalloproteinases-3) 및 MMP-9 (matrix metalloproteinases-9)의 발현 또는 활성을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [74] 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 피부조직의 콜라겐 또는 엘라스틴을 회복시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [75] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 피부조직의 활성산소 (reactive oxygen species) 생성을 억제 또는 DNA 손상을 복구하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [76] 상기 DNA 손상 복구는 신경줄기세포 배양액에 의해 DNA 수선효소인 Rad50, Rad51 또는 XRCC4의 활성이 향상됨으로써 DNA 손상을 복구할 수 있다. 또한, 신경줄기세포 배양액은 gammaH2AX로 DNA 손상 정도를 파악하는 마크로 사용하는 것을 특징으로 한다.
- [77] 본 발명에 있어, '화장료 조성물'은 상기 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 포함하는 조성물로서 그 제형은 어떠한 형태라도 가능하다. 이러한 제형의 예로 상기 화장료 조성물을 이용하여 제조된 화장료는 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 세안제, 트리트먼트, 미용액, 미용팩, 연고제, 겔제, 리니먼트제, 액제, 패치 및 분무제로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형인 것인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [78] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 이러한 제형 중 어떠한 형태로도 제조되어 상용화될 수 있으며, 상기 예들에 한정되지 않는다.
- [79] 화장료 조성물로 제제화되는 경우, 상기 신경줄기세포 배양액의 함량은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 50 중량%이며, 바람직하게는 0.01 내지 10 중량%이다. 최소한의 자외선에 의한 피부 손상 개선 효과를 달성할 수 있도록 신경줄기세포 배양액의 함량은 상기 최소치 이상인 것이 바람직하며, 과량 첨가에 따른 사용감 저하 및 각종 제형에의 적용 가능성을 고려하여 신경세포 배양액의 함량은 상기 최대치 이하인 것이 바람직하다. 이때, 신경세포 배양액의

함량은 제형 또는 화장료 조성물에 함유되는 성분들의 함량에 따라 상기 범위 내에서 적절히 조절하는 것이 바람직하다.

- [80] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [81] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [82] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로 플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [83] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [84] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [85] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [86]
- [87] 본 발명은 또 다른 관점에서, TIMP-1 및 TIMP-2를 포함하는 신경줄기세포의 배양액을 이용한 피부주름 개선 또는 피부탄력 증진 방법에 관한 것이다.
- [88] 본 발명은 또 다른 관점에서, 피부주름 개선 또는 피부탄력 증진에 사용하기 위한 TIMP-1 및 TIMP-2를 포함하는 신경줄기세포의 배양액의 용도에 관한 것이다.
- [89] 본 발명은 또 다른 관점에서, 피부주름 개선용 또는 피부탄력 증진용 화장료

조성물의 제조에 사용하기 위한 TIMP-1 및 TIMP-2를 포함하는 신경줄기세포의 배양액의 용도에 관한 것이다.

[90]

[91] 실시예

[92] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[93]

[94] 실시예 1: 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 생산

[95] 태아 뇌의 뇌실영역 (ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)를 불멸화 (immortalized)시켜 세포를 얻었다.

[96] 구체적으로는, 14주 된 태아 신경세포 조직을 0.1% 콜라게나아제와 0.1%

히알루로니다아제 용액을 37°C에서 1시간 동안 처리하고, 0.05%

Trypsin-EDTA를 2-3분 처리하여 단일세포로 분리한 후, CD45-/CD133+/CD34-마커를 이용하여 FACS로 분리하였다. 이를 N-2 supplements, 0.2mg/ml heparin, 20ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factors), 20ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor) 및 10ng/ml LIF가 첨가된 human neurosphere 배양 배지에 배양하였다.

10-14일 경과 후, 형성된 neurospheres에 콜라게나아제를 처리하여 단일세포로 분리하고 레트로바이러스매개체 (retroviral vector)를 이용하여 v-myc 유전자를 형질도입 (transduction)하고 선별 (selection)하여 얻은 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum) 및 1%

penicillin/streptomycin이 포함된 비유도성 배지에 배양하였다 (Flax JD *et al.*,

Nature Biotechnology, 16, 1998; Lim H-C *et al.*, *Neuroscience Letters* 435:175-180,

2008). 150mm 배양 접시 (culture dishes)에 상기 세포 5×10^5 개를 분주하고, 배양

배지 15ml를 첨가 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 80% 세포밀집도 (cell confluence)에 도달시 배양액을 수득하였다. 이때, 배양배지는 DMEM (Dulbecco's

Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin

streptomycin이 포함된 비유도성 배지였고, 배양 후 비접착성 세포들은

제거하였다. 이러한 과정으로 배양된 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)를

계대배양하는 과정에서 배양액을 수득하였고, 이를 원심분리하여 상등액을

여과하였다.

[97]

[98] 실시예 2: 신경줄기세포 배양액의 인간체세포에 대한 세포독성 확인

[99] 인간체세포 5×10^3 세포를 96-웰플레이트 (96-well plate)에 접종하고,

세포밀집도 (cell confluence)가 80-90%에 도달시 신경줄기세포 배양액을 24시간

처리하였다. WST-1을 넣고 마이크로플레이트 판독기 (microplate reader)를

이용하여 450nm에서 측정하여, 신경줄기세포 배양액의 세포독성

(cytotoxicity)을 확인하였다.

[100] 그 결과, 신경줄기세포 배양액은 인간체세포 증식에 영향이 없음을 확인하였다 (도 1).

[101]

[102] 실시예 3: 신경줄기세포 배양액에 의한 UVB로 인해 증가되는 세포내 활성산소 억제 확인

[103] 인간체세포를 5×10^3 세포를 검은 96-웰플레이트(96-well plate)에 접종하고, 세포밀집도 (cell confluence)가 80-90%에 도달시 혈청이 없는 (serum free) DMEM으로 24시간 배양하였다. 이후, 신경줄기세포 배양액을 24시간 처리하고, 인간체세포를 UVB ($30\text{mJ}/\text{cm}^2$) 노출시킨 다음 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. UVB로 인해 증가되는 세포내 활성산소 (ROS; reactive oxygen species)를 신경줄기세포 배양액이 억제하는지 확인하기 위해서, $10\mu\text{M}$ dihydroethidium (DHE) 용액을 넣고 37°C 에서 30분 동안 처리하고 형광마이크로플레이트 판독기 (fluorescence microplate reader)를 이용하여 측정하였다.

[104] 그 결과, 신경줄기세포 배양액은 인간체세포에서 UVB로 인해 증가되는 세포내 활성산소의 감소에 효과가 있음을 확인하였다 (도 2).

[105] 또한, 24-웰플레이트 (24-well plate)에 커버슬립 (cover slip)을 이용하여 인간체세포를 접종하고, 세포밀집도 (cell confluence)가 80-90%에 도달시 혈청이 없는 (serum free) DMEM으로 24시간 배양하였다. 이후, 신경줄기세포 배양액을 24시간 처리하고, 인간체세포에 UVB ($30\text{mJ}/\text{cm}^2$) 노출시킨 다음 10% 혈청이 첨가된 DMEM으로 24시간 배양하였다. UVB로 인해 증가되는 세포내 활성산소 (ROS; reactive oxygen species)에 신경줄기세포 배양액이 미치는 영향을 확인하기 위해서, $10\mu\text{M}$ dihydroethidium (DHE)용액을 넣고 형광현미경 (fluorescent microscope)를 이용하여 분석하였다.

[106] 그 결과, 신경줄기세포 배양액은 인간체세포에서 UVB로 인해 증가되는 세포내 활성산소의 감소에 효과가 있음을 확인하였다 (도 3).

[107]

[108] 실시예 4: 신경줄기세포 배양액에 의한 인간체세포에서 MMPs의 발현 및 활성 억제 확인

[109] 인간체세포가 UVB 노출되면 콜라겐 (pro-collagen)의 분해가 촉진된다. 따라서 본 실시예에서는 이러한 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 발현 및 활성을 확인하였다.

[110] 인간체세포를 100mm 배양 접시에 접종하고, 세포밀집도 (cell confluence)가 80-90%에 도달시 혈청이 없는 (serum free) DMEM으로 24시간 배양하였다. 이후 신경줄기세포 배양액을 24시간 처리하고, 인간체세포를 UVB ($30\text{mJ}/\text{cm}^2$) 노출시킨 다음 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. UVB에 노출시 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진시키는 MMPs의 발현 및 활성에 대한

신경줄기세포 배양액의 효과를 qPCR (도 4), 웨스턴블롯 (도 5) 및 자이로그래프 (zymography) (도 6)을 이용하여 측정하였다.

[111] 그 결과, 신경줄기세포 배양액은 UVB에 의해 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진시키는 역할을 하는 MMPs의 발현 및 활성을 억제함을 확인하였다 (도 4 내지 6).

[112]

[113] 실시예 5: 신경줄기세포 배양액의 UVB로 인한 콜라겐 분해 억제 확인

[114] 인간체세포가 UVB 노출되면 콜라겐 (pro-collagen)의 분해가 촉진되며, 이러한 콜라겐 (pro-collagen)의 분해 촉진에는 MMPs가 관여함을 실시예 4에서 확인하였다. 따라서 본 실시예에서는 신경줄기세포 배양액을 통해 MMPs의 발현 및 활성을 억제하여 콜라겐 (pro-collagen)의 합성이 촉진됨을 확인하였다.

[115] 실시예 4와 동일한 방법으로 세포를 준비하고, 신경줄기세포 배양액을 24시간 처리하여 UVB에 의해 콜라겐 분해를 촉진시키는데 관여하는 MMPs의 발현 및 활성을 억제하였다. 이후, 신경줄기세포 배양액에 의해 MMPs의 발현 및 활성 억제에 따른 프로콜라겐 (pro-collagen)을 웨스턴블롯을 이용하여 측정하였다.

[116] 그 결과, 신경줄기세포 배양액이 UVB로 인해 촉진되는 콜라겐 분해에 관여하는 MMPs의 발현 및 활성을 억제하면, 콜라겐 (pro-collagen)의 합성이 촉진됨을 확인하였다 (도 7).

[117]

[118] 실시예 6: MMPs 활성 억제에 관여하는 신경줄기세포 배양액내 유효성분 (cytokines) TIMP-1/2확인

[119] 인간체세포를 150mm 배양 접시에 접종하고, 세포밀집도 (cell confluence)가 80-90%에 도달시 혈청이 없는 (serum free) DMEM으로 배양하였다. 48시간 배양하여 배양액을 수득하고 단백질양이 200ug이 되도록 시료를 준비한 다음, RayBio사의 Human Cytokine Antibody Array를 통해서 신경줄기세포 배양액내 성분을 사이토카인 array로 분석하였다.

[120] 그 결과, 신경줄기세포 배양액내 TIMP-1, TIMP-2가 존재함을 Human Cytokine Antibody Array를 통해서 확인하였으며, 다시 한번 웨스턴블롯 (Western-blot)으로 확인하였다 (도 8).

[121] 그 다음, 인간체세포를 100mm 배양 접시에 접종하고, 세포밀집도 (cell confluence)가 80-90%에 도달시 혈청이 없는 (serum free) DMEM으로 24시간 배양하였다. 이후 신경줄기세포 배양액 및 제조합 단백질 TIMP-1, TIMP-2를 각각 또는 함께 24시간 처리하고, 인간체세포를 UVB (30mJ/cm²) 노출시킨후 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. UVB로 인해 촉진되는 MMPs의 활성을 신경줄기세포 배양액이 억제하는지 분석하였다.

[122] 그 결과, TIMP-1, TIMP-2가 함유된 신경줄기세포 배양액은 UVB로 인해 증가되는 MMPs의 활성을 억제함을 확인하였다 (도 9).

[123]

- [124] 실시예 7: SKH-1 마우스에서 신경줄기세포 배양액에 의한 주름 생성 억제 확인
- [125] 7-1: 주름 생성 억제 효과
- [126] 암컷 SKH-1 마우스에 12주 동안 UVB (30mJ/cm² /1회)를 노출시키고 신경줄기세포 배양액을 처리한 다음, 12주에 마우스를 희생 (sacrifice) 시켰다. 신경줄기세포 배양액을 처리한 군(group)에서 주름생성 억제 및 주름개선 효과를 silicone replica를 통해서 분석하였다.
- [127] 그 결과, 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 주름생성 억제, 방지 및 주름개선 효과를 나타냄을 확인하였다 (도 10 및 도 11).
- [128]
- [129] 7-2: ROS (reactive oxygen species) 감소 효과
- [130] 실시예 7-1과 같이 조직을 준비하고, UVB로 인해 생성되는 ROS (reactive oxygen species)에 신경줄기세포 배양액이 미치는 영향을 DHE 염색으로 분석하였다.
- [131] 그 결과, 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 UVB로 인해 촉진되는 ROS (reactive oxygen species)가 감소되는 효과를 나타냄을 확인하였다 (도 12).
- [132]
- [133] 7-3: 콜라겐 및 엘라스틴 회복 효과
- [134] 실시예 7-1과 같이 조직을 준비하고, 마우스 피부조직을 4% 포름알데하이드에 고정하고 조직을 파라핀 제작 후, 3 μ m 두께로 절단한 조직을 슬라이드에 붙였다. 그 다음, UVB로 인해 감소되는 콜라겐 및 엘라스틴을 Masson's Trichrome 염색 및 Verhoeff's elastin 염색을 통해서 각각 분석하였다.
- [135] 그 결과, 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 UVB로 인해 감소되는 콜라겐 및 엘라스틴이 회복됨을 확인하였다 (도 13).
- [136]
- [137] 실시예 8: SKH-1 마우스에서 신경줄기세포 배양액에 의한 MMP-2 및 MMP-9 감소 확인
- [138] 8-1: UVB로 인해 증가되는 MMP-2 및 MMP-9의 감소
- [139] 실시예 7-1과 같이 조직을 준비하고, 마우스 피부조직을 4% 포름알데하이드에 고정하고, 조직을 파라핀 제작 후, 3 μ m 두께로 절단한 조직을 슬라이드에 붙이고 파라핀 제거 및 재수화 과정(deparaffinize and rehydrate)을 실시하였다. 그 다음, 항원 회수(antigen retrieval; citrate buffer, pH 6.0) 및 0.1% 트리톤(Triton) X-100을 처리하고, 정상 당나귀 혈청(normal donkey serum)으로 블로킹(blocking)한 후, 1차 항체를 1:100으로 24시간 처리하였다. 이후 2차 항체를 이용하여 1시간 동안 처리하고, DAPI 염색을 5분간 진행하였다. 벡타실드 마운팅 (vectashield mounting medium)제를 이용하여 슬라이드에 고정시킨 후 공초점 현미경(Confocal Microscope)으로 확인하였다.
- [140] 그 결과, 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 UVB로 인해 증가되는 MMP-2 및 MMP-9이 감소됨을 확인하였다 (도 14).

[141]

[142] 8-2: UVB로 인해 증가되는 MMPs를 조절하는 전사인자 NFkB

[143] 실시예 7-1과 같이 조직을 준비하고, 마우스 피부조직에서 UVB로 인해 촉진되는 진피내 콜라겐 (collagen)의 분해에 관여하는 MMPs의 발현 및 활성, 그리고 상기 MMPs를 조절하는 전사인자 (transcription factors) 발현을 웨스턴블롯으로 확인하였다 (도 15 내지 도 17). 또한, 신경줄기세포 배양액이 MMPs 및 MMPs를 조절하는 전사인자를 통해서 콜라겐 생성에 미치는 영향을 조사하였다 (도 18).

[144] 그 결과, 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 UVB로 인해 증가되는 MMP-1, MMP-2 및 MMP-9의 발현 (도 15)과 활성 (도 16)이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 이러한 MMPs를 조절하는 전사인자인 NFkB 역시 감소하는 것을 확인하였으며 (도 17), 이에 따라 진피내 콜라겐이 다시 회복됨을 확인하였다 (도 18).

[145]

[146] 실시예 9: 신경줄기세포 배양액에 의한 DNA 손상 억제 및 회복 확인

[147] 실시예 7-1과 같이 조직을 준비하고, 실시예 8-1과 동일한 방법으로 조직을 염색하여, UVB로 인해 유발되는 DNA 손상 (damage)정도를 γ H2AX로 확인하였다. 또한, 신경줄기세포 배양액이 DNA 손상에 미치는 영향을 확인하기 위해서 DNA 수선 효소 (repair enzymes)중의 하나인 Rad50을 웨스턴블롯을 통해서 확인하였다.

[148] 그 결과, 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 UVB로 인해 유발되는 DNA 손상 (damage)이 복구되었으며, 이때 DNA 수선 효소 (repair enzymes)중의 하나인 Rad50을 통해서 손상된 DNA가 복구됨을 확인하였다 (도 19 및 도 20).

[149]

[150] 실시예 10: 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액 생산

[151] 신경줄기세포 배양액 (neural stem cell conditioned medium; NSC-CM)과 지방줄기세포 배양액 (adipose-derived stem cell conditioned medium; ASC-CM)의 제조를 위해, 150mm 배양 접시 (culture dishes)에 상기 각각의 세포 5X10⁵ 개를 분주하고, 배양 배지 15ml를 첨가 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 80% 세포밀집도 (cell confluence)에 도달시 배양액을 수득하였다. 이때, 신경줄기세포 배양배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin streptomycin을 사용하였으며, 지방줄기세포 배양배지는 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12), 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin streptomycin이 포함된 비유도성 배지를 사용하였다. 배양 후 비접착성 세포들은 제거하였다. 이러한 과정으로 배양된 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs) 및 지방줄기세포 (adipose-derived stem cells, ASC)를 계대배양하는 과정에서 배양액을 수득하였고, 이를 원심분리하여 상등액을 여과하였다. 또한, 각각의 배양액이 세포독성 (cytotoxicity)이 없음을

WST-1를 통해서 확인하였다 (도 21a).

[152]

[153] 실시예 11: *in vitro*에서 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액에 의한 MMPs의 발현 억제 비교

[154] 11-1: MMPs의 발현 확인

[155] 인간체세포가 UVB 노출되면 콜라겐 (pro-collagen)의 분해가 촉진된다. 따라서 본 실시예에서는 이러한 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진하는 MMPs의 발현을 확인하고, 각각의 줄기세포 배양액 내 존재하는 MMP-1을 확인하였다.

[156] 인간체세포를 100mm 배양 접시에 접종하고, 세포밀집도 (cell confluence)가 80-90%에 도달시 혈청이 없는 (serum free) DMEM으로 24시간 배양하였다. 이후 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액을 24시간 처리하고, 인간체세포를 UVB (30mJ/cm²) 노출시킨 다음 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. UVB에 노출시 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진시키는 MMPs의 발현에 대한 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액의 효과를 qPCR (도 21b) 및 웨스턴블롯 (도 22b)을 이용하여 측정하였다.

[157] 그 결과, 신경줄기세포 배양액에서 UVB에 인해 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진시키는 역할을 하는 MMPs의 발현을 더 크게 억제함을 확인하였다.

[158]

[159] 11-2: 주름생성 억제 관련인자 비교

[160] 본 실시예에서는 콜라겐 (pro-collagen)의 분해를 촉진시키는 역할을 하는 MMPs 및 이들의 활성을 저해하는 인자 (TIMP-1 및 TIMP-2)가 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액 내에 존재하는지를 확인하였다. 각각의 배양액 내 단백질 총량을 Brad-ford (도 23a)를 통해서 확인하고, 이후 RayBio@Human cytokine antibody array를 통해서 MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10 및 -13의 농도를 분석하였다 (도 22a). 또한, 각각의 배양액을 처리하고 이후 MMPs의 발현을 웨스턴블롯 (도 23b)를 통해서 분석하였다.

[161] 그 결과, 신경줄기세포 배양액 내에는 콜라겐의 분해를 촉진 시키는 MMP-1, MMP-2, MMP-3 및 MMP-9의 함량이 훨씬 더 적었으며, 또한 MMPs의 활성을 억제 시키는 TIMP-1 및 TIMP-2의 함량이 지방줄기세포 배양액보다 높았다. 그리고, 다른 MMP-7, MMP-10 및 MMP-13의 함량은 각각의 배양액 내 유사하게 존재함을 확인하였다. 따라서, 신경줄기세포 배양액 내 주요 MMPs의 함량이 낮으므로 콜라겐의 보호 능력이 더 좋을 것으로 예측 할 수 있다.

[162]

[163] 실시예 12: *in vivo*에서 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액의 효과 비교

[164] 12-1: SKH-1 마우스에서 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액에 의한 주름 생성 억제 확인

[165] 암컷 SKH-1 마우스에 12주 동안 UVB (1주-4주는 30mJ/cm² /3회, 5주-12주는

30mJ/cm² /1회)를 노출시키고 신경줄기세포 배양액을 처리한 다음, 12주에 마우스를 희생 (sacrifice) 시켰다. 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액을 처리한 군(group)에서 주름생성 억제 및 주름개선 효과를 silicone replica를 통해서 분석하였다.

[166] 그 결과, 지방줄기세포 배양액 보다 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 주름생성 억제, 방지 및 주름개선 효과가 더 크게 개선됨을 확인하였다 (도 25a 및 도 25b).

[167]

[168] 12-2: SKH-1 마우스에서 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액에 의한 콜라겐 및 엘라스틴 회복 효과

[169] 실시예 7과 같이 조직을 준비하고, 마우스 피부조직을 4% 포름알데하이드에 고정하고 조직을 파라핀 제작 후, 3 μ m 두께로 절단한 조직을 슬라이드에 붙였다. 그 다음, UVB로 인해 감소되는 콜라겐 및 엘라스틴을 Masson's Trichrome 염색 및 Verhoeff's elastin 염색을 통해서 각각 분석하였다.

[170] 그 결과, 지방줄기세포 배양액 보다 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 UVB로 인해 감소되는 콜라겐 및 엘라스틴이 더 크게 회복됨을 확인하였다 (도 26).

[171]

[172] 실시예 13: *in vivo*에서 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액에 의한 MMPs의 발현 억제 비교

[173] 실시예 7-1과 같이 조직을 준비하고, 마우스 피부조직을 4% 포름알데하이드에 고정하고, 조직을 파라핀 제작 후, 3 μ m 두께로 절단한 조직을 슬라이드에 붙이고 파라핀 제거 및 재수화 과정(deparaffinize and rehydrate)을 실시하였다. 그 다음, 항원 회수(antigen retrieval; citrate buffer, pH 6.0) 및 0.1% 트리톤(Triton) X-100을 처리하고, 정상 당나귀 혈청(normal donkey serum)으로 블로킹(blocking)한 후, 1차 항체를 1:100으로 24시간 처리하였다. 이후 2차 항체를 이용하여 1시간 동안 처리하고, DAPI 염색을 5분간 진행하였다. 벡타실드 마운팅 (vectashield mounting medium)제를 이용하여 슬라이드에 고정시킨 후 공초점 현미경(Confocal Microscope)으로 확인하였다.

[174] 그 결과, 지방줄기세포 배양액 보다 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 UVB로 인해 증가되는 MMP-2 및 MMP-9이 더 크게 감소됨을 확인하였다 (도 27).

[175]

[176] 실시예 14: 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액에 의한 DNA 손상 억제 및 회복 확인

[177] 실시예 7-1과 같이 조직을 준비하고, 실시예 8-1과 동일한 방법으로 조직을 염색하여, UVB로 인해 유발되는 DNA 손상 (damage)정도를 γ H2AX로 확인하였다. 또한, 신경줄기세포 배양액 및 지방줄기세포 배양액이 DNA 손상에

미치는 영향을 확인하기 위해서 DNA 수선 효소 (repair enzymes) 중의 하나인 Rad50을 웨스턴블롯을 통해서 확인하였다.

- [178] 그 결과, 지방줄기세포 배양액 보다 신경줄기세포 배양액을 처리한 마우스에서 UVB로 인해 유발되는 DNA 손상 (damage)이 복구되었으며, 이때 DNA 수선 효소 (repair enzymes) 중의 하나인 Rad50을 통해서 손상된 DNA가 더 크게 복구됨을 확인하였다 (도 28).

[179]

산업상 이용가능성

- [180] 본 발명에 따른 저농도의 다양한 MMPs 및 고농도의 TIMP-1 및 TIMP-2를 유효성분으로 함유하는 신경줄기세포 배양액은 콜라겐 생성을 억제하는 MMPs의 발현 및 활성을 억제하여 콜라겐과 엘라스틴의 합성을 회복시키므로, 피부주름 개선 또는 피부탄력 증진용 조성물로 유용하다.

[181]

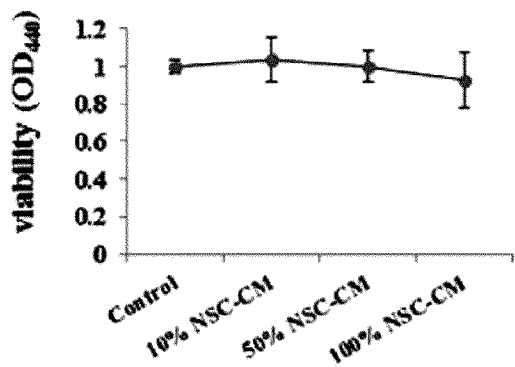
- [182] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

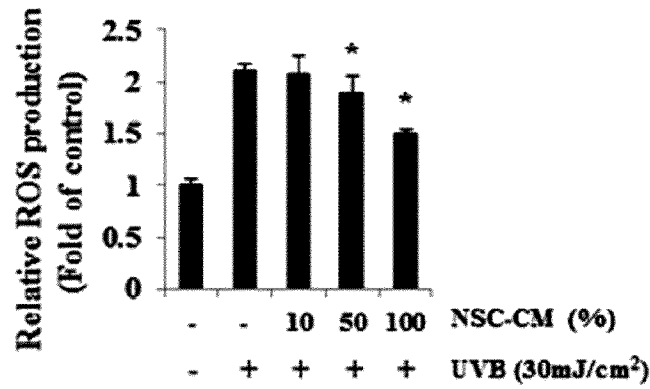
- [청구항 1] 다음 단계를 포함하는 TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 및 TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2)를 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선능 또는 피부탄력 증진능이 향상된 신경줄기세포 배양액의 제조방법:
 (a) 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)를 불멸화 (immortalized)시키는 단계; 및
 (b) 상기 불멸화 신경줄기세포를 비유도성 배지에서 배양하여 배양액을 수득하는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 TIMP-3 또는 TIMP-4를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 배양액의 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 MMP-1 (matrix metalloproteinases-1), MMP-2 (matrix metalloproteinases-2), MMP-3 (matrix metalloproteinases-3) 및 MMP-9 (matrix metalloproteinases-9)의 발현 또는 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 배양액의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 피부조직의 콜라겐 또는 엘라스틴을 회복시키는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 배양액의 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 피부조직의 활성산소 (reactive oxygen species) 생성을 억제 또는 DNA 손상을 복구하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 배양액의 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 DNA 손상 복구는 Rad50, Rad51 또는 XRCC4의 활성 증가를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 배양액의 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 비유도성 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum) 및 1% penicillin/streptomycin이 포함된 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 배양액의 제조방법.
- [청구항 8] TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 및 TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2)를 포함하는 신경줄기세포의 배양액을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선용 또는 피부탄력 증진용 화장료 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 신경줄기세포의 배양액은 TIMP-3 또는 TIMP-4를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 신경줄기세포의 배양액은 MMP-1 (matrix metalloproteinases-1), MMP-2 (matrix metalloproteinases-2), MMP-3 (matrix metalloproteinases-3), MMP-9 (matrix metalloproteinases-9), MMP-7 (Matrilysins), MMP-10 (Stromelysins) 및 MMP-13 (Collagenase)를 저농도로

- 함유하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone) 유래인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 신경줄기세포의 배양액은 MMP-1 (matrix metalloproteinases-1), MMP-2 (matrix metalloproteinases-2), MMP-3 (matrix metalloproteinases-3) 및 MMP-9 (matrix metalloproteinases-9)의 발현 또는 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 피부조직의 콜라겐 또는 엘라스틴을 회복시키는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 14] 제8항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 피부조직의 활성산소 (reactive oxygen species) 생성을 억제 또는 DNA 손상을 복구하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 DNA 손상 복구는 Rad50, Rad51 또는 XRCC4의 활성 증가를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 16] 제8항에 있어서, 상기 신경줄기세포 배양액은 gammaH2AX로 DNA 손상 정도를 파악하는 마크로 사용하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 17] 제8항에 있어서, 상기 화장품은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 세안제, 트리트먼트, 미용액, 미용팩, 연고제, 겔제, 리니먼트제, 액제, 패치 및 분무제로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형인 것인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

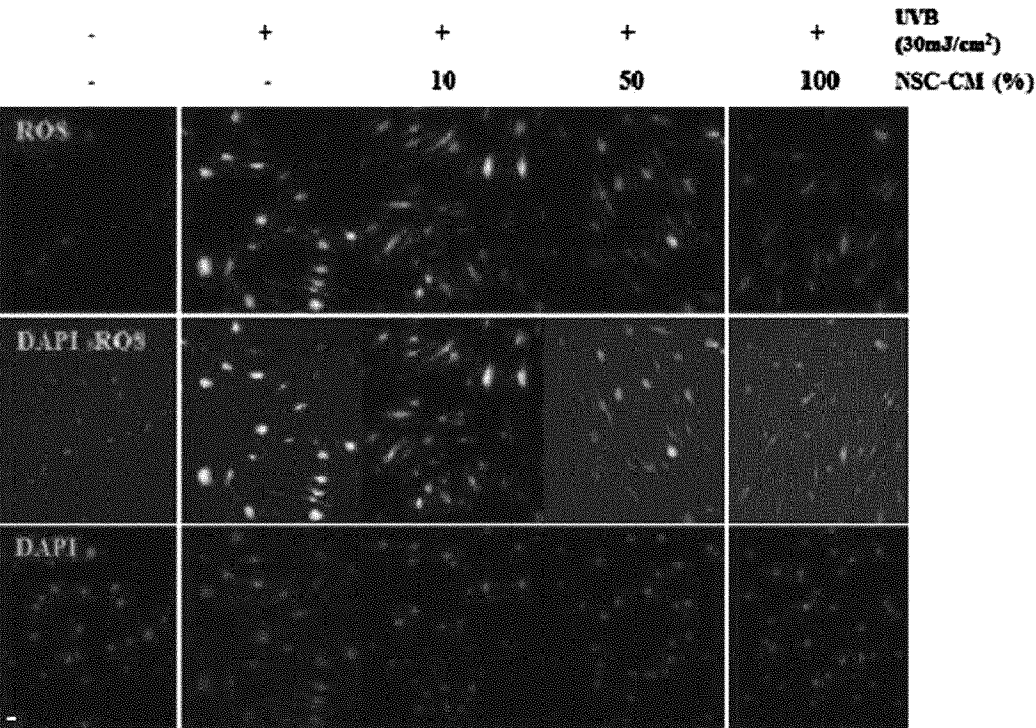
[도1]



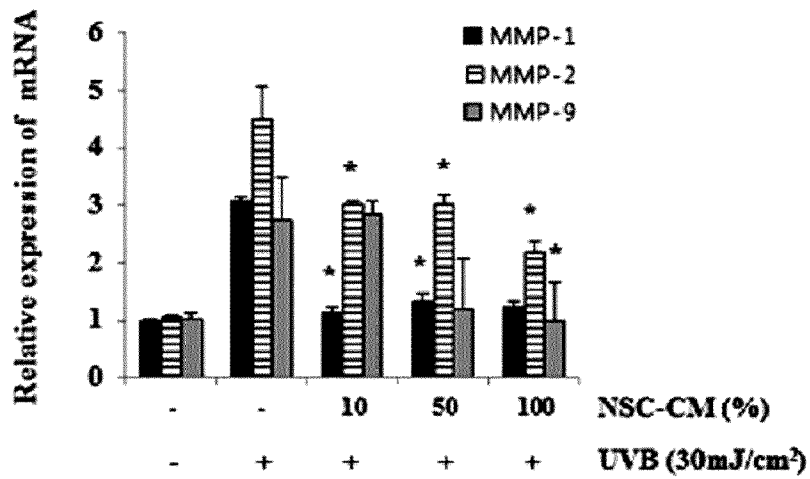
[도2]



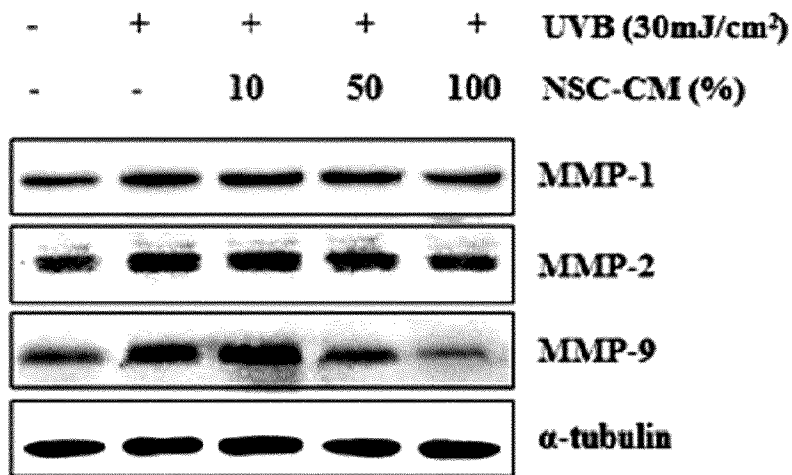
[도3]



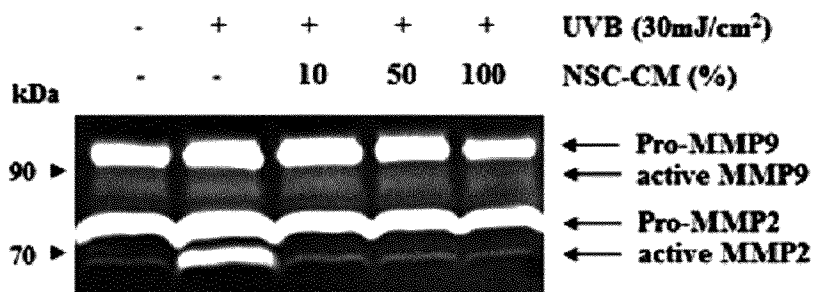
[도4]



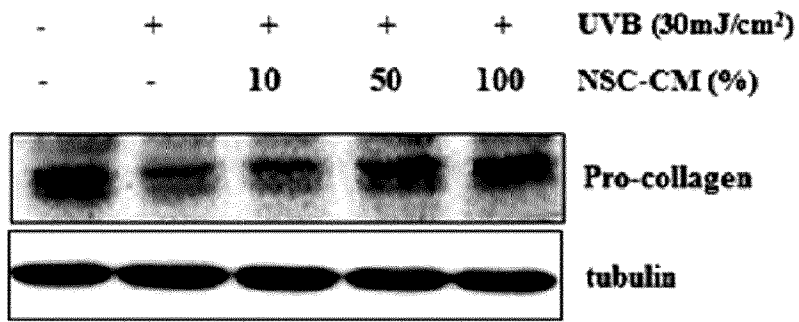
[도5]



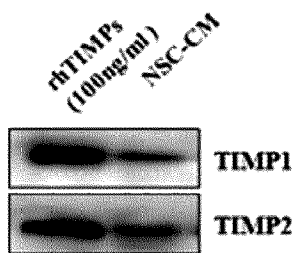
[도6]



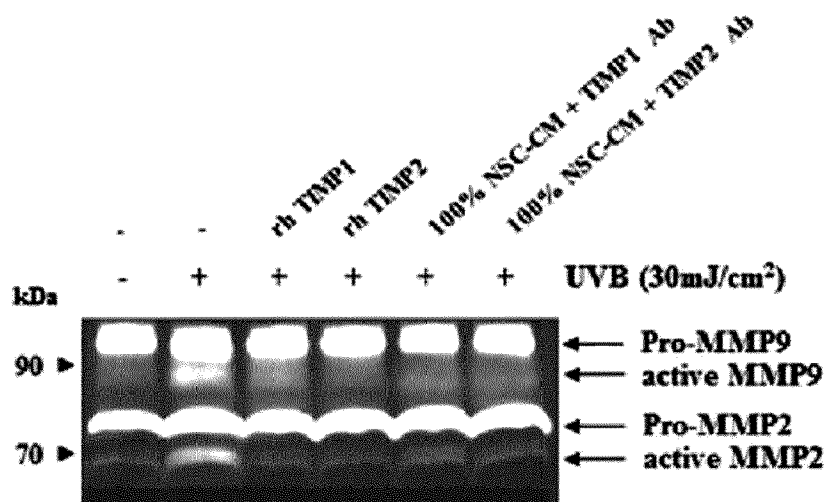
[도7]



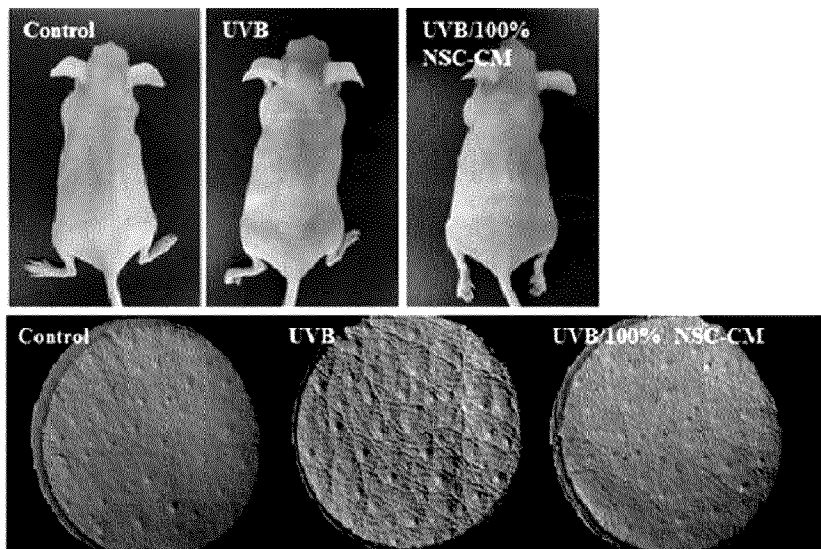
[도8]



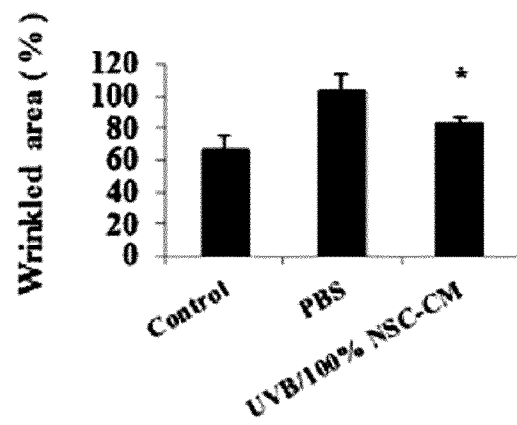
[도9]



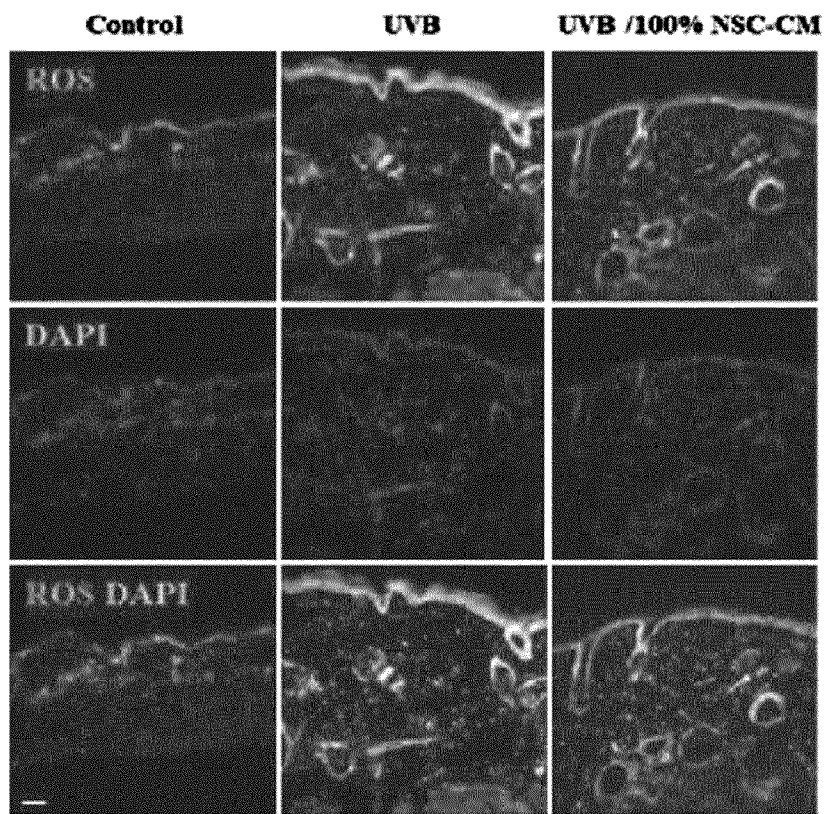
[도10]



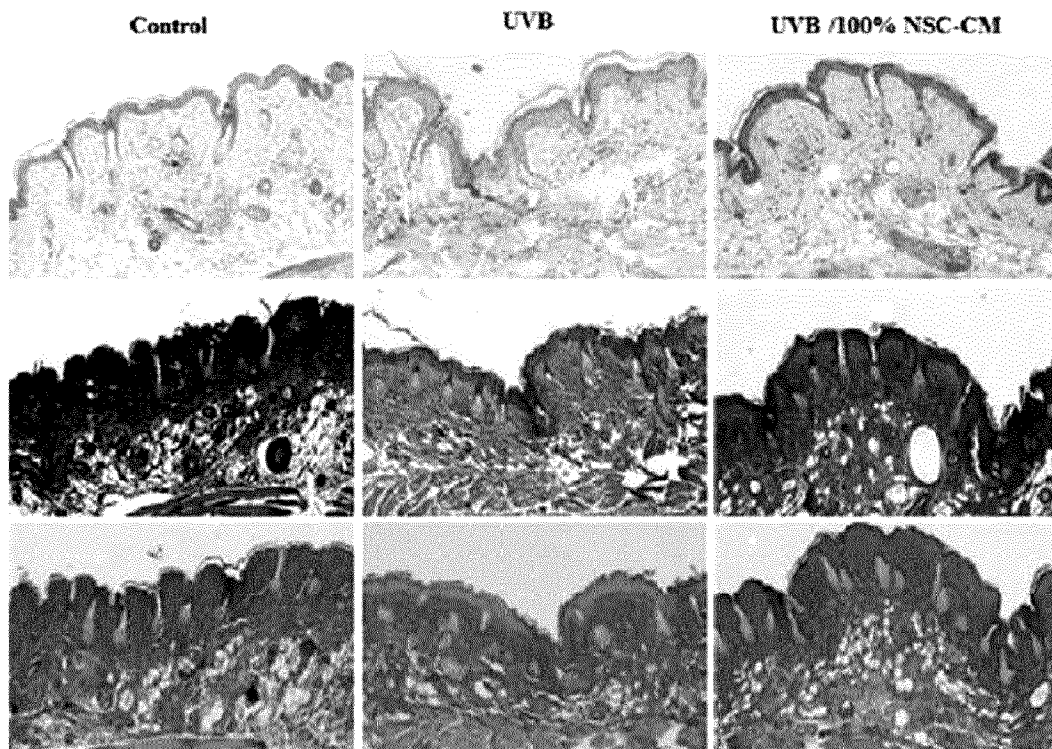
[도11]



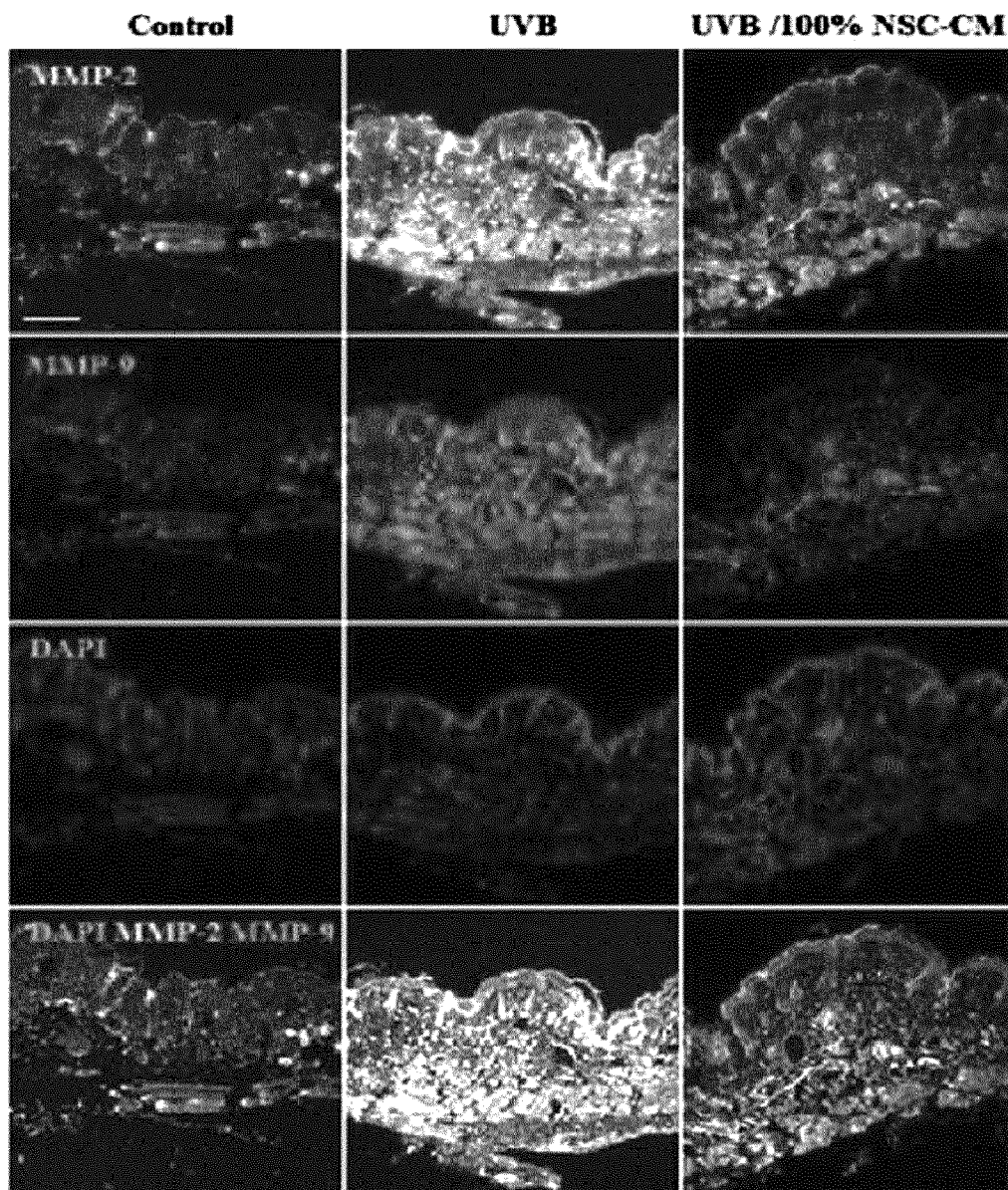
[도12]



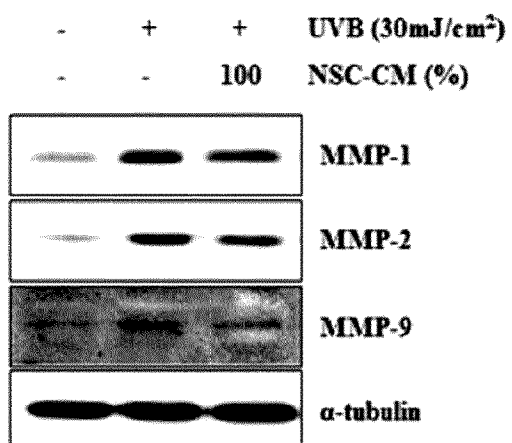
[도13]



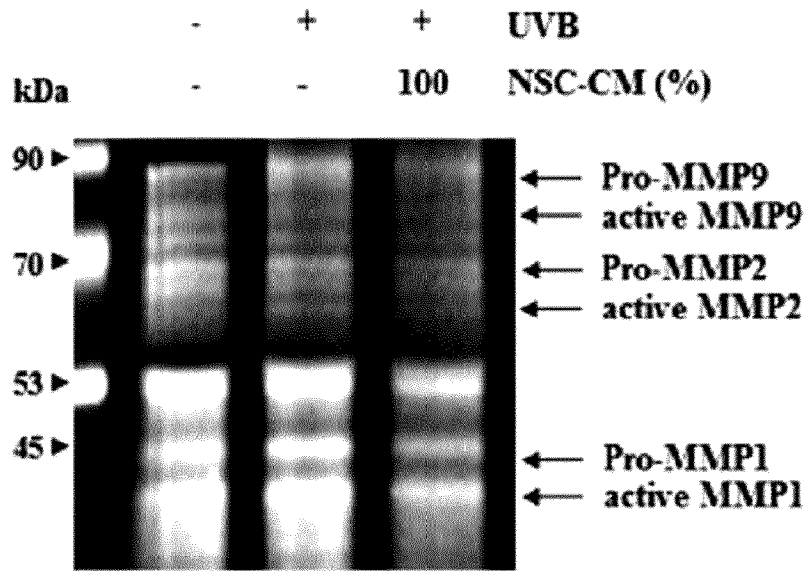
[도14]



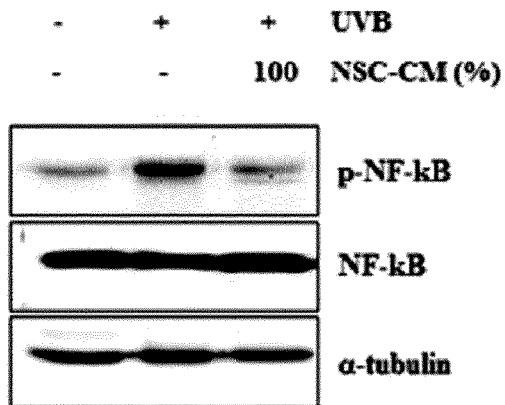
[도15]



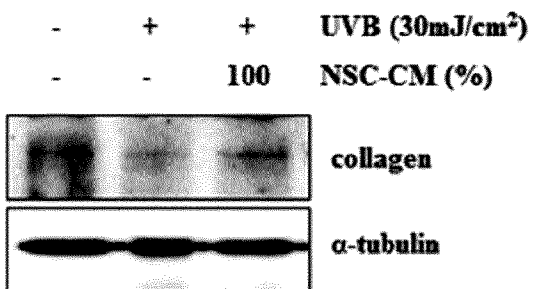
[도16]



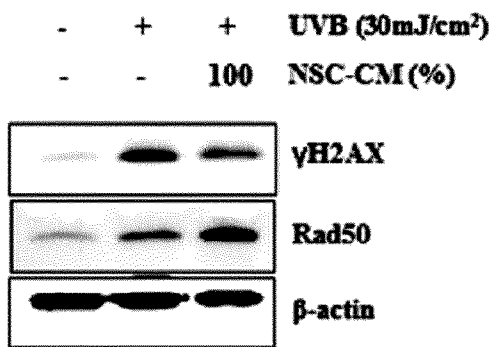
[도17]



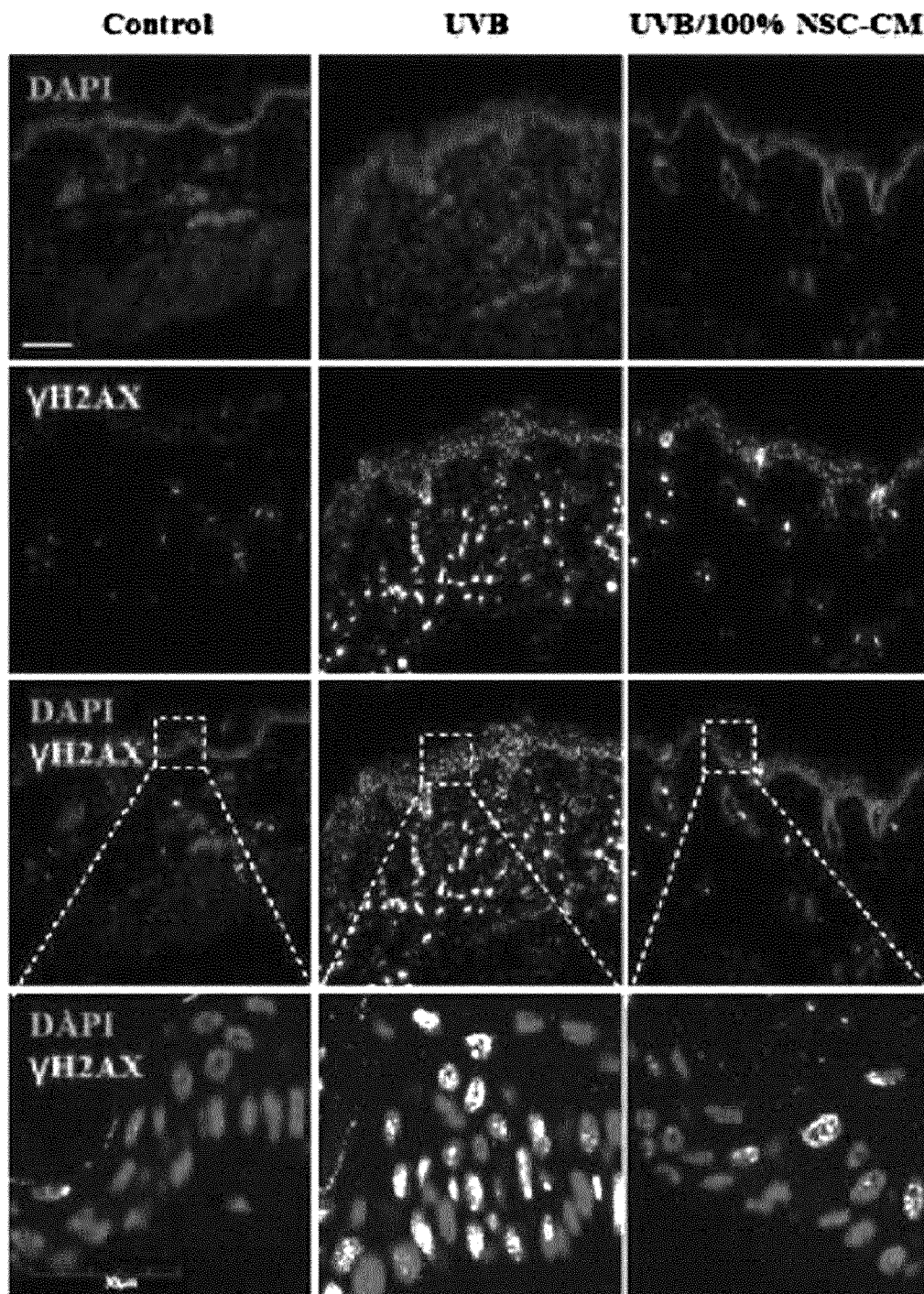
[도18]



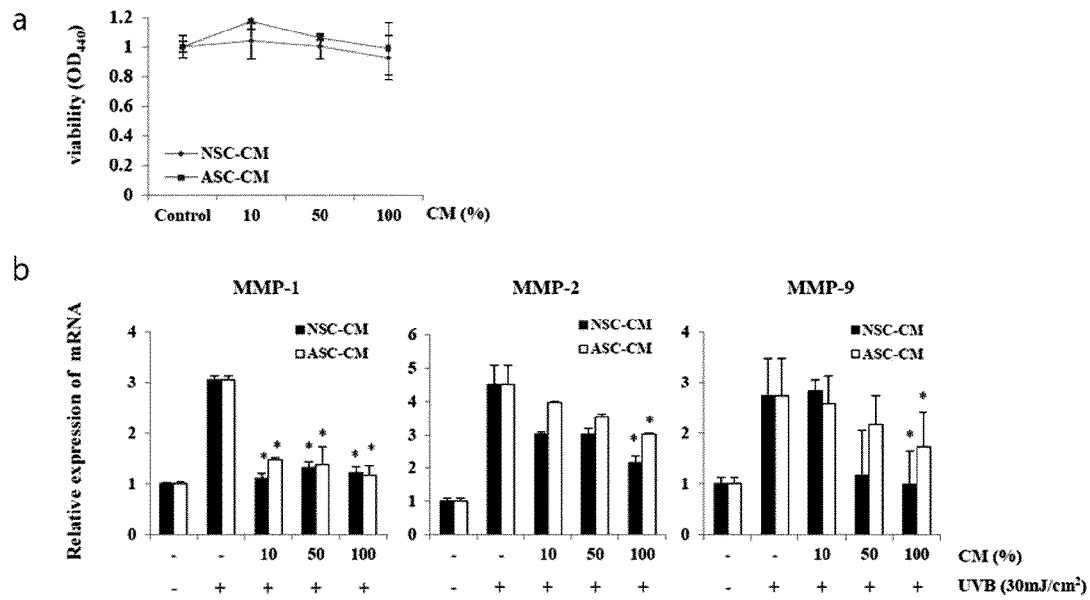
[도 19]



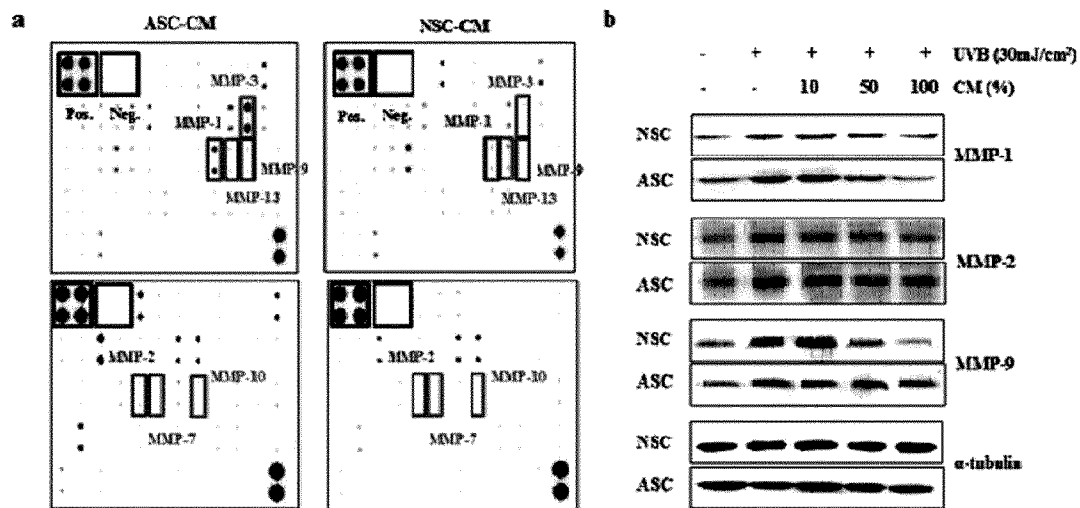
[도20]



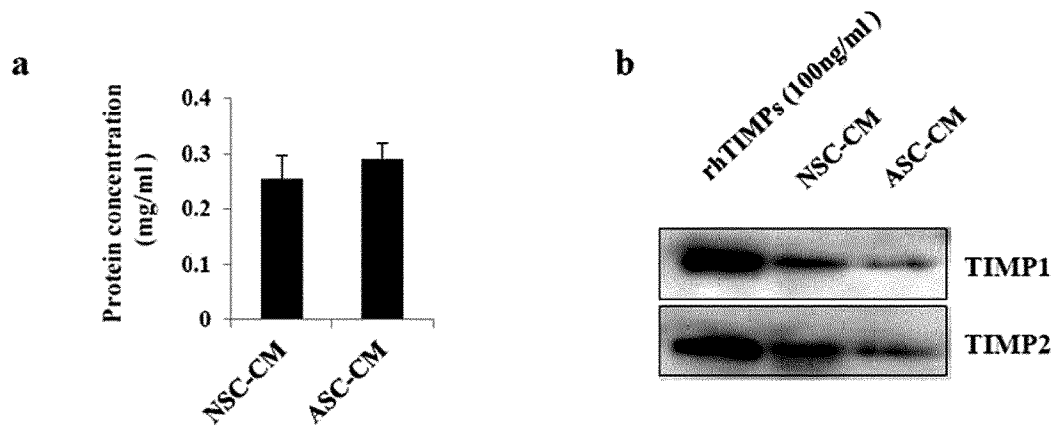
[도21]



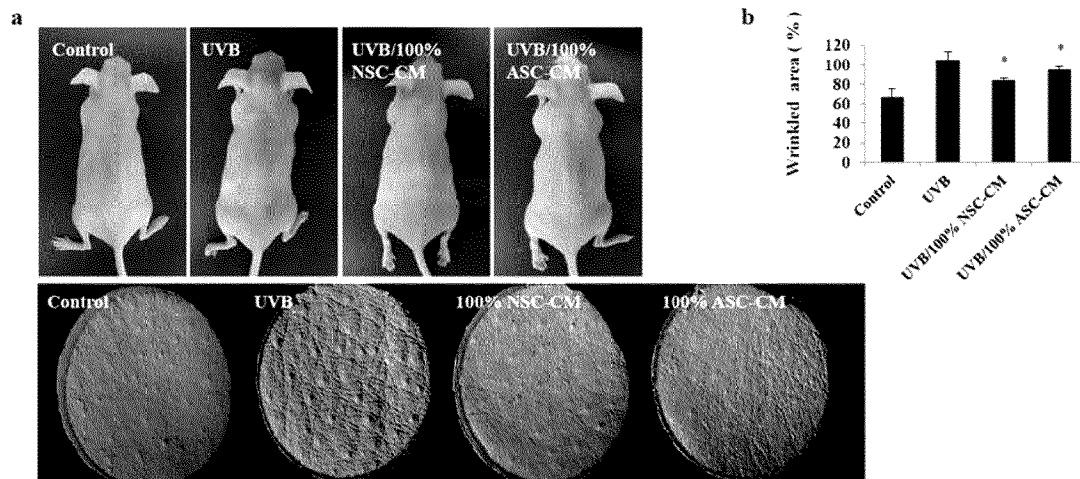
[도22]



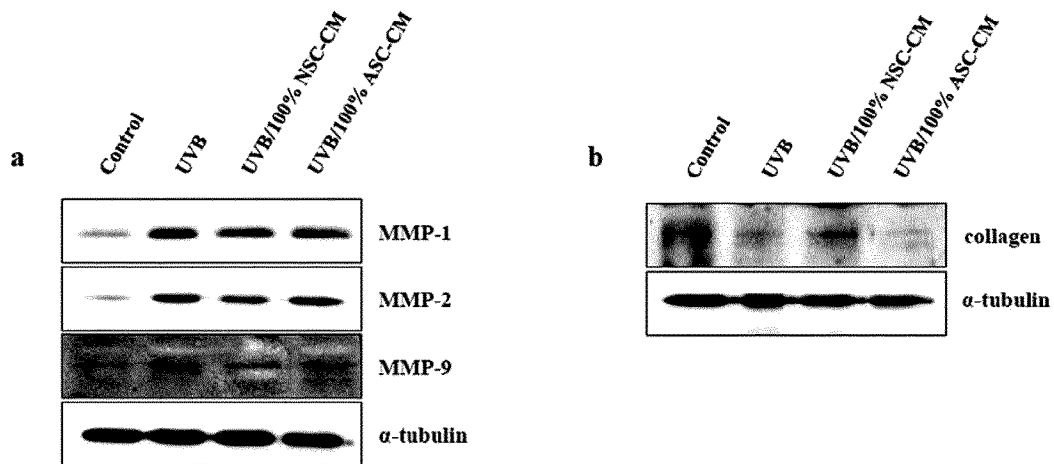
[도23]



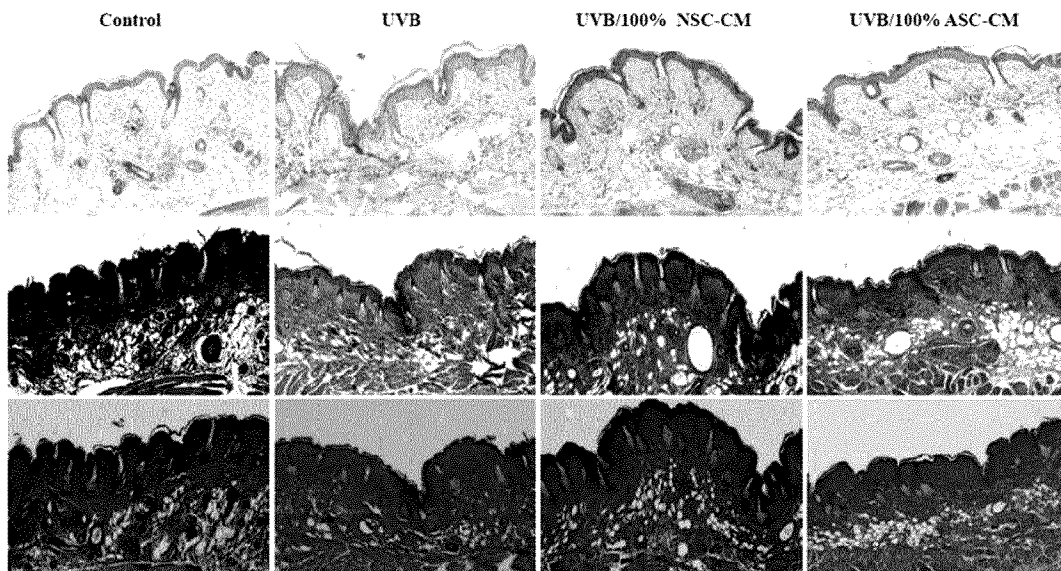
[도24]



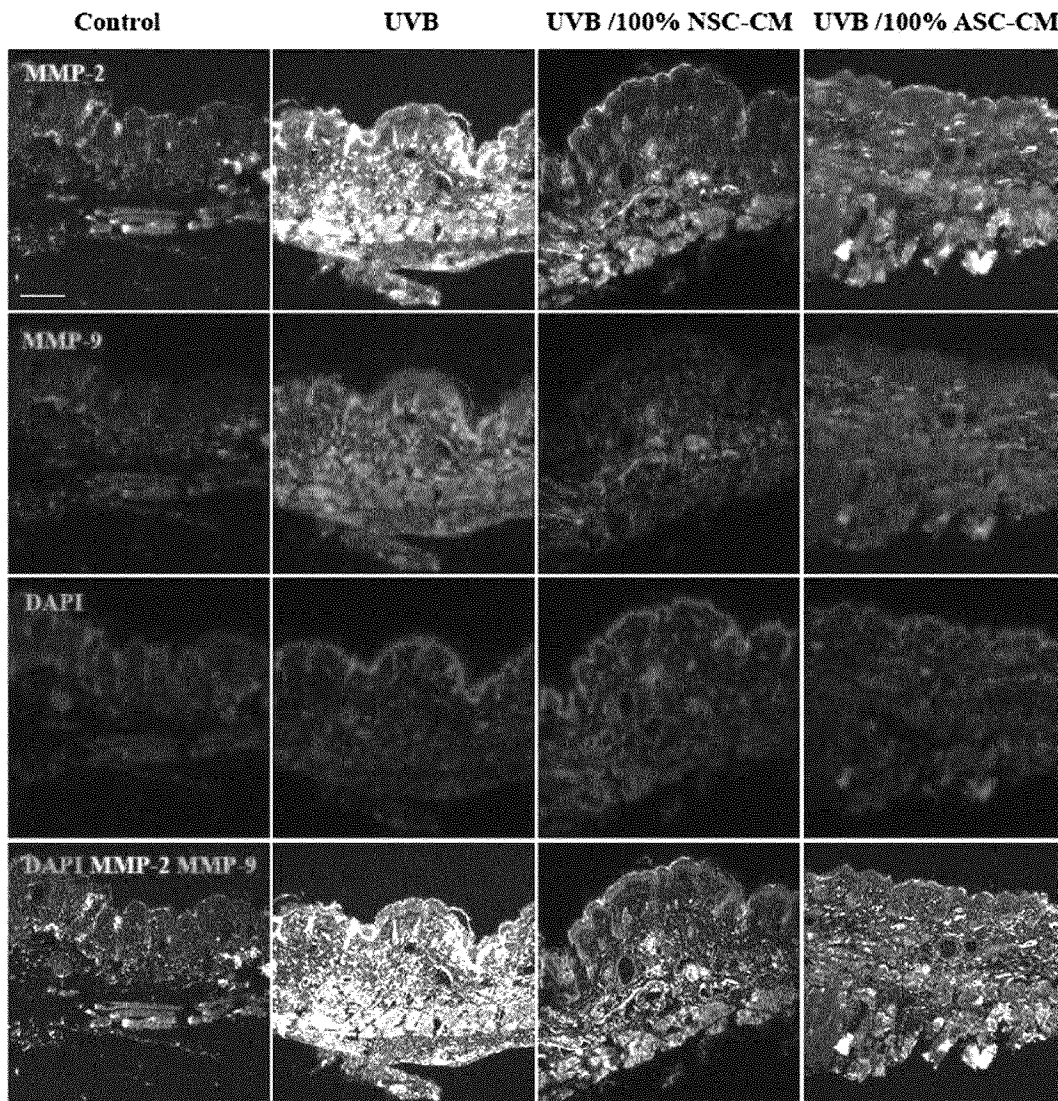
[도25]



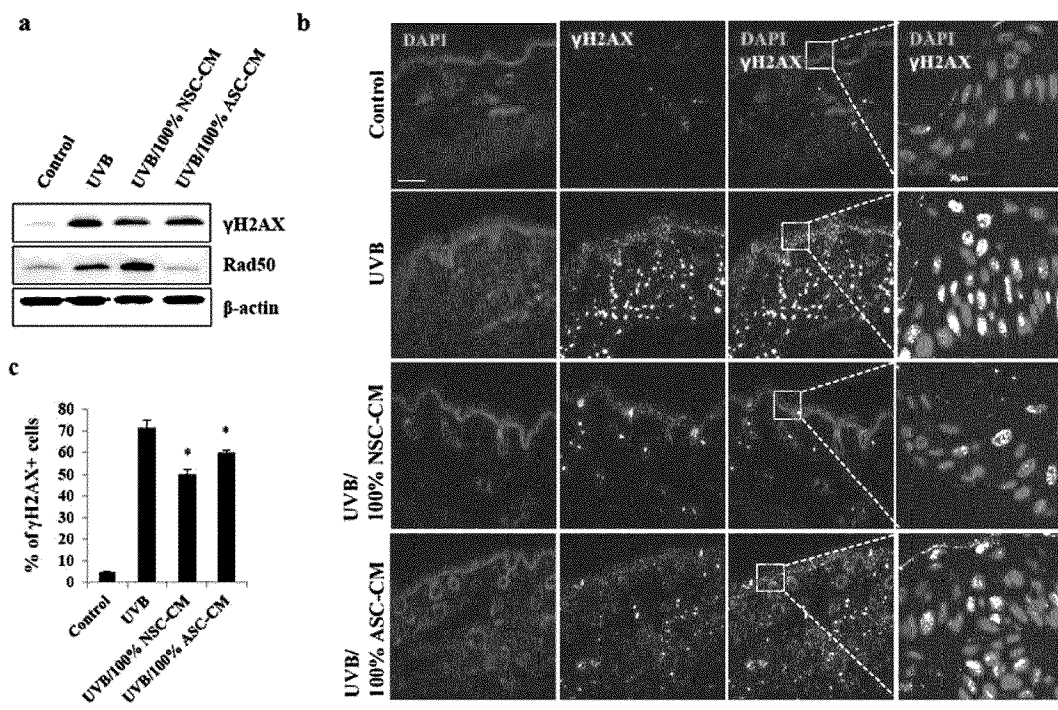
[도26]



[도27]



[도28]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/006578**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 5/0797(2010.01)i, A61K 8/98(2006.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/0797; A61K 35/12; A61K 35/30; A61K 8/97; A61K 8/98; A61Q 19/00; A61Q 19/08; C12N 5/079; G01N 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: TIMP-1, TIMP-2, wrinkles, elasticity, neural stem cells(NSCs), culture fluid, immortalization, cosmetics

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2016-0061945 A (ICELL BANK CO., LTD.) 01 June 2016 See abstract; claims 1-6; paragraphs [0007], [0048]; example 5; figure 8.	1-17
Y	US 2015-0079046 A1 (RENEURON LIMITED) 19 March 2015 See abstract; claims 1-5, 11-19; paragraphs [0110], [0111], [0116], [0140], [0259], [0344]; table 20.	1-17
Y	US 2012-0058140 A1 (CECCOLI, J. D. et al.) 08 March 2012 See abstract; claims 1-4; paragraphs [0004]-[0005], [0012], [0049]-[0050].	1-17
A	KR 10-2013-0109999 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 08 October 2013 See abstract; claims 1-10; paragraphs [0050], [0057].	1-17
A	KR 10-2014-0125735 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 29 October 2014 See the entire document.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 SEPTEMBER 2019 (10.09.2019)

Date of mailing of the international search report

10 SEPTEMBER 2019 (10.09.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/006578

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0061945 A	01/06/2016	KR 10-1719274 B1	24/05/2017
US 2015-0079046 A1	19/03/2015	AU 2013-245406 A1	02/10/2014
		AU 2013-245406 B2	20/07/2017
		AU 2013-291761 A1	26/02/2015
		AU 2013-291761 B2	15/03/2018
		AU 2014-217614 A1	20/08/2015
		AU 2014-217614 B2	09/08/2018
		AU 2014-217615 A1	20/08/2015
		AU 2014-217615 B2	15/11/2018
		BR 112014024541 A2	08/08/2017
		CA 2868506 A1	10/10/2013
		CA 2879322 A1	23/01/2014
		CA 2900895 A1	21/08/2014
		CA 2900897 A1	21/08/2014
		CN 104321062 A	28/01/2015
		CN 104321062 B	25/09/2018
		CN 104703609 A	10/06/2015
		CN 104703609 B	19/02/2019
		CN 105120879 A	02/12/2015
		CN 105142646 A	09/12/2015
		EP 2833893 A1	11/02/2015
		EP 2833893 B1	29/08/2018
		EP 2877187 A1	03/06/2015
		EP 2877187 B1	12/06/2019
		EP 2956146 A1	23/12/2015
		EP 2956146 B1	07/11/2018
		EP 2956147 A1	23/12/2015
		EP 3470073 A1	17/04/2019
		ES 2691296 T3	26/11/2018
		ES 2705052 T3	21/03/2019
		JP 2015-513906 A	18/05/2015
		JP 2015-529450 A	08/10/2015
		JP 2016-507550 A	10/03/2016
		JP 2016-513095 A	12/05/2016
		JP 2019-013234 A	31/01/2019
		JP 6450673 B2	09/01/2019
		KR 10-2015-0004822 A	13/01/2015
		KR 10-2015-0059168 A	29/05/2015
		SG 11201406336 A	27/11/2014
		SG 11201500329 A	27/02/2015
		SG 11201506284 A	29/09/2015
		US 2015-0164955 A1	18/06/2015
		US 2015-0366897 A1	24/12/2015
		US 2016-0002597 A1	07/01/2016
		WO 2013-150303 A1	10/10/2013
		WO 2014-013258 A1	23/01/2014
		WO 2014-125276 A1	21/08/2014
		WO 2014-125277 A1	21/08/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/006578

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2012-0058140 A1	08/03/2012	US 8435541 B2	07/05/2013
KR 10-2013-0109999 A	08/10/2013	KR 10-1548317 B1	02/09/2015
KR 10-2014-0125735 A	29/10/2014	CN 105246494 A	13/01/2016
		JP 2016-516811 A	09/06/2016
		JP 6002352 B2	05/10/2016
		KR 10-1597606 B1	26/02/2016
		US 2016-0081913 A1	24/03/2016
		US 9820933 B2	21/11/2017
		WO 2014-171746 A1	23/10/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/0797(2010.01)i, A61K 8/98(2006.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/0797; A61K 35/12; A61K 35/30; A61K 8/97; A61K 8/98; A61Q 19/00; A61Q 19/08; C12N 5/079; G01N 33/50

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TIMP-1, TIMP-2, 주름(winkles), 탄력(elasticity), 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs), 배양액(culture), 불멸화(immortalization), 화장품(cosmetics)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2016-0061945 A ((주)아이셀뱅크) 2016.06.01 요약; 청구항 1-6; 단락 [0007], [0048]; 실시예 5; 도면 8 참조.	1-17
Y	US 2015-0079046 A1 (RENEURON LIMITED) 2015.03.19 요약; 청구항 1-5, 11-19; 단락 [0110], [0111], [0116], [0140], [0259], [0344]; 표 20 참조.	1-17
Y	US 2012-0058140 A1 (CECCOLI, J. D. 등) 2012.03.08 요약; 청구항 1-4; 단락 [0004]-[0005], [0012], [0049]-[0050] 참조.	1-17
A	KR 10-2013-0109999 A (고려대학교 산학협력단) 2013.10.08 요약; 청구항 1-10; 단락 [0050], [0057] 참조.	1-17
A	KR 10-2014-0125735 A (고려대학교 산학협력단) 2014.10.29 전체 문헌 참조.	1-17

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 09월 10일 (10.09.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 09월 10일 (10.09.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



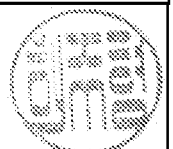
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0061945 A	2016/06/01	KR 10-1719274 B1	2017/05/24
US 2015-0079046 A1	2015/03/19	AU 2013-245406 A1	2014/10/02
		AU 2013-245406 B2	2017/07/20
		AU 2013-291761 A1	2015/02/26
		AU 2013-291761 B2	2018/03/15
		AU 2014-217614 A1	2015/08/20
		AU 2014-217614 B2	2018/08/09
		AU 2014-217615 A1	2015/08/20
		AU 2014-217615 B2	2018/11/15
		BR 112014024541 A2	2017/08/08
		CA 2868506 A1	2013/10/10
		CA 2879322 A1	2014/01/23
		CA 2900895 A1	2014/08/21
		CA 2900897 A1	2014/08/21
		CN 104321062 A	2015/01/28
		CN 104321062 B	2018/09/25
		CN 104703609 A	2015/06/10
		CN 104703609 B	2019/02/19
		CN 105120879 A	2015/12/02
		CN 105142646 A	2015/12/09
		EP 2833893 A1	2015/02/11
		EP 2833893 B1	2018/08/29
		EP 2877187 A1	2015/06/03
		EP 2877187 B1	2019/06/12
		EP 2956146 A1	2015/12/23
		EP 2956146 B1	2018/11/07
		EP 2956147 A1	2015/12/23
		EP 3470073 A1	2019/04/17
		ES 2691296 T3	2018/11/26
		ES 2705052 T3	2019/03/21
		JP 2015-513906 A	2015/05/18
		JP 2015-529450 A	2015/10/08
		JP 2016-507550 A	2016/03/10
		JP 2016-513095 A	2016/05/12
		JP 2019-013234 A	2019/01/31
		JP 6450673 B2	2019/01/09
		KR 10-2015-0004822 A	2015/01/13
		KR 10-2015-0059168 A	2015/05/29
		SG 11201406336 A	2014/11/27
		SG 11201500329 A	2015/02/27
		SG 11201506284 A	2015/09/29
		US 2015-0164955 A1	2015/06/18
		US 2015-0366897 A1	2015/12/24
		US 2016-0002597 A1	2016/01/07
		WO 2013-150303 A1	2013/10/10
		WO 2014-013258 A1	2014/01/23
		WO 2014-125276 A1	2014/08/21
		WO 2014-125277 A1	2014/08/21

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0058140 A1	2012/03/08	US 8435541 B2	2013/05/07
KR 10-2013-0109999 A	2013/10/08	KR 10-1548317 B1	2015/09/02
KR 10-2014-0125735 A	2014/10/29	CN 105246494 A	2016/01/13
		JP 2016-516811 A	2016/06/09
		JP 6002352 B2	2016/10/05
		KR 10-1597606 B1	2016/02/26
		US 2016-0081913 A1	2016/03/24
		US 9820933 B2	2017/11/21
		WO 2014-171746 A1	2014/10/23