



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월29일
(11) 등록번호 10-2105532
(24) 등록일자 2020년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) A61K 35/12 (2020.01)
C07C 62/32 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0123860
(22) 출원일자 2013년10월17일
심사청구일자 2018년09월12일
(65) 공개번호 10-2015-0044607
(43) 공개일자 2015년04월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120058829 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강대로 100(한강로2가)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
김아름
경기 용인시 기흥구 용구대로 1920, (보라동,
아모레퍼시픽기술연구원)
김수나
경기 용인시 기흥구 용구대로 1920, (보라동,
아모레퍼시픽기술연구원)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 유성전

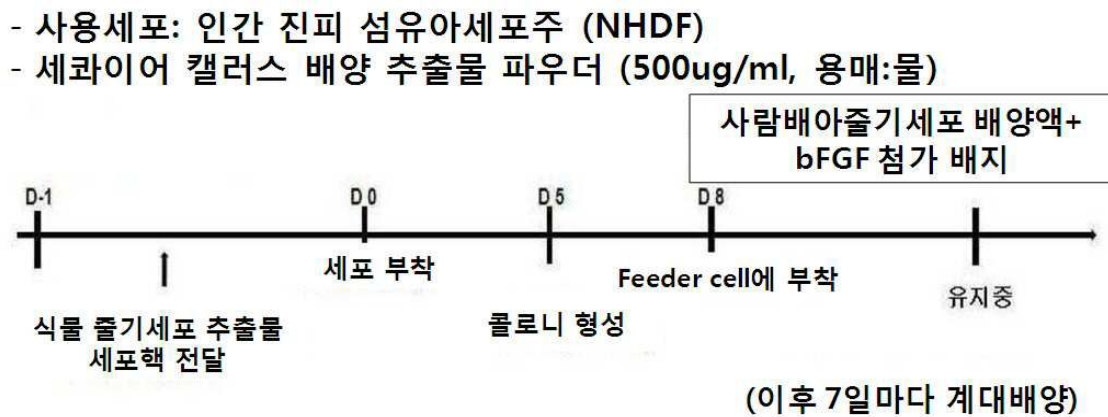
(54) 발명의 명칭 만능 줄기세포의 유도 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 만능줄기세포

(57) 요약

본 발명은 시킵산, 시킵산을 함유하는 식물추출물 또는 식물 줄기세포 및 식물 역분화 줄기세포 (callus)의 추출물을 사용하여 성체의 분화된 세포를 재프로그래밍 시킴으로써 맞춤형 만능줄기세포를 유도하는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 만능줄기세포 및 상기 만능줄기세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



본 발명에 따르면, 배아줄기세포와 같은 능력을 가진 만능줄기세포를 만드는데 난자를 사용하지 않기 때문에 윤리 문제를 해결할 수 있고, 무엇보다도 인체에 해가 없는 것이 검증된 식물 줄기세포 추출물을 사용하므로 안전성이 확보된 만능줄기세포를 제조할 수 있으며, 또한 각 개체에 맞추어진 면역적합성 세포 치료제를 개발하는데 이용될 수 있을 것이다. 이에 더하여, 질병을 가진 개체로부터 만능줄기세포를 유도함으로써 질환의 원인 규명 및 치료방법을 연구하는데 있어 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

또한 본 발명은 시킴산 또는 시킴산을 함유하는 식물추출물을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

(72) 발명자

박원석

경기 용인시 기흥구 용구대로 1920, (보라동, 아모레퍼시픽기술연구원)

권유욱

서울 강남구 선릉로130길 20, 106동 2001호 (삼성동, 래미안삼성2차아파트)

박영배

서울 강남구 압구정로42길 78, A동 701호 (신사동, 하이츠파크)

김효수

서울 용산구 독서당로 111, 105동 T-202호 (한남동, 한남더힐)

백재승

경기 안산시 단원구 초지2로 41, 1509동 402호 (초지동, 그린빌주공15단지아파트)

(56) 선행기술조사문헌

J Cell Biochem. 113(10): 3061-3068 (2012.10.)*

J Chem Biol 5:5-17 (2012.)

KR1020010042974 A

KR1020030051623 A

KR1020130034116 A

US06472169 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

시킵산; 시킵산을 포함하는 식물 추출물; 시킵산을 포함하는 식물의 다능성 세포 추출물; 또는 이들 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 인간의 성체 유래 섬유아세포에 처리하는 것을 포함하는 증가된 콜로니 생성능을 가지면서 증식력이 증가된 인간 세포의 제조 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 식물의 다능성 세포 추출물은 역분화된 만능 식물 줄기세포의 추출물인 것인 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 제조 방법은 시킵산, 추출물 또는 조성물을 인간의 성체 유래 섬유아세포에 주입하는 단계; 및 시킵산, 추출물 또는 조성물이 주입된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 시킵산을 포함하는 식물 추출물은 세콰이어(*Sequoiadendron giganteum*), 노란꽃창포 (*Iris pseudoacorus*), 뚝탄지(돼지감자)(*Helianthus tuberosus*), 은청가문비 (블루가문비)(*Picea pungens*), 글라우카가문비(화이트가문비)(*Picea glauca*), 유칼립투스 (*Eucalyptus sieberiana*), 유칼리나무(*Eucalyptus regnans*), 웨스턴 측백나무 (*Thuja plicata*), 대추야자 (Red Ceda, *Phoenix dactylifera*), 다알리아 바리아빌리스 (*Dahlia variabilis*), 야광나무 (*Malus baccata*), 서양배 (*Pyrus communis*), 밀 (*Triticum*), 소나무 (*Pinus densiflora*), 곰솔 (*Pinus thunbergii*), 붓순나무 (*Illicium anisatum*), 태산목 (*Magnolia grandiflora*), 약모밀(어성초) (*Houttuynia cordata*), 바위취(범의귀) (*Saxifraga stolonifera*), 말단 생식절 아르주나 (*Terminalia arjuna*), 유향수 (*Pistacia lentiscus*), 서양 까치밥나무 (*Ribes aureum*), 컴프리 (*Symphytum officinalis*), 악타이아 파키포다 (*Actaea pachypoda*), 박쥐나무 (*Alangium salvifolium*), 은행나무 (*Ginkgo biloba*), 푸른 여로 (*Veratrum viride*), 산토끼꽃류 (*Dipsacus laciniatus*), 아가스타체 (*Agastache urticifolia*), 목향 (*Inula helenium*), 서양물레나물(세인트존스워트) (*Hypericum spp*), 코멜리나 벵갈렌시스 (*Commelina bengalensis*), 김네마(당살초) (*Gymnema sylvestris*), 가자 (*Terminalia chebula*), 홍화 붓순나무 (*Illicium floridanum*), 붓순나무과 (*Illicium diffengri*), 홍회향 (*Illicium henryi*), 팔각회향 (*Illicium verum*), 붓순나무과 (*Illicium lanceolatum*), 붓순나무과 (*Illicium pachyphyllum*), 미국 붓순나무 (*Illicium anisatum*), 붓순나무 (*Illicium religiosum*), 헤미데스무스 인디커스 (*Hemidesmus indicus*, Sarvia), 시스터스 인카누스 (*Cistus incanus*), 사이다 악투아 (*Sida acuta*), 노박덩굴 (*Celastrus paniculata*), 글리코미스과 (*Glycosmis muricata*), 제충국 (*Tanacetum parthenium*, Pyrethrum), 밀 (*Triticum aestivum*), 하이페리쿰 (*Hypericum dolabriforme*), 산토끼꽃 (*Dipsacus pilosus*), 물고추나물 (*Triadenum walteri*), 하이페리쿰(세인트존스워트) (*Hypericum flondosum*), 및 터미날리아 팔리드 (*Terminalia pallid*)의 추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추출물을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 식물의 다능성 세포 추출물은 캘러스 추출물인 것인 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 식물의 다능성 세포는 세콰이어 다능성 세포를 이용하며, 자세하게는 세콰이어는 빅트리(*Sequoiadendron giganteum*)인 것인 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 조성물은 그 조성물의 총 부피를 기준으로 시킵산을 10uM 내지 30mM의 농도로 포함하거나, 또

는 추출물을 0.001ug/ml 내지 2mg/ml의 농도로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제 3항에 있어서,

시킵산, 추출물 또는 조성물 주입 전, 상기 인간의 성체 유래 섬유아세포에 세포막 투과촉진물질을 처리하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 세포막 투과촉진화합물은 스트렙토리신 0 또는 디기토닌인 것인 방법.

청구항 10

제 3항에 있어서,

시킵산, 추출물 또는 조성물이 주입된 인간의 성체 유래 섬유아세포를 지지세포층으로 옮겨서 추가로 배양하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 지지세포는 STO 세포인 것인 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서는 성체의 분화된 세포를 재프로그램화 및/또는 역분화를 일으킴으로써 만능줄기세포를 유도하는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 만능줄기세포 및 상기 만능줄기세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0002] 또한 본 명세서는 만능줄기세포를 포함하는 약학 조성물 또는 미용 조성물에 관한 것이다.

[0003] 또한 본 명세서는 줄기세포 활성화용, 피부세포 증식용, 피부재생용 또는 항노화용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 여러 가지 줄기세포분류 중 만능줄기세포(pluripotent stem cell)라 함은 생체를 구성하는 내배엽, 중배엽, 외배엽인 3가지 배엽(germ layer) 모두로 분화할 수 있는 다기능성을 지닌 줄기세포를 지칭한다.
- [0005] 줄기세포를 분류함에 있어, 해부학적인 존재부위에 따라, 세포의 기능에 따라, 세포표면에 표현된 항원의 종류에 따라, 전사인자에 따라, 세포가 생성 하는 단백질에 따라, 그리고 그 줄기세포가 만들어 낼 수 있는 특정 세포종류에 따라 분류할 수 있다.
- [0006] 이러한 여러 가지 분류 중 가장 흔히 이용되고 비교적 명확한 분류는 줄기세포가 분리된 개체에 따른 것이다. 배아(embryo)에서 분리된 경우 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)와 성체에서 분리된 경우 성체줄기세포(adult stem cell)로 나눌 수 있다.
- [0007] 또 다른 흔한 분류는 하나의 줄기세포로부터 몇 종류의 분화된 세포를 만들어 낼 수 있는가에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotent) 줄기세포로 나눌 수 있으며, 일반적으로 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)는 만능줄기세포로, 성체줄기세포(adult stem cell)는 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotent) 줄기세포로 구분할 수 있다.
- [0008] 수정 후 발생 초기인 배반포기(blastocyst)의 내부세포덩어리(세포내괴, inner cell mass)는 장차 태아를 형성할 부분으로서 이 내부세포덩어리로부터 형성된 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)는 한 개체를 구성하는 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 만능줄기세포(pluripotent stem cell)라 할 수 있다. 즉, 배아줄기세포는 무제한적으로 증식이 가능한 미분화 세포이고, 모든 세포로 분화할 수 있으며 성체줄기세포와 달리 배(germ) 세포도 만들수 있어 다음 세대로 유전될 수 있다.
- [0009] 이와 같은 만능줄기세포인 배아줄기세포는 세포 제조과정에서 배아의 파괴라는 심각한 종교적 그리고 윤리적 문제점이 존재하며, 제한된 배아로부터 유래하기에 각 개체간의 면역 적합성 부재로 인하여 세포 치료제로 개발 시 이식거부반응을 피할 수 없다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 성체에서 유래한 세포를 이용하여 맞춤형 배아줄기세포 또는 배아줄기세포와 같은 만능성을 가진 세포를 인위적으로 제조하기 위한 여러 가지 방법들이 시도되어 왔다.
- [0010] 대표적인 방법으로 체세포 핵치환법(somatic cell nuclear transfer, SCNT), 세포 융합법(fusion with ES cell), 특정인자주입법(reprogramming by defined factor)이 있다. 체세포 핵치환법은 그 효율이 매우 낮고, 윤리적 문제를 내포할 수 있는 난자가 대량으로 필요하다는 점에서 큰 제한점이 있다. 세포융합법은 유도된 세포는 2쌍의 유전자를 더 가지고 있어 세포의 안정성 측면에서 큰 문제점이 있다. 가장 최근에 발표된 기술인 특정인자주입법은 발암유전자를 포함하는 바이러스를 이용한 방법으로 암세포 형성이라는 심각한 문제점이 있다.
- [0011] 세포 치료제 개발을 위한 맞춤형 만능줄기세포를 확보하기 위하여 윤리적 문제가 없고 안정성, 안전성이 확보된 제조방법 개발이 요구되고 있다.
- [0012] 이러한 요구에 따라 체세포에 4가지 유전자를 도입시킴으로써 역분화를 통해 줄기세포인 맞춤형 만능줄기세포를 유도하는 방법이 연구되었다(Takahashi K, Yamanaka S(2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126: 663-676). 이는 성체세포를 이용하므로 윤리적으로 문제되지 않으며 자가 세포를 사용하므로 면역거부반응이 없어 종래의 문제점을 해결 하는 발판을 마련하였다.
- [0013] 본 발명자 등은 동물 유래의 유도만능줄기세포 (iPS, induced pluripotent stem cells) 추출물로 역분화 줄기세포를 획득한 바 있으나, 여기에는 몇 가지 제약이 있다.
- [0014] 첫째, 이 방법을 수행하기 위해서는 대량 (20mg 이상)의 iPSC 추출물이 필요하다. 따라서, 비용 및 노동력이 많이 요구되는 인간유래 역분화 줄기세포로부터 추출물을 분리하여 이를 이용한 역분화 유도는 아직 성공하지 못한 상태이다. 예를 들면, 20mg의 추출물을 얻기 위해 인간유래 역분화 줄기세포를 준비하려면 숙련된 기술자가 3개월 이상 이 일에 매진해야 하며, 그 비용은 상당하다.
- [0015] 둘째, 동물 줄기세포 또는 그에 상응하는 역분화 줄기세포의 경우 추출물을 분리하는 과정에서 완전히 파쇄 되

지 못하고 살아남아서 역분화를 유도할 체세포에 처리했을 때, 역분화가 유도된 세포와 추출물에 남아있는 역분화 줄기세포와의 구별이 용이하지 않아서 실험의 성공여부를 즉시 알 수 없고, 이들의 유전체(genomic) DNA를 분석해야 비로소 알 수 있다. 결국 시간과 비용이 많이 낭비될 소지가 있다.

- [0016] 셋째, 아직 단백질로 인간유래 역분화 줄기세포가 만들어진 사례가 극히 드물기 때문에 바이러스로 만들어진 인간유래 역분화 줄기세포의 추출물을 이용해야 한다. 이 때, 바이러스에 의해 유도된 암 유발 물질 등이 섞여 있을 수 있으므로 향후 임상적용에 걸림돌이 될 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0017] (비특허문헌 0001) Takahashi K, Yamanaka S(2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126: 663-676

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 본 발명의 일 측면은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 윤리적 문제가 없고 안정성, 안전성이 확보된 만능줄기세포의 제조방법을 제시하고자 한다. 또한 종래 기술로는 실현하기 힘들었던 인간유래 역분화 줄기세포를 유도하는 방법을 제시하고자 한다.
- [0019] 본 발명자들은 성체에서 유래한 세포를 이용하여, 세포를 분리한 성체와 동일한 유전적 배경을 가지는 만능줄기세포를 유도할 수 있는 방법을 개발하게 되었으며, 따라서 여러 다양한 유전적 배경을 가진 성체유래 세포로부터 동일한 결과를 도출함으로써 본 발명의 방법이 만능줄기세포를 만들어 낼 수 있는 적합한 발명임을 제시하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0020] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 일 측면은 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물 추출물, 식물 줄기세포 추출물 또는 이들을 포함하는 조성물을 성체유래세포에 처리하여 줄기세포를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0021] 구체적으로, 본 발명의 일 측면은 식물 줄기세포 또는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기세포에서 그 유효성분을 포함하는 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물을 성체유래 세포에 주입하는 단계; 및 상기 추출물이 주입된 세포를 배양 과정을 거쳐 배아줄기세포와 같은 만능성을 가진 세포를 제작하는 단계를 포함하는, 맞춤형 만능줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0022] 또한 본 발명의 일 측면은 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물 추출물, 식물 줄기세포 추출물 또는 이들을 포함하는 조성물을 성체 유래 세포에 주입하는 단계; 및 시킵산, 추출물 또는 조성물이 주입된 세포를 배양하는 단계를 더 포함하여 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 추출물은 캘러스 추출물 일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에서 상기 방법은 추출물 주입 전, 상기 성체세포에 대하여 세포막 투과 촉진 화합물을 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 세포막 투과 촉진 화합물은 스트렙토리신 O(streptolysin O) 및 디기토닌(digitonin)을 포함할 수 있으나 본 발명에 따른 시킵산 또는 추출물이 세포막 안으로 주입되는 것을 용이하게 하는 것이라면 이에 제한되지는 않는다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 방법은 상기 추출물이 주입된 성체 유래 세포를 지지세포층으로 옮겨서 추가로 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 지지세포는 STO 세포를 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다..
- [0026] 또한, 본 발명의 일 측면은 식물 줄기세포, 캘러스 또는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기세포에서 그 유효성분을 포함하는 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물을 성체유래 세포에 주입하는 단계; 상기 추출물이 주입된 세포를 일반세포 배양액으로 배양하고 지지세포(feeder cell) 층이 있는 배양 조건으로 옮겨 추가로 배아줄기세포 배양액으로 배양하는 단계를 포함하는, 맞춤형 만능 줄기세포 제조 방법을 제공한다.

- [0027] 또한, 본 발명의 일 측면은 상기 방법에 의해 제조된 줄기세포를 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명의 일 측면은 줄기세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 시킵산(Shikimic acid), 이를 함유하는 식물추출물 또는 식물 줄기세포 추출물을 사용하여 성체의 분화된 세포를 재프로그래밍화 및/또는 역분화를 일으킴으로써 맞춤형 만능줄기세포(inducible Pluripotent stem cell : iPSC)를 유도하는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 만능줄기세포 및 상기 만능줄기세포를 포함하는 세포치료제에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명에 사용되는 시킵산을 함유하는 식물추출물 또는 식물 줄기세포 추출물은 세콰이어(*Sequoiadendron giganteum*), 노란꽃창포(*Iris pseudoacorus*), 뽕단지(돼지감자)(*Helianthus tuberosus*), 은청가문비 (블루가문비)(*Picea pungens*), 글라우카가문비(화이트가문비)(*Picea glauca*), 유칼립투스(*Eucalyptus sieberiana*), 유칼리나무(*Eucalyptus regnans*), 웨스턴 측백나무(*Thuja plicata*), 대추야자(Red Ceda, *Phoenix dactylifera*), 다알리아 바리아빌리스(*Dahlia variabilis*), 야광나무(*Malus baccata*), 서양배(*Pyrus communis*), 밀(*Triticum*), 소나무(*Pinus densiflora*), 곰솔(*Pinus thunbergii*), 붓순나무(*Illicium anisatum*), 태산목(*Magnolia grandiflora*), 약모밀(어성초)(*Houttuynia cordata*), 바위취(범의귀)(*Saxifraga stolonifera*), 말단 생식절 아르주나(*Terminalia arjuna*), 유향수(*Pistacia lentiscus*), 서양 까치밥나무(*Ribes aureum*), 컴프리(*Symphytum officinalis*), 악타이아과키포다(*Actaea pachypoda*), 박취나무(*Alangium salvifolium*), 은행나무(*Ginkgo biloba*), 푸른 여로(*Veratrum viride*), 산토끼꽃류(*Dipsacus laciniatus*), 아가스타체(*Agastache urticifolia*), 목향(*Inula helenium*), 서양물레나물(세인트존스워드)(*Hypericum spp*), 코멜리나 벵갈렌시스(*Commelina bengalensis*), 김네마(당살초)(*Gymnema sylvestris*), 가자(*Terminalia chebula*), 홍화 붓순나무(*Illicium floridanum*), 붓순나무과(*Illicium diffengri*), 홍회향(*Illicium henryi*), 팔각회향(*Illicium verum*), 붓순나무과(*Illicium lancealatum*), 붓순나무과(*Illicium pachyphyllum*), 미국 붓순나무(*Illicium anisatum*), 붓순나무(*Illicium religiosum*), 헤미데스무스 인디커스(*Hemidesmus indicus*, Sarvia), 시스터스 인카누스(*Cistus incanus*), 사이다 악투아(*Sida acuta*), 노박덩굴(*Celastrus paniculata*), 글리코미스과(*Glycosmis muricata*), 제충국(*Tanacetum parthenium*, Pyrethrum), 밀(*Triticum aestivum*), 하이페리쿰(*Hypericum dolabriforme*), 산토끼꽃(*Dipsacus pilosus*), 물고추나물(*Triadenum walteri*), 하이페리쿰(세인트존스워드)(*Hypericum flondosum*), 및 터미날리아 팔리드(*Terminalia pallid*)의 추출물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추출물이 더 포함될 수 있다. (참고문헌 Denis V. Bochkov et.al., Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources, J chem. Biol. (2012) 5;5-17)
- [0030] 또한 상기 방법에 의해 제조된 줄기세포를 포함하는 줄기세포 활성화용, 피부재생용, 또는 항노화용 조성물 또는 이를 포함하는 약학 또는 미용 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명에 따르면, 줄기세포 제작의 가장 좋은 방법으로, 식물줄기세포 또는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기 세포(induced Pluripotent Plant Stem cells)의 추출물, 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물 추출물 또는 이들을 포함하는 조성물을 이용할 수 있으며, 또한 이 방법은 다양한 유전적 배경을 가진 인간을 포함하는 모든 종의 세포에 모두 적용될 수 있는 광범위한 제작방법이 될 것이다. 또한 본 발명의 방법은 식물유래 줄기세포 추출물을 사용함으로써, 윤리적 문제가 없고 안전성이 확보된 맞춤형 만능줄기세포의 제조를 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 방법에 따라 만능줄기세포를 유도하는 전체 실험 과정을 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 식물 줄기세포 추출물을 처리한 지 5일째 관찰된 유도 만능줄기세포를 나타내는 그림이다.
- 도 3은 식물 줄기세포 추출물을 처리한 지 8일째, 지지세포(feeder cell)로 옮긴지 2일째 관찰된 유도 만능줄기세포를 나타내는 그림이다.
- 도 4A는 식물 줄기세포 추출물을 처리한 지 32일째, 지지세포(feeder cell)로 옮겨서 4번의 계대배양 후 관찰된 유도 만능줄기세포를 나타내는 그림이다. 도4B는 전형적인 배아줄기세포를 나타내는 그림이다.
- 도 5는 식물 줄기세포 추출물을 처리한 지 32일째, 지지세포(feeder cell)로 옮겨서 4번의 계대배양 후 관찰된

유도 만능줄기세포의 알칼리성 인산가수분해효소(Alkaline phosphatase) 염색 결과를 나타내는 그림이다.

도 6A는 식물 줄기세포 추출물을 처리한 지 50일째, 지지세포(feeder cell)로 옮겨서 7번의 계대배양 후 관찰된 유도 만능줄기세포를 나타내는 그림과 그 세포의 알칼리성 인산가수분해효소(Alkaline phosphatase) 염색 결과를 나타내는 그림이다. 도 6B는 야마나카의 4 factor 바이러스를 이용하여 유도된 인간 만능줄기세포와 알칼리성 인산가수분해효소(Alkaline phosphatase) 염색결과를 나타내는 그림이다.

도 7은 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포의 유전자 발현을 보여주는 그림이다.

도 8은 본 발명에 따른 세콰이어 캘러스 추출물의 HPLC 결과를 나타낸 그래프이다. 여기서 Shikimic acid는 본 명세서 [화학식 1]의 구조를 갖는 시킵산을 나타낸다.

도 9는 본 발명의 방법에 따라 시킵산 또는 이를 포함하는 식물 줄기세포 추출물을 이용하여 만능줄기세포를 유도하는 전체 실험과정을 나타내는 모식도이다.

도 10은 시킵산 또는 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 뒤 HDF에서 Oct3/4 유전자의 발현을 보여주는 그림이다.

도 11은 시킵산을 농도별로 처리한 뒤 HDF에서 Oct3/4 유전자의 발현을 보여주는 그림이다.

도 12는 시킵산 또는 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 뒤 ALP의 발현 증가를 보여주는 그림이다.

도 13는 시킵산을 농도별로 처리한 뒤 ALP의 발현 증가를 보여주는 그림이다.

도 14은 시킵산 또는 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 뒤 진피세포의 콜로니 생성력을 나타낸 그림이다.

도 15는 시킵산 또는 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 뒤 진피세포의 콜로니 생성력을 나타낸 그래프이다.

도 16은 시킵산을 농도별로 처리한 뒤 진피세포의 콜로니 생성력을 나타낸 그림이다.

도 17는 시킵산을 농도별로 처리한 뒤 진피세포의 콜로니 생성력을 나타낸 그래프이다.

도 18는 시킵산 또는 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 뒤 진피세포의 증식력 증가를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은

[0034] a) 식물 줄기세포 또는 유도된 만능 식물 줄기세포에서 그 유효성분을 포함하는 추출물을 추출하는 단계;

[0035] b) 상기 추출물을 성체유래 세포에 주입하는 단계; 및

[0036] c) 상기 추출물이 주입된 세포를 배양 과정을 거쳐, 배아줄기세포와 같은 만능성을 가진 세포를 제작하는 단계를 포함하는 맞춤형 만능줄기세포를 유도하는 방법을 제공한다.

[0037] 또한 본 발명의 일 측면은 시킵산; 시킵산을 포함하는 식물 추출물; 시킵산을 포함하는 식물 줄기세포 추출물; 또는 이들을 포함하는 조성물을 성체유래세포에 처리하는 것을 포함하는 줄기세포 제조 방법을 제공한다.

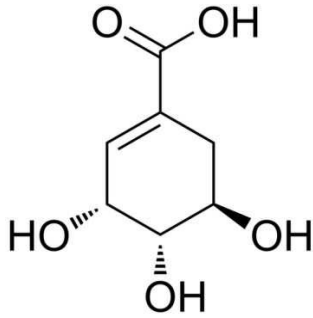
[0038] 또한 본 발명의 일 측면은 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물 추출물, 시킵산을 포함하는 식물 줄기세포 추출물 또는 이들을 포함하는 조성물을 성체 유래 세포에 주입하는 단계; 및 시킵산, 추출물 또는 조성물이 주입된 세포를 배양하는 단계를 더 포함하여 줄기세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0039] 본 명세서에서 추출물은 캘러스 추출물일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 측면에 있어서, 식물 추출물 또는 식물 줄기세포 추출물은 시킵산(shikimic acid), 카페산(caffeic acid) 또는 페룰산(ferulic acid)을 포함할 수 있다.

[0041] 본 명세서에서 "시킵산"은 하기 화학식 1을 가질 수 있으며, 이것의 전구체, 유도체 등을 포함하는 가장 광범위한 개념을 의미한다. 또한 시킵산의 분자량은 174.15g/몰 일 수 있다.

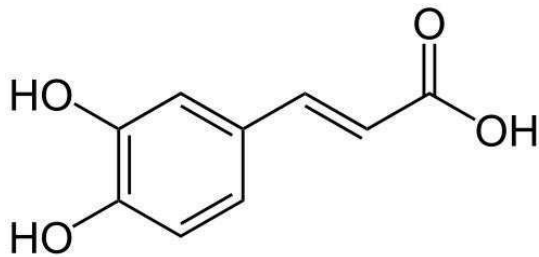
[0042] [화학식 1]



[0043]

[0044] 본 명세서에서 "카페인"은 하기 화학식 2를 가질 수 있으며, 이것의 전구체 유도체등을 포함하는 가장 광범위한 개념을 의미하고, 그 분자량은 180.16g/몰 일 수 있다. 또한 카페인을 커피콩을 포함한 배와 같은 과일과 바질, 타임, 바나나, 타라곤, 오레가노, 민들레등과 같은 약용식물에 포함되어 있는 페놀 화합물을 의미한다.

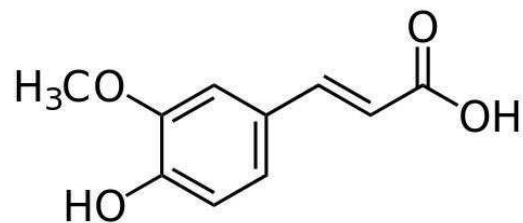
[0045] [화학식 2]



[0046]

[0047] 본 명세서에서 "페룰산"은 하기 화학식 3을 가질 수 있으며, 이것의 전구체 유도체등을 포함하는 가장 광범위한 개념을 의미하고, 그 분자량은 191.18g/몰 일 수 있다. 또한 페룰산은 식물의 세포벽을 형성하는 리그닌의 전구체에 해당하며 식물의 세포벽에 풍부하게 들어있는 성분으로 밀이나 귀리, 커피, 사과, 오렌지, 땅콩 등의 식물 씨앗에 들어있다.

[0048] [화학식 3]



[0049]

[0050] 본 발명에서 사용된 용어 '줄기세포'는 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 마스터 세포를 지칭한다. 줄기세포는 발달가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래('전이(transit)') 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다.

[0051] 본 발명에서 사용된 용어 '배아줄기세포'는 수정 후 발생 초기인 배반포기(blastocyst)의 내부세포덩어리(세포내괴, inner cell mass)에서 분리 후 배양한 세포로 만능성(pluripotency)을 지니는 세포를 지칭한다.

[0052] 본 발명에서 사용된 용어 '역분화 줄기 세포 또는 유도된 만능 줄기세포 (induced Pluripotent Stem cells, iPS) 추출물'은 시험관 내에서 여러 가지 방법으로 유도 및 배양한 역분화 줄기 세포 또는 유도된 만능 줄기세포 (induced Pluripotent Stem cells, iPS)를 물리-화학적 방법을 통하여 잘게 부순 후 원심분리 등의 방법으로 분리한 물질을 지칭한다.

[0053] 본 발명에서 사용된 용어 "식물 줄기세포"는 형성층 유래 식물줄기 세포이다. 특히, 식물의 물관과 체관의 경계선상에 끼인 형성층에서 물리적으로 전혀 손상받지 않은 상태의 순수 식물줄기세포 (CMC Cambial Meristematic Cell)를 포함한다. 또한 본 명세서에서 "식물 줄기세포"는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물

줄기세포를 포함하는 것으로서 가장 광범위한 개념이다.

- [0054] 본 발명에서 사용된 용어 "캘러스(Callus, 혹은 유합조직, 창상조직, 유상조직)는 분화되지 않은 부정형의 세포덩어리로 식물체에 상처가 났을 때 상처 주변에 생기는 분열조직이 형성한 종양조직이 대표적이다. 식물은 크게 세포분열을 하는 분열조직과 그렇지 않은 영구조직으로 구성되어 있는데 처음 분열조직의 세포를 영양 배지에 넣고 키우면 캘러스가 형성된다. 그 후 부정배가 형성되고 식물체로 분화된다. 이 캘러스는 흔히 "식물의 줄기세포"라고도 불린다. 본 발명에 사용되는 캘러스의 종류에는 제한이 없다.
- [0055] 본 발명에서 사용된 용어 '만능줄기세포'는 생체를 구성하는 3가지 배엽(germ layer), 즉 내배엽(endoderm), 중배엽(mesoderm), 외배엽(ectoderm) 모두로 분화할 수 있는 다기능성(만능성)을 지닌 줄기세포를 지칭한다. 전통적으로 배아줄기세포가 이 범주에 속하는 줄기세포라 할 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 사용된 용어 '맞춤형 만능줄기세포'는 만능줄기세포를 만들기 위해 사용한 공여세포와 유도된 만능줄기세포가 유전적으로 동일함을 지칭하며, 이는 맞춤형 만능줄기세포가 공여세포로부터 기원하여 유도된 세포임을 나타
- [0057] 낸다.
- [0058] 본 명세서에서 '맞춤형 만능줄기세포', '역분화 줄기세포', '유도(된) 만능 줄기세포'는 서로 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 사용된 용어 '성체유래 세포'는 배아세포와 반대되는 용어로, 태어나서 생존하는 성체로부터 유래한 세포를 지칭한다.
- [0060] 본 발명에서 사용된 용어 "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다. 예를 들면, 개체발생에서 처음에 동질적이었던 알 부분 사이에 머리나 몸통 등의 구별이 생기거나 세포에도 근세포라든가 신경세포 등의 구별이 생기는 것과 같이 처음에 거의 동질적이었던 어떤 생물계의 부분 사이에 질적인 차이가 생기는 것, 또는 그 결과로서 질적으로 구별할 수 있는 부역 또는 부분계로 나누어져 있는 상태를 분화라고 한다.
- [0061] 본 발명의 일 측면에 있어서, 식물은 세콰이어일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 일 측면에 있어서, 식물 줄기세포는 캘러스(callus)일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 일 측면에 있어서, 식물 줄기세포는 세콰이어 줄기세포일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일 측면에 있어서, 식물 줄기세포 추출물은 캘러스 추출물일 수 있다.
- [0065] 본 발명의 일 측면에 있어서, 추출물은 세콰이어 캘러스 추출물일 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 측면에 있어서, 세콰이어는 빅트리(*Sequoiadendron giganteum*) 일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 일 측면에 있어서, 추출물 또는 조성물은 시킵산을 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명이 일 측면에 있어서, 조성물은 그 조성물의 총 부피를 기준으로 시킵산을 10uM 내지 30 mM의 농도로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 일 측면에 있어서, 조성물은 그 조성물의 총 부피를 기준으로 시킵산, 식물 추출물 또는 식물 줄기세포 추출물을 10uM 이상, 20uM 이상, 30uM 이상, 50uM 이상, 100uM 이상, 1mM 이상, 5mM 이상, 10mM 이상, 20mM, 또는 30mM 이상 포함할 수 있으며, 1M이하 또는 100M이하로 포함할 수 있다. 조성물에 포함된 시킵산의 함량이 10uM 이하인 경우 본 발명에 따른 효과를 나타내기 힘들 수 있으며, 30mM 이상인 겨우 피부에 자극을 줄 수 있다. 바람직하게 시킵산은 조성물의 총 부피를 기준으로 0.1mM 이상, 0.5mM 이상, 0.6mM 이상, 0.7mM 이상, 0.8mM 이상 또는 0.9mM 이상의 농도로 포함될 수 있으며 또는 5mM 이하, 4mM 이하, 3mM 이하, 2mM 이하, 1.5mM 이하, 1.4mM 이하, 1.3mM 이하, 1.2mM 이하, 또는 1.1mM 이하의 농도로 포함될 수 있다. 더욱 바람직하게 시킵산은 조성물의 총 부피를 기준으로 0.8mM 내지 1.2mM의 농도로 포함될 수 있다. 가장 바람직하게 시킵산은 조성물의 총 부피를 기준으로 1mM의 농도로 포함될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 일 측면에 있어서, 식물 추출물 또는 식물 줄기세포 추출물은 그 추출물의 총 부피를 기준으로 시킵산을 0.0001%(w/v) 내지 45%(w/v)로 포함할 수 있다. 이와 같은 범위의 시킵산을 포함하는 경우 우수한 Oct3/4 유전자 발현 효과, ALP 발현 효과, 섬유아세포의 증식 촉진 효과를 가질 수 있다. 상기와 같은 관점에서, 본 명

세서에서 식물 추출물 또는 식물 줄기세포 추출물은 그 추출물의 총 부피를 기준으로 시킵산을, 0.001%(w/v) 이상, 0.01%(w/v) 이상, 0.1%(w/v) 이상, 1%(w/v) 이상, 5%(w/v) 이상, 10%(w/v) 이상, 15%(w/v) 이상, 20%(w/v) 이상, 25%(w/v) 이상, 또는 30%(w/v) 이상으로 포함할 수 있으며, 45%(w/v) 이하, 40%(w/v) 이하, 38%(w/v) 이하, 36%(w/v) 이하, 34%(w/v) 이하, 33%(w/v) 이하, 또는 32%(w/v) 이하로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 명세서에서 식물 추출물 또는 식물 줄기세포 추출물은 그 추출물의 총 부피를 기준으로 시킵산을, 32%(w/v) 내지 34%(w/v)로 포함할 수 있고, 더욱 바람직하게는 32.75%(w/v)로 포함할 수 있다.

- [0070] 본 발명의 일 측면에 있어서, 조성물은 그 조성물의 총 부피를 기준으로 식물 추출물 또는 식물 줄기세포 추출물을 상기 시킵산 및 추출물들의 농도를 고려하여 추출물들에 포함된 시킵산의 농도가 상기에 기재한 조성물의 총 부피를 기준으로 포함된 시킵산의 농도가 되도록 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물의 총 부피를 기준으로 조성물에 포함된 식물 추출물 또는 식물 줄기세포 추출물은 0.001ug/ml 이상, 0.01ug/ml 이상, 0.1ug/ml 이상, 1ug/ml 이상, 10ug/ml 이상, 50ug/ml 이상, 100ug/ml 이상, 0.3mg/ml 이상, 0.4mg/ml 이상, 0.5mg/ml 이상, 0.6mg/ml 이상, 0.7mg/ml 이상, 1mg/ml 이상, 1.5mg/ml 이상, 2mg/ml 이상, 5mg/ml 이상, 10mg/ml 이상, 20mg/ml 이상, 또는 50mg/ml 이상일 수 있으며 1g/ml 이하, 또는 10g/ml 이하 일 수 있다.
- [0071] 본 명세서에서 식물 추출물 또는 식물 줄기세포 추출물에 포함된 시킵산의 측정은 Waters 1525 μ Binary HPLC Pump를 이용하여 Gemini 5u C18 110 A(5 μ m, 4.6 X 250nm, Phenomenex 사)컬럼 으로서 250 * 4.60 mm, 5 마이크로미터의 규격을 갖는 것이며, 이동상의 용매 A를 물(0.1% TFA함유)로 하고 용매 B를 아세트나이트릴(0.1% TFA함유)로 하여 측정한 것일 수 있다.
- [0072] 본 명세서에서 "세콰이어"는 레드우드(*Sequoia sempervirens*), 빅트리(*Sequoiadendron giganteum*) 또는 메타세콰이어(*Metasequoia glyptostroboides*)를 포함하는 것이다.
- [0073] 레드우드(*Sequoia sempervirens*)는 소나무목 측백나무과의 나무로서 미국삼나무라고도 하며, 미국 캘리포니아의 북서해안과 오리건의 남서부와 뉴질랜드 등지에서만 자란다. 수령은 2500~3000년 정도이며 최대 높이가 112m나 되는 세계에서 가장 큰 나무이다. 지름 2.5~4.5 m, 높이 50~100m이고 수피는 두께가 20~30 cm에 달한다. 잎은 주목과 비슷하고 길이 1~3cm로서 끝이 뾰족하며 주맥이 뚜렷하다. 잎 표면은 짙은 녹색이고 뒷면은 흰빛이 돈다.
- [0074] 빅트리(*Sequoiadendron giganteum*)는 세콰이아텐드론속의 유일한 종이며, 미국 캘리포니아의 시에라네바다산맥의 서쪽 해발고도 1500~2500m에서 자라는데, 지름 3.5~6m, 높이 60~90m에 달하고 뿌리 근처의 지름은 10m 내외이다. 잎은 삼나무와 비슷하고 길이 1cm 정도로서 나선 모양으로 배열하지만 성숙한 가지에 달린 잎은 비늘같이 생긴다.
- [0075] 메타세콰이어(*Metasequoia glyptostroboides*)는 측백나무과의 나무로 메타세콰이어속 중 유일하게 생존하고 있는 종이다. 원산지에서는 수고 35m까지 자라고 수피는 회색빛을 띤 갈색이고 세로로 벗겨진다. 가지는 옆으로 퍼지고 잎은 두 줄로 마주나며 길이 10~23mm, 너비 1.5~2mm의 선모양이다. 끝이 뾰족하고 갈색, 붉은색의 단풍이 든다. 꽃은 2~3월에 암수한그루로 피고 수꽃은 총상화서로 잎겨드랑이 가지 끝에 달려 밑으로 늘어지며 20개의 수술이 있다. 암꽃은 가지 끝에 달리며 3월에 개화한다. 열매는 구과이고 길이 18~25mm의 둥근모양이고 갈색으로 익으며 벌어져 날개가 달린 타원모양의 종자가 나온다. 낙엽침엽교목으로 원산지는 중국 쓰촨 성, 후베이 성 이고 한국, 중국 등에 분포하며 주로 공원수로 식재된다.
- [0076] 캘러스(Callus, 혹은 유합조직, 창상조직, 유상조직)는 분화되지 않은 부정형의 세포덩어리로, 식물체에 상처가 났을 때 상처 주변에 생기는 분열조직이 형성한 종양조직이 대표적이다. 식물은 크게 세포분열을 하는 분열조직과 그렇지 않은 영구 조직으로 구성되어 있는데, 처음 분열조직의 세포를 영양 배지에 넣고 키우면 캘러스가 형성된다. 그 후 부정배가 형성되고 식물체로 분화된다. 캘러스는 흔히 '식물의 줄기세포'라고도 불린다.
- [0077] 본 명세서에서 "추출물"은 추출 방법, 추출 용매, 추출된 성분 또는 추출물의 형태를 불문하고, 천연물의 성분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질을 모두 포함하는 것이며 또한 천연물의 성분을 뽑아내어 얻어진 물질을 추출 후 다른 방법으로 가공 또는 처리하여 얻어질 수 있는 물질을 모두 포함하는 광범위한 개념이다.
- [0078] 본 명세서에서 사용되는 세콰이어는 추출물의 형태로 포함되거나, 생약 자체의 분쇄물, 또는 생약의 건조 분쇄물로서 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 아울러 본 명세서에서 사용되는 세콰이어는 그 입수 방법에 제한이 없으며, 재배하여 사용하거나 시판되는 것을 구입하여 사용할 수도 있으며, 세콰이어의 지상부 및 지하부를 포함하는 그 전부를 의미할 수 있다. 지상부의 경우 세콰이어의 열매, 잎 및 줄기 등을 포함할 수 있으며 지하부의 경우 뿌리 등을 포함할 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.

- [0079] 본 명세서에서 "식물 추출물"은 추출 방법, 추출 용매, 추출된 성분 또는 추출물의 형태를 불문하고, 세콰이어와 같은 식물의 성분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질을 모두 포함하는 것이며 그 성분을 뽑아내는 과정에서 열, 산(acid), 염기(base), 효소 등으로 처리하는 공정을 포함하는 추출 방법을 통해 얻어진 물질을 포함하며 또한 세콰이어와 같은 식물의 성분을 뽑아내어 얻어진 물질을 추출 후 다른 방법으로 가공 또는 처리하여 얻어질 수 있는 물질을 모두 포함하는 광범위한 개념이다.
- [0080] 본 명세서에서 "식물 줄기세포 추출물"은 추출 방법, 추출 용매, 추출된 성분 또는 추출물의 형태를 불문하고, 세콰이어 등 식물의 줄기세포를 배양한 뒤 그 유효성분을 뽑아냄으로써 얻어지는 물질을 모두 포함하는 것이며 그 성분을 뽑아내는 과정에서 열, 산(acid), 염기(base), 효소 등으로 처리하는 공정을 포함하는 추출 방법을 통해 얻어진 물질을 포함하며 또한 세콰이어와 같은 식물의 줄기세포의 유효성분을 뽑아내어 얻어진 물질을 추출 후 다른 방법으로 가공 또는 처리하여 얻어질 수 있는 물질을 모두 포함하는 광범위한 개념이다.
- [0081] 본 발명의 방법은 식물 줄기세포 또는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기세포를 배양하고 이로부터 추출물을 제조하는 단계를 포함하는데, 이는 당업계에 공지된 일반적인 방법에 따라 수행할 수 있다. 예를 들면, 식물 줄기세포 또는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기세포를 배양하고 이를 단백질 분해 효소로 처리한 후 부유액을 수확하거나 식물 줄기세포를 65℃에서 2 시간동안 반응시켜 필터링함으로써, 각각의 세포로부터 유래하는 단백질 또는 시킵산을 추출할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 캘러스 파우더를 사용할 수 있다.
- [0082] 본 명세서에서 세콰이어 캘러스 추출물은 i) 세콰이어로부터 캘러스(callus)를 유도하는 단계; ii)캘러스를 고체배양(solid cell culture)하여 줄기세포주(stem cell line)를 확립하는 단계; iii)세포주를 현탁배양(suspension cell culture)을 통해 유효 성분을 대량으로 생산하는 단계; 및 생산된 유효성분을 추출하는 단계를 통하여 얻을 수 있다.
- [0083] 본 명세서에서 세콰이어 캘러스로부터 유효성분을 추출하는 방법은 한국공개특허 제 2007-0113193호에 공지된 추출방법과 같이 상기 식물의 조직 외식체(tissue explant)로부터 유래되는 세포주의 식물성 배양 방법으로 추출할 수 있으며, 세콰이어 유래의 안정한 식물세포주에 5-탄소원자 이하의 알코올의 혼합물을 가하여 용출시켜 추출할 수 있으나, 상기의 추출 방법에 한정되지는 않는다.
- [0084] 또한 본 명세서에서 세콰이어 캘러스 추출물 또는 세콰이어 캘러스 파우더는 상업적으로 구입하여 사용될 수도 있다.
- [0085] 본 명세서에서 세콰이어 캘러스 추출물은 세콰이어 캘러스 파우더를 용매에 용해시켜 제조되는 것일 수 있으며, 이때 용매는 물, 유기용매 및 물과 유기용매의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함한다. 상기 물은 증류수 또는 정제수를 포함할 수 있고, 유기 용매는 C₁~C₅의 저급 알코올을 예로 들 수 있는 알코올, 아세톤, 에테르, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, 에틸메틸케톤 및 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 및 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸 아세테이트, n-부탄올, BG(부틸렌글리콜)와 EtOH(에탄올)의 혼합 용매 또는 DMSO(dimethyl sulfoxide)용매 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0086] 상기 추출물 제조와 관련하여, 기존의 단백질 추출 방법을 응용하여 고농도의 단백질 추출물을 제조할 수 있다는 것은 당업자가 용이하게 인식할 수 있다. 상기 식물로부터 유래한 시킵산 또는 단백질 추출물의 농도는 추출물을 포함하는 조성물의 전체 부피를 기준으로 10ug/ml 내지 1mg/ml 가 바람직하며, 더욱 바람직하게는 500 ug/ml 내외이다. 단백질 추출물의 농도가 상기 범위를 벗어나면 맞춤형 만능줄기세포의 유도 효율이 저하되거나 추출물이 처리된 세포가 사멸할 우려가 있기 때문이다.
- [0087] 본 발명의 방법은 식물 줄기세포 또는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기세포에서 분리한 단백질 추출물을 성체유래 세포에 주입하는 단계를 포함한다.
- [0088] 상기 성체유래세포는 인간유래 피부 섬유아세포 (human dermal fibroblast) 또는 인간 진피 섬유아세포 (Neonatal human dermal fibroblasts) 를 포함할 수 있다.
- [0089] 주입을 위하여 세포막 투과 촉진 화합물(예를 들면, 스트렙토리신 0 또는 디기토닌)을 세포에 처리하여 가역적인 조그만한 구멍을 뚫어(투과화, permeabilization) 추출물이 세포내로 유입될 수 있도록 처리한다. 투과화 과정을 거친 후 추출물과 함께 배양(incubation)하는 과정을 통하여, 성체유래 세포 내로 시킵산, 식물 추출물, 식물 줄기세포 추출물, 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기세포 추출물 또는 이들을 포함하는 조성물을 주입한다.

- [0090] 본 발명의 일 측면에 있어서, 만능줄기세포 제조방법은,
- [0091] 1. 본 명세서에 따른 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물추출물, 식물 줄기세포 추출물 또는 이들을 포함하는 조성물을 제조하는 단계;
- [0092] 2. 시킵산, 추출물 또는 조성물을 성체유래세포에 주입하는 단계;
- [0093] 3. 상기 성체유래세포를 일반세포배양액을 사용하여 배양하는 단계;
- [0094] 4. 상기 배양된 세포를 지지세포층이 있는 배양조건으로 옮겨 추가로 배양하는 단계;
- [0095] 5. 배양된 만능줄기세포를 회수하는 단계;
- [0096] 를 포함하는 것일 수 있다.
- [0097] 구체적으로, 시킵산, 추출물 또는 조성물을 성체유래세포에 주입하는 단계는,
- [0098] 1. 성체유래세포를 낱개의 세포로 한 후 재현탁하여 튜브로 옮기는 단계;
- [0099] 2. 원심분리 후 세포 펠렛을 재현탁하여 수조에서 반응시키는 단계;
- [0100] 3. 세포막 투과 촉진 화합물을 첨가하는 단계;
- [0101] 4. 샘플을 수조에서 위아래로 섞어주면서 반응시키는 단계;
- [0102] 5. 반응이 끝난 샘플을 원심분리하는 단계;
- [0103] 6. 세포 펠렛을 시킵산, 추출물 또는 조성물로 재현탁하는 단계;
- [0104] 7. ATP-재생시스템을 통하여 수조에서 위아래로 섞어주며 반응시키는 단계;
- [0105] 8. 반응 후 ES세포배지를 첨가하여 배양기에서 반응시키는 단계;
- [0106] 9. 세정 후, 세포 펠렛을 배아줄기세포 배양 배지로 재현탁 시킨 후 디쉬에 시딩(seeding)하는 단계;
- [0107] 를 포함하는 것일 수 있다.
- [0108] 본 발명은 시킵산, 추출물 또는 조성물이 주입된 세포를 배양과정을 거쳐, 배아줄기세포와 같은 만능성을 가진 세포를 제작하는 단계를 포함한다.
- [0109] 상기의 시킵산, 추출물 또는 조성물의 주입 과정 후 일반 세포 배양액을 사용하여 이들이 주입된 성체유래 세포를 배양한 후, 지지세포(feeder cell) 층이 있는 배양 조건으로 옮겨 추가로 배양하는 과정을 수행할 수 있다.
- [0110] 더욱 구체적으로는 상기의 시킵산, 추출물 또는 조성물 주입 과정 후 콜로니가 형성될 때 까지 일반 세포 배양액(DMEM, 5-15% FBS, 10-100U/ml 페니실린, 20-80mg/ml 스트렙토마이신)을 사용하여 추출물이 주입된 성체유래 세포를 배양한 후, 콜로니가 생긴 이후에는 지지세포(feeder cell) 층이 있는 배양 조건으로 옮겨 배아줄기세포 배양액에서 5-8일마다 계대배양하며 배지는 매일 교환하며 배양하는 과정을 수행할 수 있다. 본 발명의 지지 세포는 STO 세포를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0111] 상기 추출물에 의해 유도된 만능줄기 세포는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/F12에 15-25% KSR (Knockout serum replacement), 1-4 mM L-글루타민, 0.05-0.2mM 비필수 아미노산, 0.05-0.2mM β -머캅토에탄올, 30-70U/ml 페니실린, 30-70mg/ml 스트렙토마이신, 및 1-30 ug/ml bFGF가 첨가된 배양액에서 배양할 수 있다. 상기 DMEM에 첨가되는 화합물의 농도는 본 발명의 효과를 달성할 수 있는 범위 내에서 변할 수 있다는 것은 당업자가 용이하게 인식할 수 있다.
- [0112] 또한, 본 발명은 a) 식물 줄기세포 또는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기세포에서 단백질을 분리하는 추출물 제조 단계;
- [0113] b) 세포막 투과 촉진 화합물을 성체 유래 세포에 처리하고 상기 추출물을 성체유래 세포에 주입하는 단계; 및

- [0114] c) 상기 추출물이 주입된 세포를 일반세포 배양액으로 배양한 후 지지세포(feeder cell) 층이 있는 배양 조건으로 옮긴 다음, 배아줄기세포 배양액으로 배양하는 단계를 포함하는, 맞춤형 만능줄기세포를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0115] 본 발명의 방법은 시킵산, 식물추출물, 식물줄기세포 또는 다양한 방법으로 유도된 모든 종류의 유도 만능 식물 줄기세포 추출물 또는 이들을 포함하는 조성물을 이용하여 성체유래 세포로부터 배아줄기세포와 구분이 안될 정도이고 그와 같은 만능성을 가진 세포를 만들 수 있다는 것에 그 특징이 있다.
- [0116] 본 발명자들은 상기 본 발명의 방법을 통해 만능줄기세포가 유도됨을 확인하였다.
- [0117] 구체적으로, 세포의 모양에 있어서 본 발명에 의해 유도된 만능줄기 세포는 그 모양이 배아줄기세포와 거의 동일함을 알 수 있다 (도 4 참조). 또한 배아줄기세포의 특징적인 유전자 (Nanog, Oct4)의 발현여부를 조사한 결과 본 발명에 의해 유도된 만능줄기세포에서 배아줄기세포와 동일하게 상기 유전자가 발현됨을 확인하였다(도 7 및 도 10 참조).
- [0118] 또한, 본 발명의 일 측면은 본 발명의 일 측면인 방법에 의해 유도된 만능줄기세포를 제공한다.
- [0119] 본 발명자들은 상기 방법을 통해 8-12번의 계대배양을 성공하여 줄기세포의 특징인 자가 재생(self-renewal)이 되는 것을 확인하였다 (도 6 참조).
- [0120] 또한 본 발명의 일 측면은 본 발명의 일 측면인 방법에 따라 제조된 만능줄기세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0121] 본 발명의 일 측면은 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물추출물 또는 시킵산을 포함하는 식물 줄기세포 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0122] 본 발명의 일 측면에 있어서, 조성물은 약학 조성물, 식품조성물 또는 미용 조성물 일 수 있다.
- [0123] 본 발명의 일 측면에 있어서, 조성물은 줄기세포 활성화용, 피부재생용 또는 항노화용 조성물인 것일 수 있다.
- [0124] 본 발명의 일 측면에 있어서, 약학 조성물은 세포 치료제인 것일 수 있다.
- [0125] 구체적으로, 상기 세포 치료제는 간세포, 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포, 혈관내피세포 등의 형성에 이용될 수 있다.
- [0126] 본 발명에서 사용된 용어 '세포 치료제'는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식, 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 지칭한다. 세포 치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포 치료제, 줄기세포 치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포 치료제에 관한 것이다.
- [0127] 본 발명의 일측면은 본 명세서에 따른 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물추출물, 식물 줄기세포 추출물 또는 만능 줄기세포를 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 일측면에서 상기 조성물은, 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 함유할 수 있다. 예를 들어, 물성 개선을 위하여 향료, 색소, 살균제, 산화 방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기 염류, 유화제 및 합성 고분자 물질 등의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 그 외에도, 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 해초 엑기스 등의 보조 성분을 더 포함할 수도 있다. 상기 성분들은 제형 또는 사용 목적에 따라서 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 그 첨가량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 성분들의 첨가량은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.01~5 중량%, 보다 구체적으로는 0.01~3 중량% 범위일 수 있다. 본 발명의 일측면에서, 상기 식품 조성물은 건강 식품 조성물, 기능성 식품 조성물, 보조 영양제, 가공 식품 조성물, 식품 첨가물 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0128] 본 발명의 일측면은 본 명세서에 따른 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물추출물, 식물 줄기세포 추출물 또는 만능 줄기세포를 포함하는 미용 조성물을 제공한다. 상기 미용 조성물은 화장품학 또는 피부 과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소 적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽 무수

생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 멀티 에멀전, 현탁액, 마이크로 에멀전, 마이크로 캡슐, 미세 과립구, 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제, 포말(foam), 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 또는 패치 형태로 사용될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0129] 상기 화장품 조성물은 상기한 물질 이외에 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 함유하는 것도 무방하며, 본 발명의 유효 성분 이외에 다른 성분을 기타 화장품 조성물의 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 화장품 조성물은 상기 유효 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장품 조성물에 배합되는 다른 성분을 포함할 수 있고, 이의 예로서 유지 성분, 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 안정화제, 증점제, 글리세린, pH 조절제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다. 상기 화장품 조성물에 포함될 수 있는 기타 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니고, 또한 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 가능하다.

[0130] 상기 화장품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, 유연 화장수, 영양 화장수, 에센스, 영양 크림, 마사지 크림, 팩, 젤, 메이크업 베이스, 파운데이션, 파우더, 립스틱, 패치, 분무제, 아이 크림, 아이 에센스, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌저, 모발 샴푸, 모발 컨디셔닝, 모발 트리트먼트, 모발 에센스, 모발 로션, 두피 헤어토닉, 두피 에센스, 헤어젤, 헤어 스프레이, 헤어팩, 바디 로션, 바디 크림, 바디 오일 및 바디 에센스로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0131] 본 발명의 일측면은 본 명세서에 따른 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물추출물, 식물 줄기세포 추출물 또는 만능 줄기세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 이러한 약학 조성물은 유효 성분 이외에 방부제, 안정화제, 수화제, 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제, 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 또는 폴리에틸렌 글리콜) 또는 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸 셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 또는 폴리비닐피롤리돈) 등의 약제학적 보조제 또는 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있다. 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 또는 감미제 등의 다른 약제학적 첨가제를 포함할 수 있다.

[0132] 상기 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 또는 비경구 투여제 형태로 제형화할 수 있다.

[0133] 상기 경구 투여제는 예를 들면, 정제, 환제, 경질 및 연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 분체, 산제, 세립제, 과립제, 펠렛제 등이 있으며, 이들 제형은 유효 성분 이외에 계면 활성제, 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 및 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제 등의 약제학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0134] 또한, 상기 비경구 투여제는 예를 들어, 주사제, 점적제, 연고, 로션, 젤, 크림, 스프레이, 현탁제, 유제, 좌제(坐劑), 패취 등의 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0135] 상기 조성물은 각 투여법에 적합한 제형 및 기준에 준한다. 특히, 정맥 주사의 경우 이에 적합하지 못 한 모든 첨가물을 배제하며, 조성물 자체의 순도 또한 매우 높게 제조된다.

[0136] 상기 유효 성분의 적용량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 질환, 병리 상태, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있다. 일반적인 투여량은 30ug/ml 내지 1mg/ml 가 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0137] 본 발명의 일 측면에 있어서, 본 명세서에 따른 방법으로 제조된 만능줄기세포의 경우 약학 조성물에 있어서 주사제의 제형으로 사용되는 것이 바람직하다. 본 명세서에 따른 방법으로 제조된 만능줄기세포의 경우 피부에 주사하여 주름을 제거하는 용도로써 보편적으로 사용되고 있는 보톡스와 유사하게 피부에 주사되어 피부 줄기세포

를 활성화 시키고, 피부 세포의 증식을 촉진하는 등의 효과를 통해 피부재생, 항노화, 탄력 증진, 주름 개선과 같은 효과를 나타낼 수 있는 것이다.

[0138] 본 발명의 일측면은 본 명세서에 따른 시킵산, 시킵산을 포함하는 식물추출물, 식물 줄기세포 추출물 또는 만능 줄기세포를 포함하는 실험용 시약 또는 배지 조성물을 포함하나, 이에 제한되지 않는 조성물 또한 제공한다.

[0139] 이하, 하기 실시예를 들어 본 발명의 실시 형태를 구체적으로 설명하겠으나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것 일뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0140] [실시예 1] 식물세포 추출물을 성체유래 세포에 주입하는 단계

[0141] 본 발명자들은 식물유래 줄기세포 추출물로 캘러스 파우더를 사용하였다. 본 발명에 사용될 수 있는 캘러스 파우더에는 제한이 없으며 상업적으로 구입하여 사용할 수도 있다.

[0142] 세콰이어 캘러스 추출물은 세콰이어의 잎사귀로부터 캘러스(callus)를 유도한 후 고체배양(solid cell culture)하여 줄기세포주(stem cell line)를 확립하고 현탁배양(suspension cell culture)을 통해 유효 성분을 대량으로 생산한 후 추출하여 얻는다. 세콰이어 캘러스로부터 유효성분을 추출하는 방법은 한국공개특허 제 2007-0113193호에 공지된 추출방법과 같이 상기 식물의 조직 외식체(tissue explant)로부터 유래되는 세포주의 식물성 배양 방법으로 추출할 수 있으며, 세콰이어 유래의 안정한 식물세포주에 5-탄소원자 이하의 알코올의 혼합물을 가하여 용출시켜 추출할 수 있으나, 상기의 추출 방법에 한정되지는 않는다.

[0143] 하기 실시예에서는 상업적으로 구입한 세콰이어 캘러스 파우더 (sequoia callus power)(쥬바이오에프디엔씨에서 구입)를 사용하였다. 구체적으로, 인간유래 피부 섬유아세포 (human dermal fibroblast)를 트립신-EDTA를 이용하여 낱개의 세포로 한 후, 콜드(cold) PBS (phosphate buffered saline)으로 세정하였다. 세포 펠렛을 콜드(cold) Ca²⁺ 및 Mg²⁺-프리(free) HBSS(Hank's balanced salt solution) 100 μ l/100,000 세포가 되게 재현탁하고 1.5ml 튜브로 옮겼다. 120g, 5분간, 4℃로 수평로터(swing-out rotor)에서 원심분리한 후 상등액은 버리고 세포 펠렛을 다시 콜드(cold) HBSS 97.7 μ l로 재현탁하여 37℃ 수조(water bath)에서 2분간 반응시켰다. 스트렙토리신 O(SLO, 콜드(cold) HBSS 중에 1:10 희석된 100 g/ml 스톡)2.3 μ l를 첨가하였다 (최종 SLO 농도: 230 ng/ml). 또는 이 과정에서 SLO 대신 디기토닌 (20ug/ml)과 수송 용액(transport solution)(110 mM 포타슘 아세테이트(potassium acetate), 5 mM 소듐 아세테이트(sodium acetate), 2 mM 마그네슘 아세테이트(magnesium acetate), 1mM EGTA, 2 mM DTT, 단백질 분해효소 저해제 혼합물(proteaseinhibitor cocktail), 20 mM HEPES pH7.3) 200ul를 첨가할 수 있다. 샘플을 37℃ 수조에서 50분간 반응시키는데, 10분에 한 번씩 위아래로 섞어주었다. 반응이 끝난 샘플을 얼음 위에 올려놓고 콜드(cold) HBSS 200 μ l를 첨가한 후, 120 g, 5분간, 4℃로 수평로터(swing-out rotor)에서 원심분리한다. 이러한 세포투과(permeabilization) 과정을 거친 후에, 세포 펠렛을 1 μ l/1000 세포가 되도록 200 μ l의 식물 줄기세포 추출물로 재현탁하였다. 식물 줄기세포 추출물로는 캘러스 파우더를 사용하였다 (500ug/ml). 그리고, ATP-재생 시스템 (10 mM 크레아틴 포스페이트, 및 25g/ml 크레아틴 키나아제), 각각 1mM 뉴클레오티드 트리포스페이트를 첨가하고 37℃ 수조에서 1시간 반응시키는데, 10분에 한번씩 위아래로 섞어주었다. 반응이 끝난 후, 원형질막을 재 봉합하기 위하여 2 mM CaCl₂가 함유된 ES 세포 배지 1 ml을 첨가하여 37℃ 배양기에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS 세정 후, 세포 펠렛을 배아줄기세포 배양 배지로 재 현탁 시킨 후 0.1% 젤라틴이 코팅된 디쉬에 시딩(seeding) 하였다.

[0144] [실시예 2] 추출물이 주입된 세포를 배양과정을 거쳐, 배아 줄기세포와 같은 만능성을 가진 세포를 제작하는 단계

[0145] DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 10% FBS, 50U/ml 페니실린, 50mg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 일 반세포 배양배지에서, 37℃를 유지하며 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 0.1% 젤라틴이 코팅된 디쉬에 식물줄기 세포 추출물(캘러스 파우더)이 주입된 성체유래 세포(인간유래 피부섬유아 세포)를 상기의 배지로 배양하여 첫 2일 후 배지를 교환해 주었다. 10일 동안 매일 배지를 교환해주며 배양한 후, 미토마이신 C(MMC)가 처리된 지지세포 (feeder cell, STO cell) 위에 1:2의 비율로 옮겼다. 이후 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/F12에 20% KSR (Knockout serum replacement), 2 mM L-글루타민, 0.1mM 비필수 아미노산, 0.1mM β -머 캅토에탄올, 50U/ml 페니실린, 50mg/ml 스트렙토마이신, 10 ug/ml bFGF가 첨가된 배양액에서 배지를 매일 교환 해주며 7일에 한번 주기로 새로운 지지세포 위로 옮겼다. 평균적으로 약 21일 쯤 분석에 필요한 맞춤형 줄기세포를 배양할 수 있었다.

- [0146] 도 1은 본 발명의 방법에 따라 만능줄기세포를 유도하는 전체 실험 과정을 나타내는 모식도이다. 도 2 내지 도 4는 각각 배양 5일째, 10일째, 및 32일째 만능줄기세포가 유도된 것을 보여주며, 도 5 및 도 6은 각각 배양 32일째 및 배양 50일째의 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase) 염색소견을 보여준다. 알칼리성 인산가수분해효소(Alkaline phosphatase) 염색은 통상의 염색 키트를 이용하여 확인하였다.
- [0147] 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 유도된 만능줄기 세포가 배아줄기세포의 특징인 알칼리성 인산가수분해효소(Alkaline phosphatase) 염색 양성 소견(보라색)을 나타냄을 알 수 있다.
- [0148] [실시예 3] 맞춤형 만능줄기세포의 특성 분석 (유전자 발현분석)
- [0149] 배양된 세포를 회수한 후, TRIzol 시약(Invitrogen)를 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 cDNA를 합성한 후 Nanog, Oct-3/4 및 대조유전자인 GAPDH 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 산물을 아가로스 겔 전기영동으로 분석하여, 이들 유전자의 발현을 확인한 후 도 7에 나타내었다.
- [0150] 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법으로 유도된 만능줄기세포 (hiPS)는 배아줄기세포(hES)의 특징적인 Nanog, Oct-3/4의 유전자 발현을 보임을 알 수 있다.
- [0151] [실시예 4] 시킵산을 포함하는 세콰이어 캘러스 추출물(*Sequoiadendron giganteum* Callus culture extract)의 제조
- [0152] 실시예 1에 따른 세콰이어 캘러스 파우더 20mg을 1ml의 DMSO 용매에 용해시키고, 마찬가지로 세콰이어 캘러스 파우더 1g을 10ml의 BG와 EtOH이 혼합된 용매에 용해시켜 시킵산을 포함하는 세콰이어 캘러스 추출물을 제조하였고, 이를 아래 시험예에서 시료로 사용하였다.
- [0153] [시험예 1] 세콰이어 캘러스 추출물의 성분분석
- [0154] 실시예 4의 방법에 따라서 얻어진 세콰이어 추출물 중 BG와EtOH이 혼합된 용매에 용해된 세콰이어 캘러스 추출물을 HPLC기계를 이용하여 그 성분을 분석하였다.
- [0155] 본 시험예에서 추출물의 분석은 Waters 1525 μ Binary HPLC Pump를 이용하여 측정된 것으로서, 250 * 4.60 mm, 5 마이크론의 규격을 갖는 Gemini 5u C18 110 A(5 μ m, 4.6 X 250nm, Phenomenex 사)컬럼을 사용하고, 이동상의 용매 A를 물(0.1% TFA함유)로 하고 용매 B를 아세트나이트릴(0.1% TFA함유)로 하고, 230nm의 UV 램프를 사용한 것이며 유속은 1ml/분, 진행 시간(Run time)은 46분, 추출물의 주입량은 20ul로 하여 측정된 것이다.
- [0156] 세콰이어 추출물의 LC 스펙트럼은 도 8과 같으며 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 표 1에서 % Area는 세콰이어 추출물에 들어있는 물질의 %(w/v)를 나타내는 것이며, 이를 통해, 세콰이어 캘러스 추출물에는 다른 성분들보다 시킵산이 많이 함유되어 있음을 알 수 있다. 또한 세콰이어 캘러스 추출물에는 시킵산 외에도 카페산 및 페룰산이 들어있는 것을 확인할 수 있다.

표 1

	RT	Area	% Area	Height
1	3.589	2413779	7.91	122548
2(시킵산)	4.248	9990137	32.75	633894
3	17.115	2660895	8.72	146243
4(카페산)	18.666	7252283	23.78	363051
5(페룰산)	21.672	5225473	17.13	320196
6	22.411	2775302	9.10	159198
7	28.044	183049	0.60	15075

- [0158] [시험예 2-1] Oct 3/4 발현 증가 확인 실험

[0159] 인간 진피 섬유아세포(Neonatal human dermal fibroblasts, NHDF-Neonatal) (CC-2509,Lonza,USA) 5×10^5 개에 퍼미어빌리제이션 버퍼 (permeablization buffer와 디기토닌(digitonin) 10ug/ml를 처리하며 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물 (BG와 EtOH 혼합 용매)20ug/ml 및 시킵산 5ug/ml를 각각 처리하였다. 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)을 음성대조군으로 설정하였다. 처리 후 3일째에 세포를 4 챔버 슬라이드 (chamber slide)에 5,000 개씩 붙여, 1일 뒤인 4일째에 PBS에 있는 3.8% 포르말데하이드(38% 파라포르말데하이드를 희석한 것)로 고정시켜서 상온에서 10분간 둔 후, oct3/4 항체 (Genetex, GTX100622, x200) 및 Alexa Fluor® 488 고트 안티-래빗(goat anti-rabbit) IgG를 이용하여 면역-세포화학(Immuno-cytochemistry)을 실시하여 Carl Zeiss Confocal microscope LSM510 로 400배로 관찰하여 이미지를 얻었다. 관찰을 통해 얻은 이미지는 도 10에 나타내었다. 또한 OCT3/4 ICC 실험 결과로 얻은 Carl Zeiss Confocal microscope 이미지를 샘플당 4장 이상, 평균 5장씩을 분석하여, OCT3/4 양성 세포(positive cell)의 비율을 구하고, 이의 평균, 표준편차를 구하여 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

처리한 화합물	OCT3/4 양성세포 수 (사진당)					총 세포수 (사진 당)					OCT3/4 양성세포의 비율					OCT3/4 양성세포의 평균 비율(%)	
	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#3	#4	#5	평균	표준 편차(S TDEV)
음성 대조군	0	0	0	0	0	11	6	17	20	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0%	0%
세콰이어 캘러스 추출물 (BG*EtOH) 20 μ g/ml	0	3	4	6	3	6	6	10	13	11	0.0	0.5	0.4	0.5	0.3	33%	5%
시킵산 (Shikimic acid, 물) 5 μ g/ml	2	4	1	5		12	14	7	9		0.2	0.3	0.1	0.6		29%	5%

[0161] 도 10에서 볼 수 있듯이, 실험예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 HDF의 경우 음성 대조군인 노말(normal) HDF에 비하여 Oct3/4 유전자가 많이 발현된 것을 확인할 수 있으며, 이는 시킵산으로 처리한 것 보다 많은 것으로 확인된다.

[0162] 또한 표 2에서 볼 수 있듯이, Oct3/4 유전자에 대해 양성인 세포의 퍼센트를 살펴보면 세콰이어 캘러스 추출물을 BG(Butyl glycol) 및 EtOH의 용매로 추출한 경우 양성인 세포 갯수의 평균 퍼센트가 33%로 가장 높았으며, 이는 시킵산 보다 높은 수치에 해당함을 확인하였다.

[0163] [시험예 2-2] Oct 3/4 발현 증가 확인 실험

[0164] 인간 진피 섬유아세포(Neonatal human dermal fibroblasts, NHDF-Neonatal) (CC-2509,Lonza,USA) 1×10^6 개에 시킵산 10uM, 10mM을 각각 처리하였다. 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)을 음성대조군으로 설정하였다. 처리 후 5일째에 세포를 4 chamber slide에 5,000 개씩 붙여, 3일 뒤인 84일째에 PBS에 있는 3.8% 포르말데하이드(38% 파라포르말데하이드를 희석한 것)로 고정시켜서 상온에서 10분간 둔 후, oct3/4 항체 (Genetex, GTX100622, x200) 및 Alexa Fluor® 488 고트 안티-래빗(goat anti-rabbit) IgG를 이용하여 면역-세포화학(Immuno-cytochemistry)을 실시하여 Carl Zeiss Confocal microscope LSM510 로 400배로 관찰하여 이미지를 얻었다. 관찰을 통해 얻은 이미지는 도 11에 나타내었다. 또한 OCT3/4 ICC 실험 결과로 얻은 Carl Zeiss Confocal microscope 이미지를 샘플당 4장 이상, 평균 5장씩을 분석하여, OCT3/4 양성세포의 비율을 구하고, 이의 평균, 표준편차를 구하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

처리한 화합물	OCT3/4 양성세포 수 (사진당)					총 세포수 (사진 당)					OCT3/4 양성세포의 비율					OCT3/4 양성세 포의 평균 비율(%)	
	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#3	#4	#5	평균(Av erage)	표준 편차(S TDEV)
음성 대조군	0	0	0	0	0	11	6	17	20	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0%	0%

시킵산 (Shikimic acid, 물)	10uM	18	4	10	14	24	54	27	33	53	60	0.33	0.15	0.30	0.26	0.40	29%	2%
	10mM	11	11	12	0	18	33	32	59	36	39	0.33	0.34	0.20	0.00	0.46	27%	4%

- [0166] 도 11에서 볼 수 있듯이, 시킵산을 처리한 HDF의 경우 무처리 노말(normal) HDF에 비하여 Oct3/4 유전자가 많이 발현된 것을 확인할 수 있으며, 이는 시킵산이 많을수록 증가하는 것으로 확인된다.
- [0167] 또한 표 3에서 볼 수 있듯이, Oct3/4 유전자에 대해 양성인 세포의 퍼센트를 살펴보면 물을 용매로 시킵산을 처리한 경우 양성인 세포 갯수의 평균 퍼센트가 27-29%로 나타났으며, 이는 무처리군에 비해 유의미하게 높은 수치에 해당함을 확인하였다.
- [0168] 따라서 위와 같은 결과를 통하여 세콰이어 캘러스 추출물의 주성분인 시킵산은 맞춤형 만능줄기세포를 유도하는데 핵심적인 역할을 하는 Oct3/4 유전자를 현저히 발현시키는 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있다. 본 발명에 따른 시킵산 또는 이를 포함하는 추출물을 체세포에 주입하면 Oct3/4 유전자를 발현시켜 맞춤형 만능줄기세포를 유도할 수 있다.
- [0169] [시험예 3-1] 줄기세포 활성 마커인 알칼리성 인산가수분해효소(Alkaline phosphatase, ALP)의 발현 증가 확인 실험
- [0170] NHDF-네오네이탈(Neonatal)(CC-2509,Lonza,USA) 5 x10⁵ 개에 퍼미어빌리제이션 버퍼(permeablization buffer)와 디기토닌(digitonin) 10ug/ml을 처리하며 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물(BG와 EtOH 혼합 용매) 20ug/ml 및 시킵산 5ug/ml을 처리하였다. 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)을 음성대조군으로 설정하였다. 6일째에 세포를 12 웰 플레이트(well plate)에 5,000 개씩 붙였고, 5일 뒤인 11일째에 PBS에 있는 3.8% 포름알데하이드로 고정시켜서 상온에 15분간 둔 후, NBT/BCIP® ALP 기질 용액(substrate solution) 200ul을 ALP 버퍼(buffer) 10ml에 희석해 0.5ml씩 처리하고 20시간 뒤 Olympus CKX41광학 현미경으로 40배로 관찰하였다. 관찰을 통해 얻은 결과는 도 12에 나타내었다.
- [0171] 도 12에서 볼 수 있듯이, 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 HDF의 경우 노말(normal) HDF에 비하여 염색된 부분이 많으며 이는 ALP의 발현이 현저하게 증가한 것을 나타낸다. 또한 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 것은 시킵산을 처리한 것보다 ALP가 많이 발현된 것을 확인할 수 있다.
- [0172] 섬유아세포가 맞춤형 만능줄기세포로 진행되는 과정에 있어서, ALP는 Oct4 등의 유전자를 세포 내에 발현시킨 뒤 3일 뒤부터 발현되기 시작하는 것으로서 역분화줄기세포 형성 초기에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 마커(marker)이다. 따라서 본 발명에 따른 세콰이어 캘러스 추출물을 체세포에 주입하면 ALP의 발현이 현저히 증가하게 되고, 또한 Oct4 유전자를 발현시키게 되므로 맞춤형 만능줄기세포를 유도할 수 있다.
- [0173] 본 실험 결과에 비추어 본 발명에 따른 세콰이어 캘러스 추출물은 줄기세포 활성 마커인 ALP의 발현을 촉진하는 것에 비추어 줄기세포를 활성화시키는 현저한 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.
- [0174] [시험예 3-2] 줄기세포 활성 마커인 알칼리성 인산가수분해효소(Alkaline phosphatase, ALP)의 발현 증가 확인 실험
- [0175] NHDF-네오네이탈(Neonatal)(CC-2509,Lonza,USA) 1x10⁶ 개에 시킵산 10uM, 10mM을 각각 처리하였다. 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)을 음성대조군으로 설정하였다. 5일째에 세포를 6 웰 플레이트에 100,000 개씩 붙였고, 7일 뒤인 12일째에 PBS에 있는 3.8% 포름알데하이드로 고정시켜서 상온에 15분간 둔 후, NBT/BCIP® ALP 기질 용액 200ul을 ALP 버퍼 10ml에 희석해 0.5ml씩 처리하고 20시간 뒤 Olympus CKX41광학 현미경으로 40배로 관찰하였다. 관찰을 통해 얻은 결과는 도 13에 나타내었다.
- [0176] 도 13에서 볼 수 있듯이, 시킵산을 처리한 HDF의 경우 노말(normal) HDF에 비하여 남색으로 진하게 염색된 부분이 많으며 이는 ALP의 발현이 현저하게 증가한 것을 나타낸다. 또한 시킵산의 농도가 증가할수록 ALP가 많이 발현된 것을 확인할 수 있다.

- [0177] 섬유아세포가 맞춤형 만능줄기세포로 진행되는 과정에 있어서, ALP는 Oct4 등의 유전자를 세포 내에 발현시킨 뒤 3일 뒤부터 발현되기 시작하는 것으로서 역분화줄기세포 형성 초기에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 마커이다. 따라서 본 발명에 따른 시킵산 및 이를 함유하는 식물추출물을 체세포에 주입하면 ALP의 발현이 현저히 증가하게 되고, 또한 Oct4 유전자를 발현시키게 되므로 맞춤형 만능줄기세포를 유도할 수 있다.
- [0178] 본 실험 결과에 비추어 본 발명에 따른 시킵산 및 이를 함유한 식물추출물은 줄기세포 활성 마커인 ALP의 발현을 촉진하는 것에 비추어 줄기세포를 활성시키는 현저한 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.
- [0179] [시험예 4-1] 진피세포의 콜로니 생성력 증가 실험
- [0180] NHDF-네오네이탈(Neonatal)(CC-2509,Lonza,USA) 5×10^5 개에 퍼미어빌리제이션 버퍼(Permeabilization buffer)와 디기토닌(digitonin) 10ug/ml로 처리하고 0.4um필터로 여과한 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물(BG와 EtOH 혼합 용매) 100ppm, 200ppm과 DMSO 용액 20ppm을 처리하였다. 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)을 음성대조군으로 설정하였다. 이를 계대배양 한지 10일째에 세포를 60mm 플레이트에 200개씩 붙인 후, 23일째에 얼음 위에서 아이스-콜드(ice-cold) PBS로 세척하고, -20도에 보관한 아이스-콜드(ice-cold) 메탄올로 세포를 10분간 고정하였다. 에탄올 원액(Ethanol stock solution)에 있는 1% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 PBS에 1/10으로 희석하여 실험 용액(working solution)을 만든 뒤 이를 세포에 5~10분간 처리하여 염색한 후, PBS로 4회 세척하고, 사진촬영을 하였다. 정량 분석을 위해 50% 에탄올, 40% DW, 10% 아세트산으로 구성된 용리 버퍼(elution buffer)를 준비한 후, 5분간 세포에 처리하여 용출시켰다. 이후 96웰 플레이트에 200ul씩 옮겨 580nm에서 흡광도를 측정하였다. 사진촬영에 따른 결과들도 14에 나타내었다. 그리고 흡광도 측정에 따른 결과는 음성대조군을 기준으로 하여 배수의 결과로 도 15에 나타내었다.
- [0181] 도 14 에서 볼 수 있듯이, 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 경우 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)인 음성대조군에 비하여 염색된 부분이 상당히 많으며 이는 진피세포가 활발히 분화하여 콜로니를 많이 생성한 것을 의미하고 세포 분화를 촉진하는 것을 확인할 수 있다.
- [0182] 또한 도 15에서 볼 수 있듯이, 세콰이어 캘러스 추출물을 처리한 경우 음성대조군에 비하여 콜로니 생성력의 증가 정도가 약 2.6배 증가하였으며, 이는 통계적으로 유의미한 것이다. 또한 시킵산의 경우 음성대조군에 비해 약 3.8배가 증가하였다.
- [0183] 따라서 본 발명에 따른 세콰이어 캘러스 추출물은 섬유아세포의 증식을 현저히 촉진한다는 것을 확인할 수 있다.
- [0184] 또한 진피세포의 섬유아세포 증식을 현저히 촉진하는 점에 비추어 본 발명에 따른 세콰이어 추출물은 피부재생을 촉진하는 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.
- [0185] [시험예 4-2] 진피세포의 콜로니 생성력 증가 실험
- [0186] NHDF-네오네이탈(Neonatal)(CC-2509,Lonza,USA) 1×10^6 개에 시킵산 10uM, 50uM, 100uM, 1mM, 10mM을 각각 처리하였다. 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)을 음성대조군으로 설정하였다. 이를 계대배양 한지 5일째에 세포를 60mm 플레이트에 200개씩 붙인 후, 17일째에 얼음 위에서 아이스-콜드(ice-cold) PBS로 세척하고, -20도에 보관한 아이스-콜드(ice-cold) 메탄올로 세포를 10분간 고정하였다. 에탄올 원액(Ethanol stock solution)에 있는 1% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 PBS에 1/10으로 희석하여 실험 용액을 만든 뒤 이를 세포에 5~10분간 처리하여 염색한 후, PBS로 4회 세척하고, 사진촬영을 하였다. 정량 분석을 위해 50% 에탄올, 40% DW, 10% 아세트산으로 구성된 용리 버퍼를 준비한 후, 5분간 세포에 처리하여 용출시켰다. 이후 96 웰 플레이트에 200ul씩 옮겨 580nm에서 흡광도를 측정하였다. 사진촬영에 따른 결과는 도 16에 나타내었다. 그리고 흡광도 측정에 따른 결과는 음성대조군을 기준으로 하여 배수의 결과로 도 17에 나타내었다.
- [0187] 도 16 에서 볼 수 있듯이, 시킵산을 처리한 경우 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)인 음성대조군에 비하여 염색된 부분이 상당히 많으며 이는 진피세포가 활발히 분화하여 콜로니를 많이 생성한 것을 의미하고 세포 분화를 촉진하는 것을 확인할 수 있다.
- [0188] 또한 도 17에서 볼 수 있듯이, 시킵산을 처리한 경우 음성대조군에 비하여 콜로니 생성력의 증가 정도가 약

1.27~5.06배 증가하였으며, 이는 통계적으로 유의미한 것이다. 특히 시킵산을 1mM 처리한 경우에 콜로니의 생성력이 가장 많이 증가하였으며, 이를 통해 1mM 농도의 시킵산을 처리하는 것이 가장 많이 세포의 증식을 촉진한다는 것을 확인할 수 있다.

[0189] 따라서 본 발명에 따른 시킵산은 섬유아세포의 증식을 현저히 촉진한다는 것을 확인할 수 있다.

[0190] 또한 진피세포의 섬유아세포 증식을 현저히 촉진하는 점에 비추어 본 발명에 따른 시킵산 및 이를 함유한 세콰이어 추출물은 피부재생을 촉진하는 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.

[0191] [시험예 5] 진피세포의 증식력 증가 실험

[0192] 96 웰 플레이트에 NHDF-네오네이탈(Neonatal)(CC-2509,Lonza,USA)를 2,000개씩 붙인 후, 다음 날 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물(BG 및 EtOH용매) 20ug/ml 및 시킵산 5ug/ml을 처리하였다. 아무런 처리도 하지 않은 NHDF-네오네이탈(Neonatal)을 음성대조군으로 설정하였다. 이를 7일간 배양하였고 (7일째에 컨플루언시(Confluency)가 90% 이하가 되도록), 그 후 6일 뒤에 WST-1을 10ul씩 처리하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군(negative control) 샘플을 기준으로 배수로 결과를 그래프로 도 18에 나타내었다.

[0193] 도 18에서 볼 수 있듯이, 본 발명에 따른 세콰이어 캘러스 추출물을 처리하는 경우 음성대조군에 비하여 세포 분열 정도가 약 1.5배 이상 증가하였음을 확인할 수 있으며, 이는 통계적으로 유의미한 것이다. 또한 시킵산의 경우 정상대조군에 비해 2배가 증가하였다.

[0194] 따라서 본 발명에 따른 세콰이어 캘러스 추출물은 섬유아세포의 분열을 현저히 촉진한다는 것을 확인할 수 있다.

[0195] 또한 진피세포의 섬유아세포 분열을 현저히 촉진하는 점에 비추어 본 발명에 따른 세콰이어 추출물은 피부재생을 촉진하는 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.

[0196] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

[0197] 아래 상기 조성물의 제형예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하는 것이 아니라 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0198] [제형예 1] 연질 캡슐

[0199] 시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물 40ug, 비타민 E 9mg, 비타민 C 9mg, 팜유 2mg, 식물성 경화유 8mg, 황납 4mg 및 레시틴 9mg을 혼합하고, 통상의 방법에 따라 혼합하여 연질 캡슐 충전액을 제조한다. 1 캡슐당 400mg씩 충전하여 연질 캡슐을 제조한다. 그리고, 상기과 별도로 젤라틴 66 중량부, 글리세린 24 중량부 및 솔비톨액 10 중량부의 비율로 연질 캡슐 시트를 제조하고 상기 충전액을 충전시켜 본 발명에 따른 조성물 400mg이 함유된 연질 캡슐을 제조한다.

[0200] [제형예 2] 정제

[0201] 시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물 40 μg, 비타민 E 9mg, 비타민 C 9mg, 갈락토올리고당 200 mg, 유당 60mg 및 맥아당 140mg을 혼합하고 유동층 건조기를 이용하여 과립한 후 당 에스테르(sugar ester) 6mg을 첨가한다. 이들 조성물 500mg을 통상의 방법으로 타정하여 정제를 제조한다.

[0202] [제형예 3] 드링크제

[0203] 시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물 40ug, 비타민 E 9mg, 비타민 C 9mg, 포도당 10g, 구연산 0.6g, 및 액상 올리고당 25g을 혼합한 후 정제수 300ml를 가하여 각 병에 200ml씩 되도록 충전한다. 병에 충전한 후 130℃에서 4~5초간 살균하여 드링크제를 제조한다.

[0204] [제형예 4] 과립제

[0205] 시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물 40ug, 비타민 E 9mg, 비타민 C 9mg, 무수결정 포도당 250 mg 및 전분 550mg을 혼합하고, 유동층 과립기를 사용하여 과립으로 성형한 후 포에 충전하여 과립제를 제조한다.

[0206] [제형예 5] 주사제

[0207] 하기 표 4에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 주사제를 제조하였다.

표 4

[0208]	배합 성분	함량
	시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물	40 μ g
	주사용 멸균 증류수	적량
	pH 조절제	적량

[0209] 통상의 주사제의 제조 방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 함량으로 주사제를 제조한다.

[0210] [제형예 6] 유연화장수(스킨로션)

[0211] 하기 표 5에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 유연화장수를 제조하였다.

표 5

[0212]	배합 성분	함량 (중량 %)
	시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물	0.2
	글리세린	3.0
	부틸렌글리콜	2.0
	프로필렌글리콜	2.0
	카르복시비닐폴리머	0.1
	피이지-12 노닐페닐에테르	0.2
	폴리솔베이트 80	0.4
	에탄올	10.0
	트리에탄올아민	0.1
	방부제, 색소, 향료	적량
	정제수	잔량

[0213] [제형예 7] 영양화장수(밀크로션)

[0214] 하기 표 6에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 영양화장수를 제조하였다.

표 6

[0215]	배합 성분	함량 (중량 %)
	시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물	1.0
	글리세린	3.0
	부틸렌글리콜	3.0
	프로필렌글리콜	3.0
	카르복시비닐폴리머	0.1
	밀납	4.0
	폴리솔베이트 60	1.5
	카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	5.0
	스쿠알란	5.0
	솔비타세스퀴올레이트	1.5
	유동파라핀	0.5
	세테아릴 알코올	1.0
	트리에탄올아민	0.2
	방부제, 색소, 향료	적량
	정제수	잔량

[0216] [제형예 8] 영양크림

[0217] 하기 표 7에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 영양크림을 제조하였다.

표 7

[0218]	배합 성분	함량(중량%)
	시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물	2.0
	글리세린	3.0
	부틸렌글리콜	3.0
	유동파라핀	7.0
	베타글루칸	7.0
	카보머	0.1
	카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	3.0
	스쿠알란	5.0
	세테아릴 글루코사이드	1.5
	소르비탄 스테아레이트	0.4
	폴리솔베이트 60	1.2
	트리에탄올아민	0.1
	방부제, 색소, 향료	적량
	정제수	잔량

[0219] [제형예 9] 마사지 크림

[0220] 하기 표 8에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 마사지 크림을 제조하였다.

표 8

[0221]	배합 성분	함량(중량%)
	시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물	2.0
	글리세린	8.0
	부틸렌글리콜	4.0
	유동파라핀	45.0
	베타글루칸	7.0
	카보머	0.1
	카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	3.0
	밀납	4.0
	세테아릴 글루코사이드	1.5
	세스퀴 올레인산 소르비탄	0.9
	바세린	3.0
	파라핀	1.5
	방부제, 색소, 향료	적량
	정제수	잔량

[0222] [제형예 10] 팩

[0223] 하기 표 9에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 팩을 제조하였다.

표 9

[0224]	배합 성분	함량(중량%)
	시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물	0.2
	글리세린	4.0
	폴리비닐알콜	15.0
	히알루론산 추출물	5.0
	베타글루칸	7.0
	알란토인	0.1

노닐 페닐에테르	0.4
폴리솔베이트 60	1.2
에탄올 방부제	6.0
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	잔량

[0225] [제형예 11] 건강 식품

[0226] 하기 표 10에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 건강식품을 제조하였다.

표 10

[0227]

배합 성분	함량
시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물	20 μ g
비타민 A 아세테이트	70 μ g
비타민 E	1.0mg
비타민 B1	0.13mg
비타민 B2	0.15mg
비타민 B6	0.5mg
비타민 B12	0.2 μ g
비타민 C	10mg
비오틴	10 μ g
니코틴산아미드	1.7mg
엽산	50 μ g
판토텐산 칼슘	0.5mg
황산 제1철	1.75mg
산화아연	0.82mg
탄산마그네슘	25.3mg
제1인산칼륨	15mg
제2인산칼슘	55mg
구연산칼륨	90mg
탄산칼슘	100mg
염화마그네슘	24.8mg

[0228] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0229] [제형예 12] 건강 음료

[0230] 하기 표 11에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 건강음료를 제조하였다.

표 11

[0231]

배합 성분	함량
시킵산 또는 실시예 4에 따른 세콰이어 캘러스 추출물	20 μ g
구연산	1000mg
올리고당	100 g
타우린	1g
정제수	잔량

[0232] 통상의 건강 음료 제조 방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균한다.

[0233] [제형예 13] 만능줄기세포를 포함하는 주사제

[0234] 하기 표 12에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 본 명세서의 실시예 2에 따른 만능줄기세포를 포함하는 주사제를 제조하였다.

표 12

[0235]

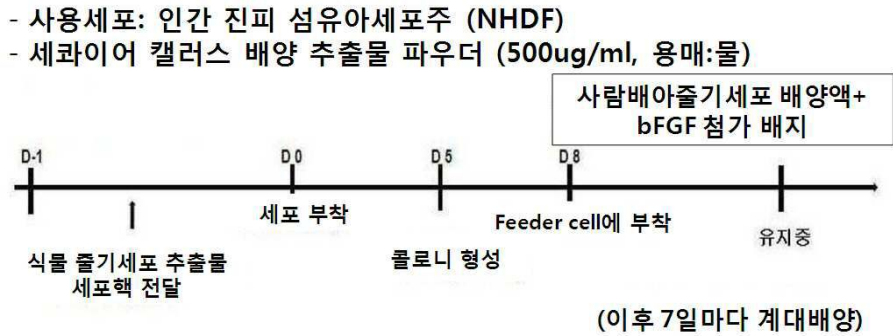
배합 성분	함량
실시예 2에 따른 만능줄기세포	40 μg
주사용 멸균 증류수	적량
pH 조절제	적량

[0236]

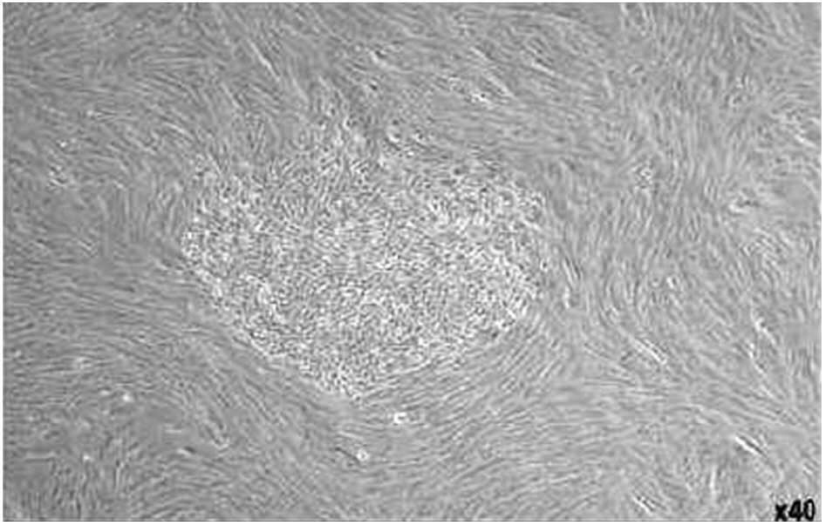
본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주 내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

도면

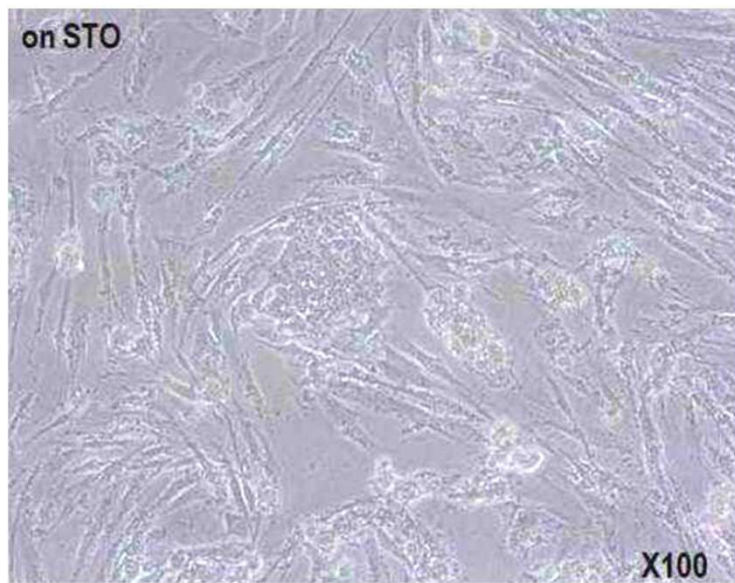
도면1



도면2

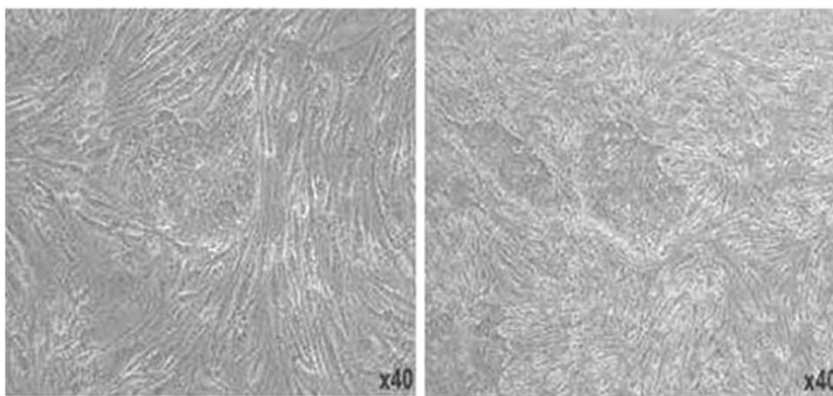


도면3

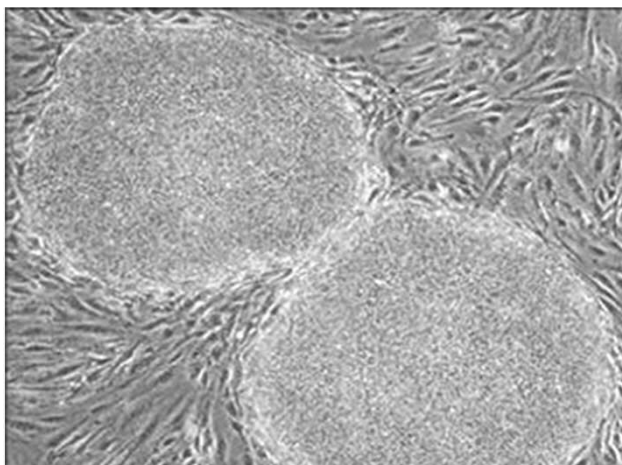


도면4

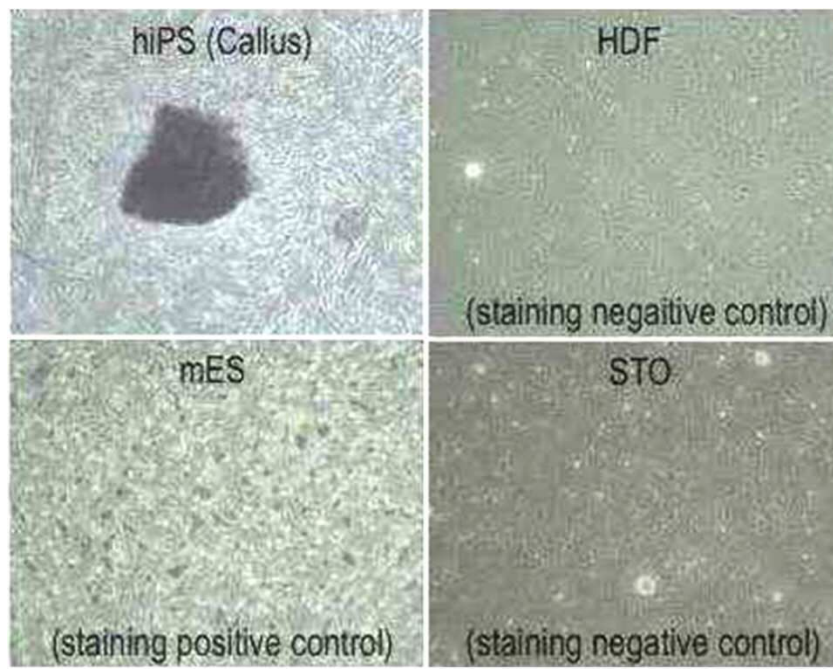
A.



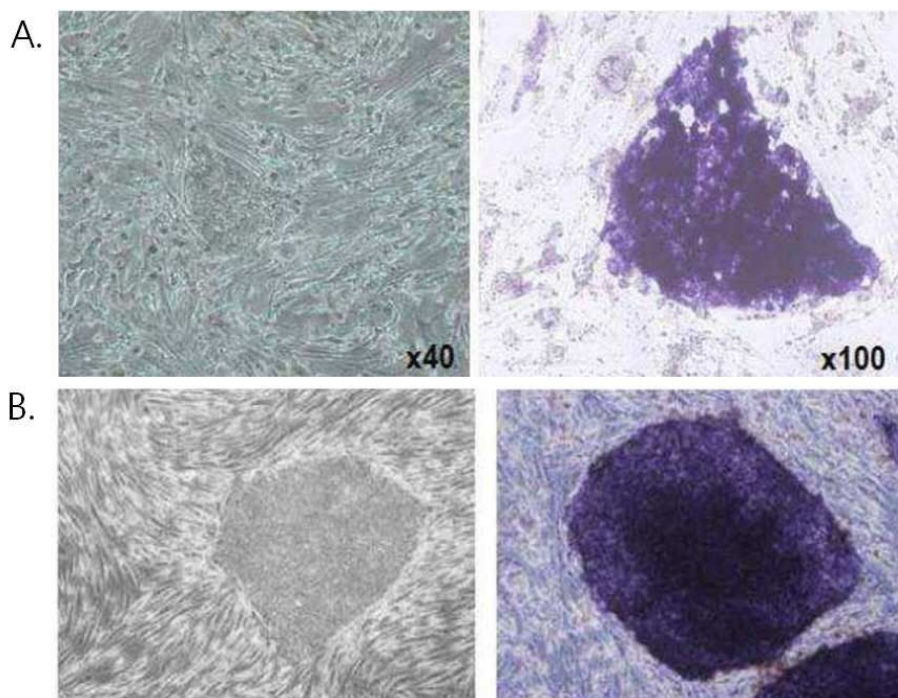
B.



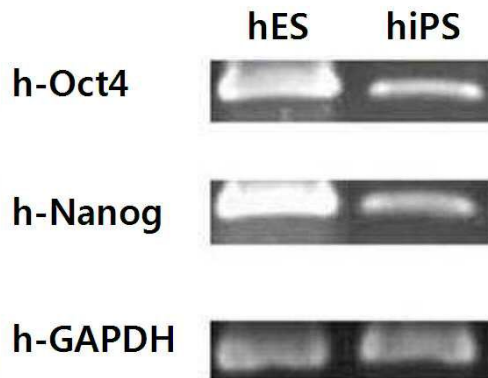
도면5



도면6



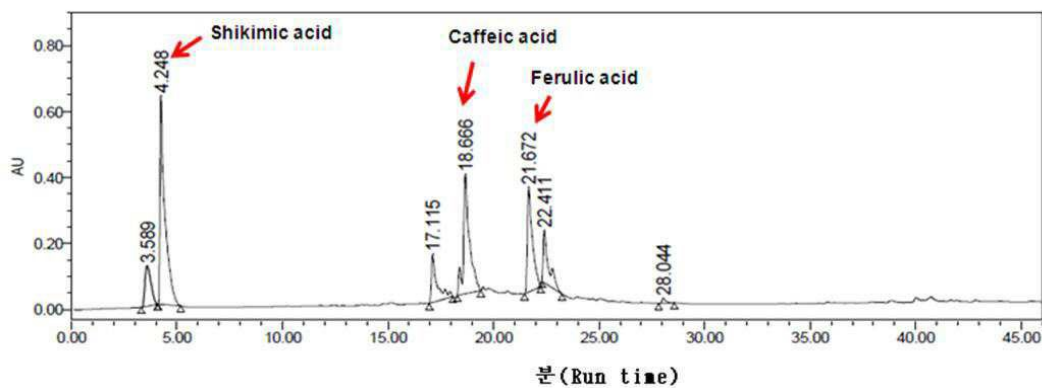
도면7



hES: 사람 배아줄기세포

hiPS: 식물줄기세포 추출물로 유도된 사람 유도만능줄기세포

도면8



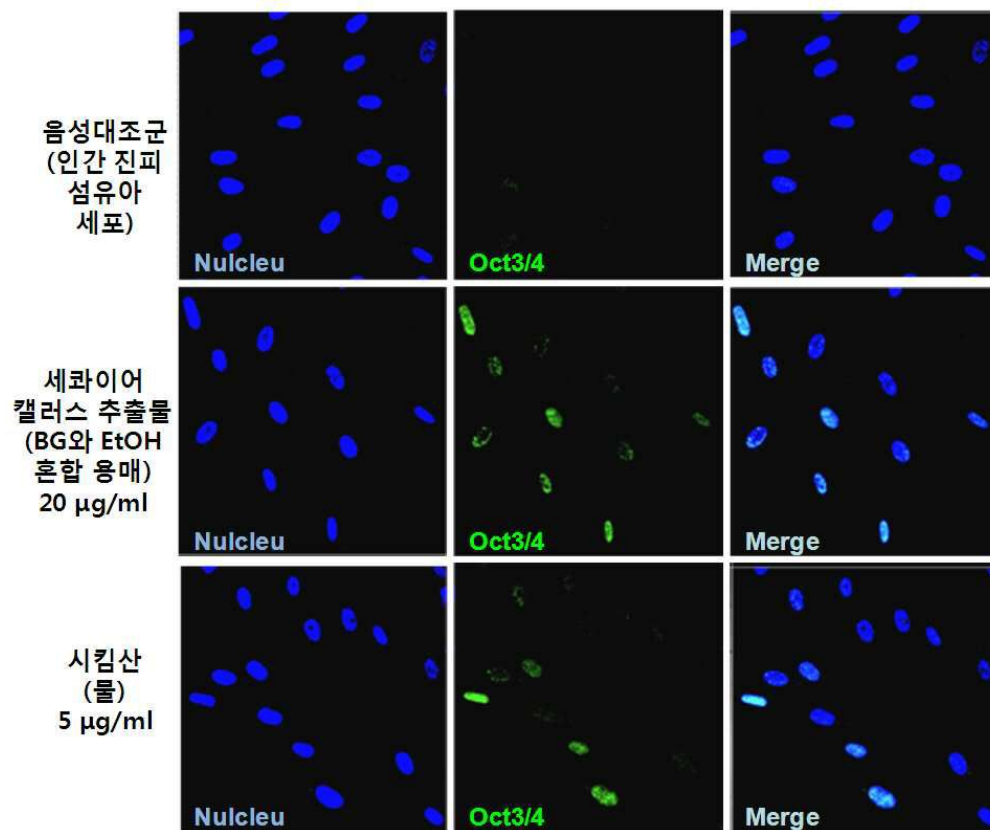
도면9



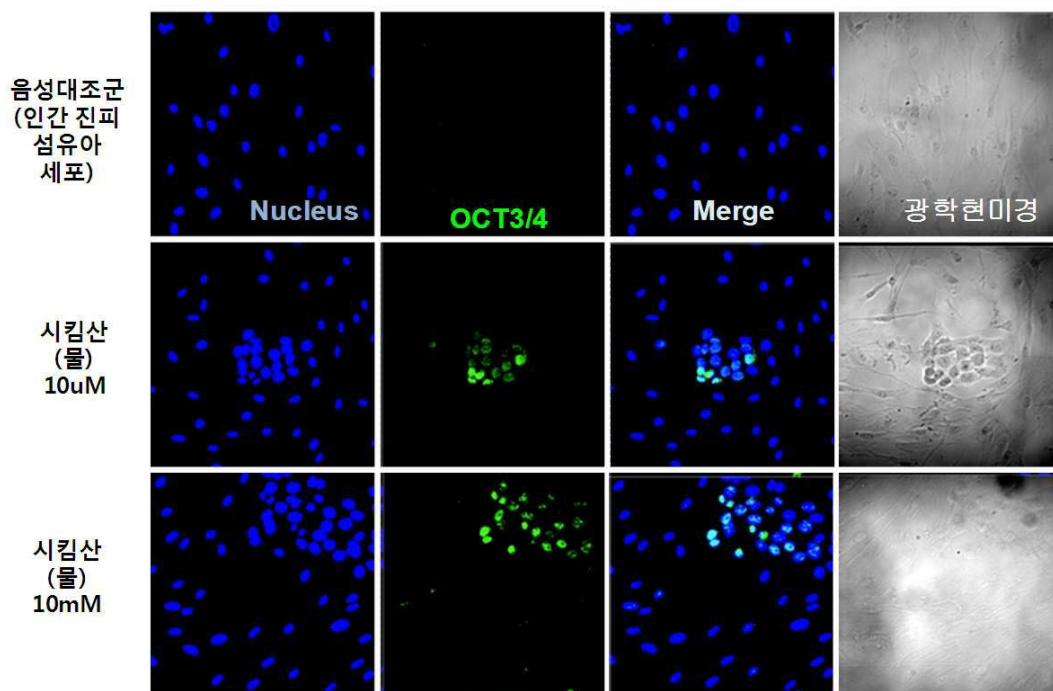
사용세포: 인간 진피 섬유아세포 (NHDF-Neonatal)

사용물질: 시킴산 또는 식물 줄기세포 추출물 (세과이어 캘러스 배양 추출물 파우더, 500 µg/ml, 용매:물)

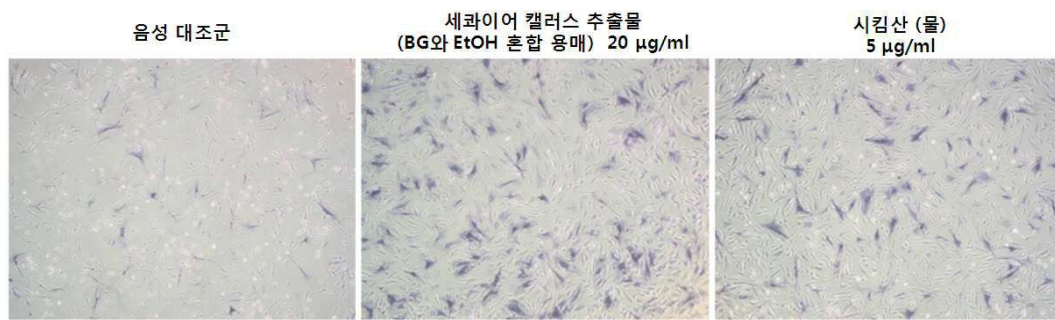
도면10



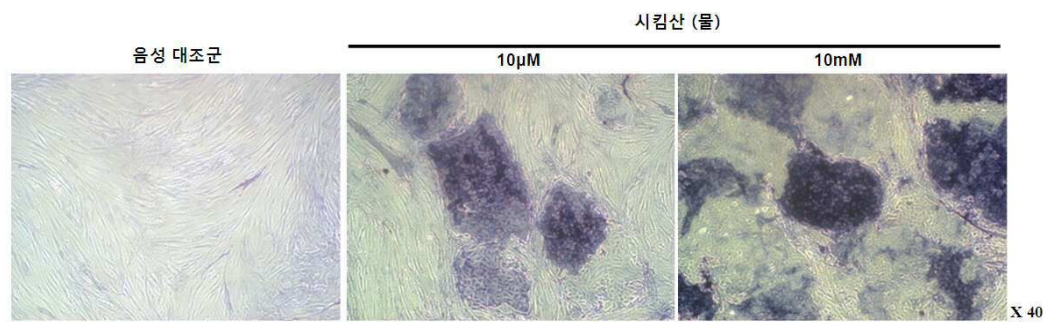
도면11



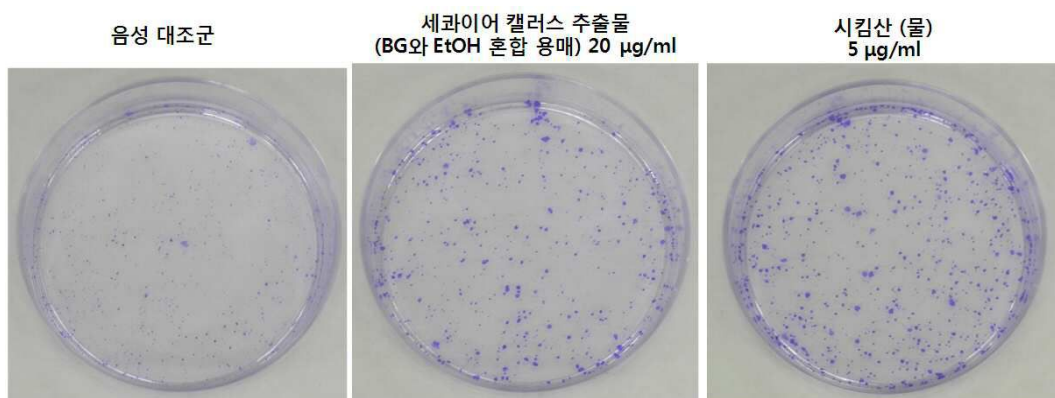
도면12



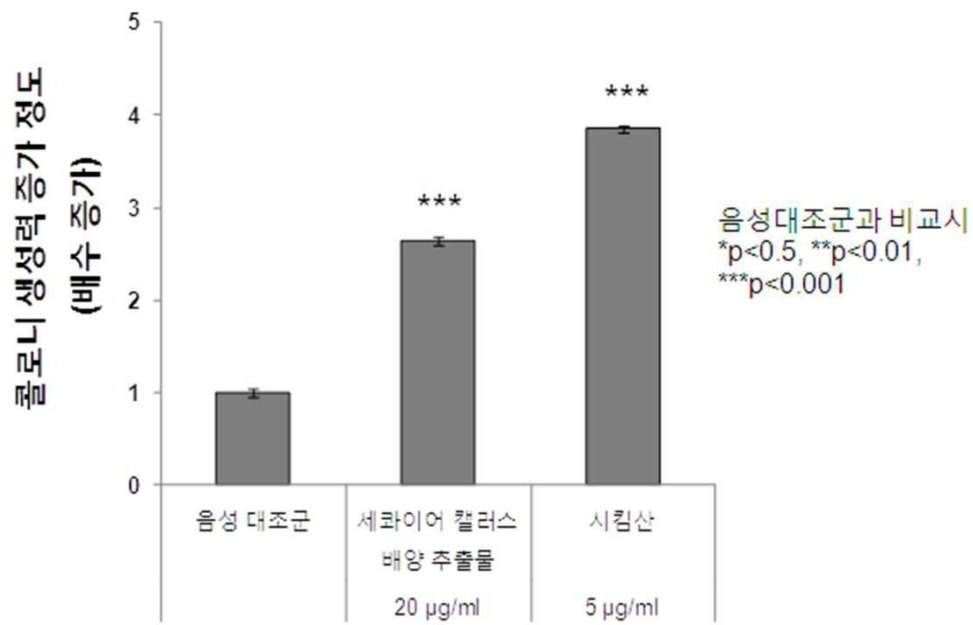
도면13



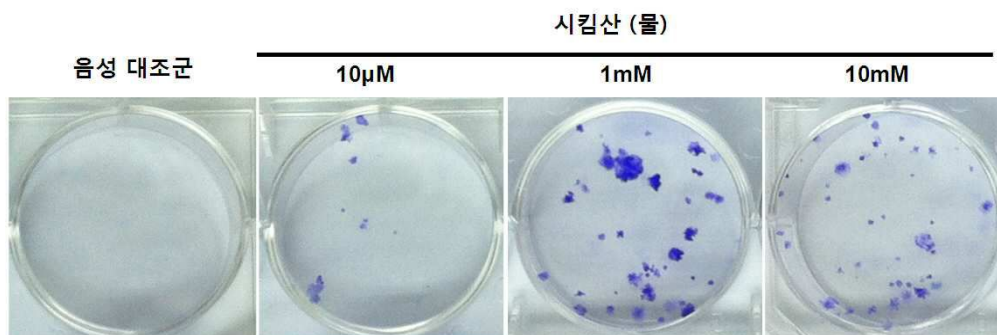
도면14



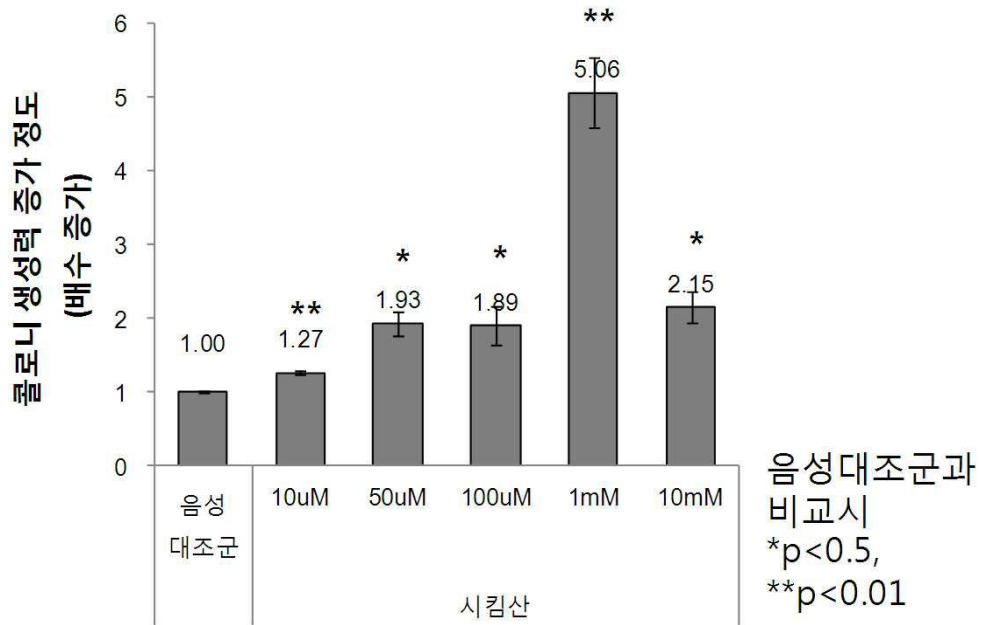
도면15



도면16



도면17



도면18

