(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0125945
(43) 공개일자 2014년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/99 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61K 8/98 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0043536
(22) 출원일자 2013년04월19일
심사청구일자 2013년04월19일

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
김동완
부산광역시 연제구 과정로343번길 43 연산자이아파트 117동 2804호
박한나
경상남도 김해시 우암로 8 성원아파트 301동 402호
(74) 대리인
김순웅

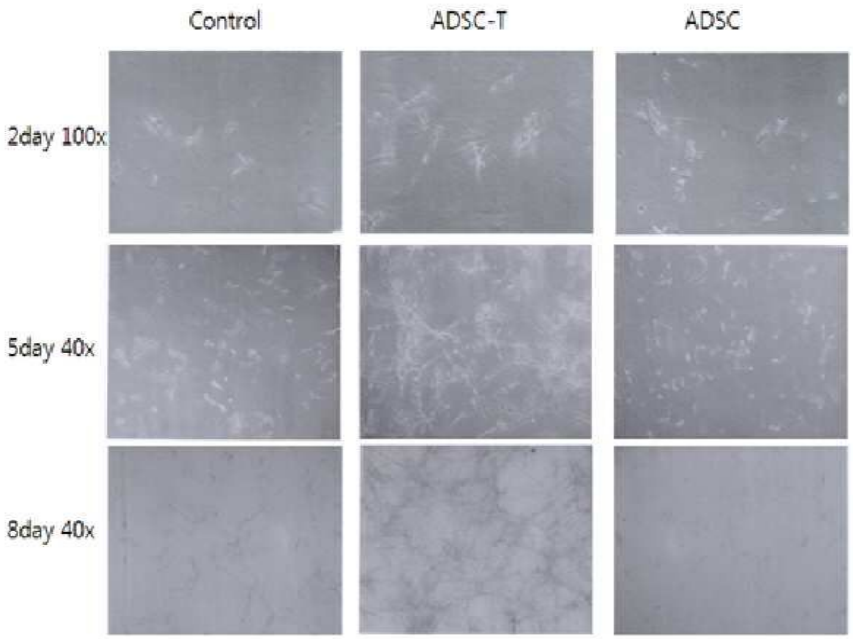
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **지방유래줄기세포에 T 항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 피부재생용, 미백용, 항산화용 또는 상처 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 지방유래줄기세포에 T 항원을 도입한 ADSC-T 세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 피부재생용, 미백용 또는 항산화용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 지방유래줄기 세포주(ADSC-T)의 배양액은 콜라겐 배양에서 콜라겐의 탄력증가 및 창상수축효과를 피부재생에 우수한 효과를 보이고, 또한 타이로시네이즈 활성 및 멜라닌 활성을 저해함으로써 피부 미백에 훌륭한 효과를 보이고, DPPH 라디칼 저해함으로써 항산화 효과에 탁월하며, 나아가 섬유아세포의 세포 이동성을 증가시킴으로써 상처 치료에 현저한 효과를 가지고 있으므로, 피부재생, 미백, 항산화 또는 상처치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 피부재생 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 T항원은 시미안 바이러스40(SV40)으로부터 유래한 것을 특징으로 하는, 피부재생 개선용 화장료 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 ADSC-T세포의 배양액은

(a) 흡입지방조직에 콜라게나아제 효소를 처리한 후 원심분리하여 지방유래 줄기세포를 분리하여 배양하는 단계;

(b) 플라스미드 발현 벡터(pEF321β-T)를 상기 (a) 단계에서 배양한 지방유래 줄기세포에 형질 감염시켜 SV40 T 항원을 발현하는 ADSC-T세포를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 제조된 ADSC-T를 배양하여 배양액을 수득하는 단계;를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 피부재생 개선용 화장료 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 (b) 단계의 형질감염은 인산화칼슘 형질감염, 전기천공법, 미세주입법 및 리포솜 주입법으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 피부재생 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 피부재생 개선용 식품 조성물.

청구항 6

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 미백용 화장료 조성물.

청구항 7

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 미백용 식품 조성물.

청구항 8

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 항산화용 또는 항노화용 화장료 조성물.

청구항 9

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 항산화용 또는 항노화용 식품 조성물.

청구항 10

지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 상처치료용 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지방유래줄기세포에 T 항원을 도입한 ADSC-T 세포(Adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 피부재생용, 미백용, 항산화용 또는 상처 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 21세기 의학 및 삶의 질의 향상으로 인간평균수명은 100세를 바라보고 있다. 인간수명이 늘어남에 따라 질병예방과 노화방지에 관한 관심도가 커지고 있다. 사람의 신체피부는 시간이 지남에 따라 외부자극과 신체피부노화에 의해서 주름, 기미, 재생력이 떨어지는 현상 등이 나타난다. 이는 신체노화를 눈으로 확인할 수 있는 요소가 되며, 이러한 피부노화방지에 관한 관심도는 매우 크며, 사람들은 피부노화를 방지하기 위하여 치료제 및 화장품을 사용하고 있다. 이러한 관심도에 따라 화장품 회사들은 지속적으로 신규물질에 관하여 탐색하고 있다.

[0003] 기존의 미백, 항노화 효과 물질을 살펴보면 먼저 미백기능 물질은 알부틴(arbutin)과 아스코르브산(ascorbic acid) 유도체 셀리나(selina) 등이 사용되고 있다.

[0004] **피부색소침착**은 멜라닌형성세포(melanocyte)에서 멜라닌(melanin) 생산과 관련하여 일어난다. 이는 외부의 자극(UV, 염증)과 체내 활성산소에 의해서 멜라닌 생산이 증가한다. **멜라닌 생성 과정**은 타이로신(tyrosine)이 도파(dopa)를 거쳐 도파퀴논(Dopaquinone)으로 산화하여 도파크롬(Dopachrome)에서 5,6-다이하이드록시인돌-2-카복실산(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)으로 되어 최종 유멜라닌(Eumelanin)이 생산된다. 타이로신이 산화되어 도파퀴논의 형성과, 5,6-다이하이드록시인돌-2-카복실산이 형성되는 과정에서 작용하는 타이로시네이즈(tyrosinase) 효소는 멜라닌 생산에서 가장 중요한 효소이다. 그러므로 미백효과 물질탐색에서 **타이로시네이즈 억제**는 주요 표적이 된다.

[0005] **노화방지 관련 물질**은 레티노이드(retinoid), 규산(silicic acid), 메발로노락톤(Mevalonolactone; mevalonic acid, MA), 아데노신(adenosine), 레티닐 팔미테이트(retinyl palmitate) 등이 있으며 이들은 피부세포재생조절, 콜라겐 생성 조절, 주름개선 등의 효과가 있다. 피부노화를 방지하기 위해서는 피부세포재생 활성화, 콜라겐 형성 촉진, 항산화 작용 등이 있다. 피부는 표피, 진피, 피하조직으로 이루어져 있으며 진피 속 섬유아세포(Fibroblast)는 피부노화에 큰 역할을 한다. 섬유아세포의 수 감소로 인한 세포노화는 피부조직의 손상을 야기한다.

[0006] 또한 **피부상처회복** 과정에서도 **섬유아세포의 이동, 증식 및 상처부위의 수축**은 중요한 요소이다. 섬유아세포(fibroblast)는 **콜라겐 생성**에도 관여하며 콜라겐은 진피층의 90% 이상 구성되어 있으며, 이는 피부 보습 및 탄력에 영향을 미친다.

[0007] 일반적으로, 지방줄기세포 배양액은 미백, 상처치유, 주름개선, 항노화 기능이 있다고 알려져 있으며 최근 의약품 및 화장료로서의 상업적으로 이용가치가 상승하고 있다. 지방줄기세포는 여러 성장인자 및 사이토카인(cytokine)을 생산한다고 알려져 있으며 지방줄기세포가 생산한 물질은 피부 미백, 재생, 항산화에 효과가 있는 물질을 포함하고 있다고 보고되었다.

[0008] 한편, 줄기세포란 특정한 세포로 분화가 진행되지 않은 채 유지되다가, 필요한 경우 신경, 혈액, 연골 등 신체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화할 능력을 가진 세포를 말한다. 이러한 줄기세포를 얻을 수 있는 방법은 크게 두 가지가 있는데, 첫째는 수정란으로부터 발생한 배아로부터 얻는 것(배아줄기세포)이고, 둘째는 성인이 된 우리 몸의 각 부분에 간직되어 있는 줄기세포(성체줄기세포)를 회수하는 것이다. 기능적인 면에서 차이는 있지만 배아줄기세포나 성체줄기세포는 모두 여러 종류의 세포로 분화할 수 있는 특징을 가지고 있다. 배아줄기세포는 분화능력이 매우 뛰어나고 텔로머가 긴 장점이 있으나, 윤리적인 문제를 안고 있고 세포를 다량획득하는 것이 어려운 단점이 있는 반면, 성체줄기세포는 세포수를 많이 얻을 수 있으나 타인에게 이식할 때 감염의 위험이나 분화능력이 상대적으로 떨어지는 단점을 가지고 있다.

[0009] 상기한 단점에도 불구하고 성체줄기세포는 의학적으로 적용하기에 대단히 안전한 것이 특징이다. 또한 지방유래줄기세포는 흡입지방으로부터 쉽게 수득할 수 있어 윤리문제가 없으며 수득이 용이하다는 장점이 있다.

[0010] 지방에서 유래된 줄기세포(Primary ADSC)는 상업적으로 활용가치가 높으나, 느린 성장속도와 짧은 수명으로 인해서 줄기세포배양액의 대량생산이 용이하지 않다는 커다란 단점을 지니고 있다.

[0011] 상기한 단점을 극복하기 위해서, 본 발명자들은 시미안 바이러스(Simian virus; SV40)의 T 항원을 주입한 ADSC(Adipose-derived stem cell)-T 세포주(cell line)를 제작하였다. 상기 세포주는 제 1차(primary) ADSC 세포주와 비교하여 3배 증가한 증식속도 및 세포수명이 약 50배 정도 증가하였다. 따라서, 본 발명은 ADSC-T 세포주의 제작을 통해 제 1차 ADSC 세포주가 가지고 있던 배양액의 대량생산에 있어서의 한계점을 보완한 것이다.

[0012] 이에 본 발명자는 상기와 같은 피부재생, 미백, 항산화 및 상처치료에 있어서의 문제점을 해결하기 위한 연구를 수행한 결과, 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T(adipose-derived stem cell-T) 세포주를 확립하고, ADSC-T 세포 배양액의 피부재생, 미백, 항산화 및 상처 치료 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 피부재생용, 미백용, 항산화용 화장료 조성물 또는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 상처치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 피부재생용, 미백용, 항산화용 화장료 조성물 또는 식품 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 상처치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 지방유래줄기 세포주(ADSC-T)의 배양액은 콜라겐 배양에서 콜라겐의 탄력증가 및 창상수축효과

를 가지고 있어 피부재생에 우수한 효과를 보이고, 타이로시네이즈 활성 및 멜라닌 생산을 저해함으로써 피부 미백에 훌륭한 효과를 보이고, DPPH 라디칼 활성을 저해함으로써 항산화 효과에 탁월하며, 나아가 섬유아세포의 세포 이동성을 증가시킴으로써 상처 치료에 현저한 효과를 가지고 있으므로, 피부재생, 미백, 항산화 또는 상처 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1A는 흡입지방조직으로부터 분리한 모든 세포를 플레이트에 도말한 후 현미경으로 관찰한 도이며, 도 1B는 부유세포를 제거한 후 플레이트에 부착된 세포만을 계대 배양한 후 현미경으로 관찰한 도이다(각 x100 확대).

도 2는 지방유래 줄기세포(ADSC)가 지방세포로 분화되었는지 Oil-Red O로 염색한 결과를 나타낸 도이다 [지방유래 줄기세포의 분화유도 전(A), 분화유도 30일 후(B), 분화유도 30일 후 Oil-Red O로 염색한 결과(C)].

도 3은 ADSC-T 세포의 형태학적 변화를 현미경으로 관찰한 도이다[일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)(A), pEF321β-T 플라스미드의 도입에 의해 형성된 지방유래 줄기세포의 고밀도 세포 군집(high-density focus)(B, C), 고밀도 세포 군집에서 얻은 세포를 배양하여 확립한 ADSC-T 세포(D)](각 x100 확대).

도 4는 ADSC-T 및 대조군으로 사용한 COS-1 세포 내에 발현된 SV40 T 항원을 형광항체 염색법으로 관찰한 도이다.

도 5는 T 항원의 단일클론항체(monoclonal antibody)를 이용하여 ADSC-T 세포의 T 항원의 웨스턴 블로팅(western blotting) 분석 결과를 나타낸 도이다[일차 지방유래 줄기세포(A), ADSC-T(B, C, D), COS-1(E)].

도 6은 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)와 ADSC-T 의 3개 세포(ADSC-T-1, ADSC-T-2, ADSC-T-3)의 증식 속도를 나타낸 도이다.

도 7은 콜라겐 젤에서의 3Y1 세포의 세포 형태(morphology)를 나타낸 도이다. 3Y1 세포를 콜라겐 젤 상에서 ADSC-T 또는 ADSC의 CM을 50% 함유하는 배지로, 각각 표시된 시간 동안 배양했다.

도 8은 FPCL(Fibroblast-populated collagen lattice) 모델 상에서의 ADSC-T-CM의 수축 효과를 나타낸 도이다. 3Y1 세포를 콜라겐 젤 상에서 ADSC-T 또는 ADSC의 50% 배양액(CM)을 이용하여 8일 동안 배양하여, 콜라겐 면적을 계산하였다.

도 9는 섬유아세포(fibroblast)의 이동성에 대한 ADSC-T 및 ADSC 배양액의 효과를 나타낸 도이다. A는 각각의 배양액 처리후 48시간의 3Y1 세포의 이동성을 나타낸 것이고, B는 시간당 세포 이동 거리를 나타낸 그래프이다(수치 = 평균 ± 표준편차, n=0.3)[*p < 0.05]

도 10은 배양액(CM; culture medium) 처리 후 3Y1 세포에 의한 콜라겐 생산을 나타낸 도이다. 세포를 ADSC-T, ADSC 및 3Y1 세포 자체의 50% CM을 이용하여 5일 동안 배양하였다. 3Y1 세포의 세포 용해물(lysate) 및 배양 배지를 콜라겐 타입 I의 웨스턴 블로팅을 위해 이용하였다.

도 11은 ADSC-T 또는 ADSC의 CM으로 처리 후의 B16F10의 세포 펠렛을 나타낸 도이다. 세포를 각각 표시된 시간 동안 배양한 후 수득한 다음, 원심분리한 세포 펠렛을 디지털 카메라 사진으로 나타내었다.

도 12는 B16F10 세포에서 멜라닌 함량에 대한 ADSC-T-CM 또는 ADSC CM의 효과를 나타낸 도이다. 세포(A) 및 배지(B)에서의 멜라닌 함량을 분광광도계로 492nm에서 측정하였다(수치 = 평균값 ± 표준편차, n = 3)[*P < 0.05]

도 13은 B16F10 세포에서의 ADSC-T-CM 및 ADSC CM의 타이로시네이즈 활성에 대한 효과를 나타낸 도이다. B16F10 세포를 ADSC-T, ADSC의 50% CM을 포함하는 배지를 이용하여 배양하였고, 48 시간 후 세포 용해물로 타이로시네이즈 활성을 측정했다(수치 = 평균 ± 표준편차, n =3). [*P < 0.05]

도 14는 ADSC-T CM의 DPPH 자유 라디칼 소거능(free radical scavenging activity)을 나타낸 도이다. ADSC-T CM 및 0.13mM의 DPPH를 동량의 부피로 혼합하고 자유 라디칼 소거능을 각각 표시된 시간 동안 반응한 후 OD 515nm에서 측정하였다(수치 = 평균 ± 표준편차, n =3). [*P < 0.05]

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 시미안 바이러스(Simian virus; SV40)의 T 항원을 지방유래줄기세포에 주입하여 제작된 ADSC-T(adipose-derived stem cell) 세포주의 배양액을 유효성분으로 포함하는 피부재생용, 미백용, 항산화용 또는 상처 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0020] 상기 조성물은 화장료 조성물, 식품 조성물 또는 약학적 조성물을 포함한다.

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명자들은 SV40의 T 항원의 발현이 여러 가지 세포의 수명을 연장시킨다는 것에 기초하여, 흡입지방으로부터 줄기세포(Adipose-Derived Stem Cells, ADSC)를 분리하고, 분리한 지방유래 줄기세포의 증식속도를 증가시키고 증식수명을 연장하기 위하여 SV40의 T 항원을 발현하는 벡터를 도입하면 지방유래 줄기세포의 수명이 연장될 것이라고 예상하였다. 이를 확인하기 위하여 SV40의 T 항원을 발현하는 벡터인 pEF321β-T 플라스미드를 지방유래 줄기세포에 도입하였고 그 결과, SV40의 T 항원을 발현하는 지방유래 줄기세포의 수명이 연장되고, 증식속도가 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0023] 본 발명에 있어서 “시미안 바이러스(Simian Virus 40; SV40)”는 폴리오마 바이러스 과, 폴리오마 바이러스 속, 시미안 바이러스40 종에 속하는 바이러스로서, 5245개의 염기로 이루어지는 고리형 이중가닥 유전체를 가지며, 숙주범위가 넓어 여러 가지 세포의 형질전환 벡터로서 사용된다.

[0024] 상기 SV40의 “T 항원”은 종양을 유발하는 바이러스인 SV40의 감염초기에 합성되는 초기 단백질로서, 감염세포의 종양화에 기여하는 단백질이다. T 항원은 세포의 형질전환시, 세포측의 암억제 유전자산물(p53 등)과 결합하여 그 활성을 억제하는 작용이 있어 여러 가지 세포의 불멸화(immortalization)에 응용된다.

[0025] 본 발명의 조성물에서 유효성분인 ADSC-T세포의 배양액은,

[0026] (a) 흡입지방조직에 콜라게나아제 효소를 처리한 후 원심분리하여 지방유래 줄기세포를 분리하여 배양하는 단계;

[0027] (b) 플라스미드 발현 벡터(pEF321β-T)를 상기 (a) 단계에서 배양한 지방유래 줄기세포에 형질 감염시켜 SV40 T 항원을 발현하는 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 제조하는 단계; 및

[0028] (c) 상기 제조된 ADSC-T세포를 배양하여 배양액을 수득하는 단계;를 포함하여 제조될 수 있다.

[0029] 본 발명의 ADSC-T 세포 배양액의 제조방법을 단계별로 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0030] 상기 (a)단계는 흡입지방조직으로부터 지방유래 줄기세포를 분리하여 배양하는 단계로, 먼저 흡입지방조직에 콜라게나아제 효소를 1:1의 중량비로 혼합한 후 30~40℃에서 40~50분 동안 처리한 다음, 원심분리하여 지방유래 줄기세포를 분리한다.

[0031] 상기 “콜라게나아제 효소”는 콜라겐의 가수분해를 촉진하는 효소로서, 지방조직의 콜라겐을 분해하여 지방줄기세포를 각각 분리시키는 역할을 한다. 상기 원심분리는 2~5분간 500~1000G에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 3분간 800G에서 수행되어, 상등액에 부유된 지질과 지방세포층을 제거한 후 여과기를 이용하여 세포성 잔사를 제거한다. 상기 여과기는 100㎛ 여과기가 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 세포성 잔사를 제거한 후, 생리식염수를 넣고 원심분리를 반복하여 세포를 세척한다. 상기 원심분리는 2~5분간 150~500G에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 300G에서 3분 동안 수행될 수 있다.

[0033] 상기 분리된 지방유래 줄기세포(ADSC)를 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100units/ml 페니실린과 100㎍/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media) 배지에서 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하며, 세포의 밀도(confluence)가 80-90%가 되면 계대 배양한다. 상기 배양법은 당업계에 공지된 세포배양방법을 응용할 수 있다.

[0034] 상기 (b)단계는 SV40 T 항원을 발현하는 지방유래 줄기세포(ADSC-T)를 제조하는 단계로, 플라스미드 발현 벡터(pEF321β-T)를 상기 (a) 단계에서 분리한 지방유래 줄기세포에 형질 감염시켜 SV40 T 항원을 발현하는 ADSC-T세포를 얻는다.

[0035] 상기 “벡터”는 DNA 재조합 실험에 있어서, 목적하는 DNA 단편을 숙주세포 등에 도입시킬 수 있는 DNA로서, 벡터 DNA는 제한효소 등으로 절단, 개환하여 여기에 목적으로 하는 DNA 단편을 삽입하여 연결하고 숙주세포에 도입시킬 수 있다. 목적 DNA 단편을 연결한 벡터 DNA는 숙주세포의 염색체 DNA에 삽입되어 숙주의 분열과

더불어 각 세포로 분배되어 목적 DNA 단편을 대대로 유지하며 이어져 나간다.

[0036] 상기 플라스미드 발현 벡터 "pEF321β-T"는 SV40의 T 항원을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 플라스미드를 의미한다.

[0037] 상기 "형질 감염"은 유전자 DNA, 플라스미드 DNA, 바이러스 DNA·RNA 등을 세포의 배양액 또는 세포의 현탁액을 통해 세포에 주입하여 유전자 도입 및 감염을 유발시키는 것을 의미한다. 구체적으로, 상기 발현 벡터의 형질 감염은 당업계에 공지되어 있는 인산화칼슘 (calcium phosphate) 형질 감염, 전기천공법 (electroporation), 미세주입법 (microinjection) 그리고 리포솜 주입법(liposome injection)등을 포함한 이용 가능한 모든 형질 감염 방법을 사용할 수 있다. 또한 바이러스나 박테리아를 운반자로 사용하여 진핵세포에 DNA를 도입할 수도 있다.

[0038] 예를 들어, 상기 pEF321β-T 플라스미드를 전기천공법으로 도입하는 방법은 지방유래 줄기세포를 무혈청 배지, 바람직하게는 무혈청 DMEM내에서 플라스미드와 혼합하고 전기충격을 주는 방법을 이용할 수 있으나, 이에 한정되지는 아니하며, 당업계에 알려진 전기천공 프로토콜을 사용하여 플라스미드를 도입할 수 있다.

[0039] 외래 유전자를 도입한 세포는 일정시간 배양을 통하여 도입된 유전자의 발현을 유도하고 발현 여부를 검증해보아야 한다. 도입 유전자의 발현을 위한 배양은 바람직하게는 37℃에서 5% CO_2 배양기에 배양하는 것이나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 도입된 유전자는 SV40의 T 항원을 발현하는 유전자로서, T 항원의 발현여부는 상기 T 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 항원-항체 결합 반응을 통해 지방유래 줄기세포내 발현된 T 항원을 검출함으로서 검증할 수 있다. 구체적으로는, 통상의 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(Radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법, 면역조직화학염색법, 항원-항체 응집법 등을 이용하여 검증할 수 있고, 웨스턴 블로팅 및 형광항체염색법으로 T 항원의 발현여부를 검증할 수 있다.

[0040] 상기 (c)단계는 ADSC-T 세포를 배양하여 배양액을 수득하는 단계로, ADSC-T 세포를 각 $1x10^5$ cell/ml로 배양하는 단계; 세포의 밀도가 80%가 되고나서 계대 배양하는 단계; 및 세포의 밀도가 70~90%가 되고난 뒤 2일 후 배양액을 수거하는 단계에 의해 제조된다.

[0041] 상기 방법에 의해 제조된 배양액을 원심분리하여 세포의 잔사를 제거하고 상등액만 수득한다. 상기 원심분리는 500~1000G에서 2~5분간, 바람직하게는 800G에 3분간 원심 분리한다.

[0042] 상기 ADSC-T 세포 배양액을 위한 배지는 당업계에 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 아니다. 또한, 상기 세포 배양 배지에는 필요에 따라 한 가지 이상의 보조성분을 첨가할 수 있는데, 이러한 보조성분으로는 태아 송아지, 말 또는 사람 등의 혈청을 비롯하여, 미생물의 오염을 막기 위한 페니실린 G (Penicillin G), 스트렙토마이신 설페이트 (streptomycin sulfate) 및 젠타마이신 (gentamycin) 등의 항생제, 암포테리신 B (amphotericin B) 및 니스타틴 (nystatin) 등의 항진균제 (antifungal agent) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 성분 중 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0043] 상기 방법에 의해 제조된 본 발명의 ADSC-T 세포의 배양액은 콜라겐 배양에서 콜라겐의 탄력증가 및 창상수축효과를 가지고 있어 피부재생에 우수한 효과를 보이고, 또한 타이로시네이즈 활성 및 멜라닌 생산을 저해함으로써 피부 미백에 훌륭한 효과를 보이고, DPPH 라디칼 활성을 저해함으로써 항산화 효과에 탁월하며, 나아가 섬유아세포의 세포 이동성을 증가시킴으로써 상처 치료에 현저한 효과를 가지고 있으므로, 피부재생, 미백, 항산화 또는 상처치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 액제, 현탁액, 에멀젼, 로션제, 연고제 등의 경피투여용 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline), 정제수, 멸균수 등의 수성 희석제 혹은 용제를 포함하며, 프로필렌글리콜(propylene glycol), 올리브 오일 등의 비수성 희석제 혹은 용제를 포함한다. 또한, 필요에 따라 습윤제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 함유되는 ADSC-T 세포 배양액은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선

택될 수 있다. 예를 들면, 상기 ADSC-T 세포 배양액의 일일 투여량은 1일 0.01~100mg/kg, 바람직하게는 0.1~10mg/kg으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0045] 상기 담체(들)은 수용자에게 유해하지 않고 제제의 다른 성분과 상용성 면에서 "허용되는" 것이어야 한다. 이러한 관점에서, 약학적으로 허용되는 담체는 임의약학 투여에 적합한, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아 및 항진균 활성제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함하고자 한다. 약학적으로 활성있는 물질을 위한 그러한 매질 및 활성제의 사용은 당분야에 공지이다. 임의의 통상적 매질 또는 활성제는 활성 화합물과 상용적이지 않은 것을 제외하고, 조성물에서의 그 용도가 고려된다. 보조적인 활성 화합물(당분야에 공지 및/또는 본 발명에 따라 동정 또는 디자인됨)이 또한 조성물에 도입될 수 있다. 제제는 편리하게 단위 제형으로 존재할 수 있고 제약/미생물학 분야에서 잘 알려진 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 대체로, 일부 제제는 화합물을 액체 담체 또는 미분 고체 담체 또는 둘 모두와 혼합하고, 이후 필요하면 적합한 제제로 그 생성물을 성형시켜 제조된다.

[0046] 본 발명의 약학 조성물은 그 목적 투여 경로에 적합하도록 제제화되어야 한다. 투여 경로는 경구, 귀, 눈, 코, 또는 비경구, 예를 들면 정맥내, 피부내, 흡입, 경피(국소), 경점막, 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피부내, 또는 피하 적용을 위해 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음의 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용 물, 염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌글리콜, 글리세린, 프로필렌글리콜 또는 다른 합성 용매; 항박테리아제 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이팅제 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장력조절제 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스, pH는 산이나 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨으로 조정될 수 있다.

[0047] 경구 또는 비경구 투여에 유용한 용액은 제약 분야에 공지된 임의의 방법을 통해 제조될 수 있으며, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., (1990)]에 기술된 것을 참조한다. 비경구 투여용 제제는 또한 구강 투여용 글리코콜레이트, 직장 투여용 메톡시살리실레이트, 또는 질 투여용 시트르산을 포함할 수 있다. 비경구 조제물은 앰플, 1회용 시린지 또는 유리나 플라스틱으로 제조된 복수 용량 바이알에 동봉될 수 있다. 직장 투여용 좌제는 또한 약물을 비자극성 부형제 예컨대 코코아 버터, 다른 글리세리드, 또는 실온에서는 고체이고 체온에서는 액체인 다른 조성물과 혼합하여 제조될 수 있다. 제제는 또한 예를 들면 폴리알킬렌글리콜 예컨대 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 및 수소화 나프탈렌을 포함할 수 있다. 직접 투여용 제제는 글리세롤 및 다른 고점도 조성물을 포함할 수 있다. 이러한 약물에 유용할 수 있는 다른 비경구 담체에는 에틸렌비닐 아세테이트 공중합체 입자, 삼투압 펌프, 이식성 주입계, 및 리포좀이 포함된다. 흡입 투여용 제제는 부형제로서, 예를 들면 락토오스를 함유할 수 있거나, 또는 예를 들면 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 글리코콜레이트 및 데옥시콜레이트를 함유하는 수용액, 또는 점비액 형태로 투여되는 유성액, 또는 코내에 적용되는 겔일 수 있다. 직장 전달을 위해 정체 관장이 또한 사용될 수 있다.

[0048] 경구 투여에 적합한 본 발명의 제제는 각각 사전결정된 약물의 양을 함유하는, 개별 단위 예컨대 캡슐, 젤라틴 캡슐, 샤세, 정제, 트로키, 또는 로젠지; 분말 또는 과립 조성물; 수성액 또는 비수성액 중 용액 또는 현탁액; 또는 수중유 에멀션 또는 유중수 에멀션 형태일 수 있다. 약물은 또한 볼러스, 연약 또는 페이스트 형태로 투여될 수 있다. 정제는 경우에 따라 1 이상의 보조 성분과 함께 약물을 압착 또는 몰딩시켜 제조될 수 있다. 압착 정제는 적절한 기계에서, 경우에 따라 결합제, 윤활제, 불활성 희석제, 표면 활성 또는 분산제와 혼합된, 자유 유동 형태, 예컨대 분말 또는 과립 형태의 약물을 압착시켜 제조될 수 있다. 몰딩된 정제는 적절한 기계에서, 불활성 액체 희석제로 습윤시킨 적절한 담체 및 분말화 약물의 혼합물을 몰딩시켜 제조될 수 있다.

[0049] 경구 조성물은 대체로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 경구 치료 투여 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 도입될 수 있다. 구강청결제로서 사용하기 위한 유체 담체를 이용해 제조된 경구 조성물은 유체 담체 중 화합물을 포함하고 경구에 적용되어 휙소리를 내고 뱉어내거나 또는 삼켜지게 된다. 약학적으로 적합한 결합제, 및/또는 보강제 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 알약, 캡슐, 트로키 등은 임의의 이하 성분, 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정 셀룰로스, 검 트라가칸트 또는 젤라틴; 부형제 예컨대 전분 또는 락토스; 붕해제 예컨대 알긴산, 프리모겔, 또는 옥수수전분; 윤활제 예컨대 스테아르산마그네슘 또는 스테로테스; 유동화제 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 풍미제 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 유기 풍미제.

[0050] 주사용으로 적합한 약학 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적절한 담체는 생리적 염수, 정세균성

물, Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, NJ) 또는 인산 완충 염수(PBS)를 포함한다. 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하고 미생물 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 및 액상 폴리에틸렌글리콜), 및 이의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면, 코팅 예컨대 레시틴을 사용하는 것에 의해, 분산물의 경우에는 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지된다. 많은 경우, 등장화제, 예컨대 당, 다가알콜 예컨대 만니톨, 솔비톨 또는 염화나트륨이 조성물에 포함되는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 활성제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 첨가시킴으로서 이루어질 수 있다.

[0051] 멸균 주사용액은 상기 열거된 성분 중 1 또는 그 조합과 적절한 용매 중 필요량의 활성 화합물을 도입하고, 필요한 경우 여과 멸균을 후속하여 제조될 수 있다. 대체로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 성분 중에서 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 도입하여 제조된다. 멸균 주사용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 이전에 멸균여과된 그 용액으로부터 임의 추가적인 목적 성분이 더해진 활성 성분의 분말이 생성되는 진공 건조법 및 냉동 건조법을 포함한다.

[0052] 관절내 투여에 적합한 제제는 미세결정형, 예를 들면 수성 미세결정 현탁액 형태일 수 있는 약물의 멸균 수성 조제물 형태일 수 있다. 리포좀 제제 또는 생분해성 중합체 시스템이 또한 관절 내 및 눈 투여 둘 모두를 위한 약물을 준비하는데 사용될 수 있다.

[0053] 눈 치료를 포함하여, 국소 투여에 적합한 제제는 액체 또는 반액체 조제물 예컨대 도찰제, 로션, 겔, 도포제, 수중유 또는 유중수 에멀션 예컨대 크림, 연고 또는 페이스트; 또는 용액 또는 현탁액 예컨대 점적액을 포함한다. 피부 표면에 국소 투여를 위한 제제는 약물을 피부학적으로 허용되는 담체 예컨대 로션, 크림, 연고 또는 비누로 분산시켜 제조된다. 국소 도포하고 제거를 억제하기 위해 피부 상에 막이나 층을 형성할 수 있는 담체가 특히 유용하다. 내부 조직 표면에 국소 도포를 위해, 활성제는 액체 조직 접착제 또는 조직 표면에 접착을 강화시키는 것으로 알려진 다른 물질에 분산될 수 있다. 예를 들면, 히드록시프로필셀룰로스 또는 피브리노겐/트롬빈 용액을 사용하는 것이 유리하다. 대안적으로, 조직 코팅 용액, 예컨대 펙틴-함유 제제가 사용될 수 있다.

[0054] 흡입 치료를 위해, 스프레이로 분배되는 분말 흡입(자가추진 또는 스프레이 제제)은 네뷸라이저이거나 또는 오토마이저가 사용될 수 있다. 이러한 제제는 분말 흡입 장치 또는 자가 추진 분말-분배 제제로부터 폐 투여를 위한 미분 형태일 수 있다. 자가 추진 용액 및 스프레이 제제의 경우, 원하는 스프레이 특징(즉, 원하는 입자 크기를 갖는 스프레이를 생성할 수 있는 특징)을 갖는 밸브의 선택에 의해 또는 제어된 입자 크기의 현탁 분말로서 활성 성분을 유입시켜서 그 효과를 달성할 수 있다. 흡입 투여를 위해, 화합물은 또한 적절한 추진제, 예를 들면 가스 예컨애 이산화탄소를 함유하는 가압 용기 또는 분배기, 또는 네뷸라이저로부터의 에어로졸 스프레이 형태로 전달될 수 있다.

[0055] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의해 이루어질 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 투과하려는 장벽에 적합한 침투제가 제제에 사용된다. 그러한 침투제는 대체로 당분야에 공지이며, 예를 들면, 경점막 투여를 위해, 세제 및 담즙산염이 포함된다. 경점막 투여는 코 스프레이 또는 좌제의 사용을 통해 수행될 수 있다. 경피 투여를 위해, 활성 화합물은 대체로 당분야에서 공지된 바와 같이 연고, 셀브, 젤 또는 크림으로 제제화된다.

[0056] 본 발명의 식품 조성물에 포함되는 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸컬릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0057] 상기 식품 조성물은 건강 음료 조성물을 포함할 수 있고, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 슈크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 상기 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell)의 배양액 100g당 일반적

으로 0.01 내지 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 내지 0.03 g이다.

[0058] 상기 화장료 조성물은 본 발명의 ADSC-T 세포 배양액을 사용하여 통상의 화장료 제조방법에 따라, 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 화장료 조성물은 상기 배양액을 함유하는 향장 제품, 샴푸, 헤어로션, 헤어크림, 헤어 젤 등의 형태로 제조될 수 있으며, 이는 통상의 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석되어 사용될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 화장료 조성물 분야에서 통상적으로 사용되는 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다. 상기 화장료 조성물에 있어서, 상기 배양액의 함량은 피부재생, 미백 및 항산화의 효과를 달성하기에 유효한 양, 예를 들면, 조성물 총 중량에 대하여 0.001~10 중량%로 함유될 수 있고, 바람직하게는 약 0.01~1 중량%로 함유될 수 있다.

[0059] 본 발명의 실시예에서 실험 데이터의 통계처리를 위해, SPSS 20 프로그램을 사용하여 실험군과 대조군의 평균의 차이를 mann-whitney u test를 수행하여 $P < 0.05$일 때 유의하다고 하였다.

[0060] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0061] **[제조예 1] 지방유래줄기세포에 T항원을 도입한 ADSC-T 세포(adipose-derived stem cell-T cell) 배양액의 제조**

[0062] **1. 지방조직으로부터 지방유래 줄기세포(Adipose-Derived Stem Cell)의 분리 및 배양**

[0063] 지방유래 줄기세포(ADSC)의 분리는 성형외과에서 지방흡입술을 시행한 환자에게 동의를 구한 후, 채취한 지방조직에서 지방유래 줄기세포(ADSC)를 추출하였다. 구체적으로는, 분리된 지방조직을 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후 0.075% 콜라게나아제(sigma)와 1:1의 중량비로 혼합하여 37℃에서 45분 동안 처리하였다. 효소 처리 후, 800G에서 5분 동안 원심 분리하여, 상등액에 부유된 지질과 지방세포 층을 제거한 후 100㎛ 여과기로 여과하여 세포성 잔사를 제거하였다. 여과액에 생리식염수를 가한 후 300G에서 3분 동안 원심분리하여 2-3번 정도 세포를 세척하여 지방유래 줄기세포(ADSC)를 얻었다.

[0064] 수득한 지방유래 줄기세포(ADSC)를 10% FBS(Fetal bovine Serum), 100units/ml 페니실린과 100㎍/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media)배지에서 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 분리된 지방유래 줄기세포(ADSC)는 적혈구와 혼합되어 있으며, 이 적혈구를 제거하기 위하여 적혈구 용해 완충용액을 사용하기도 하나 적혈구 용해 완충용액 사용시 지방유래 줄기세포(ADSC)의 수가 감소되는 경향이 있다. 따라서 초기배양시 분리된 지방유래 줄기세포(ADSC) 원상태와 적혈구를 함께 배양하였다. 이러한 이유로 초기배양시 지방유래 줄기세포(ADSC)가 적혈구와 혼합되어 배양되었다(도 1A). 초기 배양 1일 후 지방유래 줄기세포(ADSC)가 플레이트에 다 부착되었을 거라고 판단하고 PBS로 2회 세척하여 부유세포 및 적혈구를 제거하였다. 완전히 제거되지 않은 적혈구는 계대배양 시 트립신 화(trypsinization)에 의해 제거하였다. 세포의 밀도(confluence)가 배양기의 80-90%가 되면 계대 배양하였다.

[0065] 초기 배양 약 2-3일 후 섬유아세포 형태(fibroblast morphology)를 가진 지방유래 줄기세포(ADSC)가 나타남을 확인할 수 있었다. 이후 10cm 플레이트로 계대 배양 후 지방유래 줄기세포(ADSC)의 모양을 관찰하였다. 그 결과 지방유래 줄기세포(ADSC)는 다른 성체줄기세포처럼 섬유아세포와 같은 형태를 나타냄을 알 수 있었다(도 1B).

[0066] **2. 지방유래 줄기세포(ADSC)의 지방세포(adipocyte)로의 분화 능력 확인**

[0067] 상기 지방유래줄기세포의 분리 및 배양 실험에서 수득한 지방유래줄기세포(ADSC)가 지방세포로 분화되는지 확인하기 위해 지방유래 줄기세포(ADSC)를 지방세포 분화 유도 배지를 사용하여 4주간 분화를 유도시킨 후, 지방세포로 분화되었는지를 확인하였다. 지방세포 분화유도 배지는 PromoCell사에서 판매중인 Preadipocyte Differentiation Medium을 사용하였고, 분화된 지방세포의 지방세포 유지배지는 PromoCell사에서 판매중인 Adipocyte Nutrition Medium을 사용하였다. 구체적으로는, 지방유래 줄기세포(ADSC)를 지방세포 분화유도 배지

에서, 3일 간격으로 배지를 교환하면서 10일간 배양하여 분화를 유도하였고, 이후 지방세포 유지 배지로 바꾸어서 20일간 추가로 더 배양하였다. 배양된 세포는 10% 포르말린에 고정시키고 60% Oil-Red O 용액으로 염색하여 세포내 지방소적(lipid droplet)을 시각화하였다. 결과는 도 2에 나타내었다.[지방유래 줄기세포 분화유도 전(A), 분화유도 30일 후(B), 분화유도 30일 후 Oil-Red O 염색 결과(C)].

[0068] 도 2에 나타난 바와 같이, 배양 30일 후 지방유래 줄기세포(ADSC)에서 지방세포 특유의 지방소적이 관찰되어 지방세포로 분화됨을 확인할 수 있었다. 또한, 배양 30일 후 Oil-Red O 염색 결과 지방소적이 붉게 염색되어 지방세포로 분화되었음을 확인할 수 있었으며(C), 분화를 유도하지 않은 세포의 경우 염색이 되지 않은 것을 확인할 수 있었다(A). 따라서, 지방유래 줄기세포(ADSC)가 정상적인 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 보유함을 알 수 있다.

[0069] **3. SV40 T 항원의 발현에 의한 ADSC-T 세포주의 확립 및 특징**

[0070] **(1) 형질 감염(transfection)**

[0071] SV40 T 항원을 지방유래 줄기세포(ADSC)에서 안정적으로 발현시키기 위해 SV40의 T 항원 유전자를 발현시키는 pEF321β-T 플라스미드 DNA를 지방유래 줄기세포(ADSC)에 전기천공 방법으로 도입하였다. 구체적으로는, 20㎍의 상기 플라스미드 벡터 pEF321β-T 와 1x10개의 지방유래 줄기세포를 800㎕의 무혈청 DMEM내에서 혼합하고 0.4㎠의 큐벳에 담아 전기충격을 주었다. 전기충격은 Gene Pluser X cell Electroporation System(BIO-RAD)을 이용하여 160V, 15m/초의 조건으로 실시하였다. 플라스미드 벡터 pEF321β-T가 도입되어 고밀도 세포군집(High density focus)을 형성한 지방유래 줄기세포는 페니실린 캡(penicillin cap)을 씌워 트립신화한 다음 세포를 클로닝한 뒤 24 웰 플레이트에 배양하고 세포가 배양기의 80-90%가 되었을 때 계대 배양하였으며, 이 세포주를 ADSC-T 로 명명하였다. 상기 ADSC-T 세포의 형태학적 변화를 도 3에 나타내었다.

[0072] 도 3A에 나타낸 바와 같이, 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)의 경우 세포의 크기가 크고 긴 섬유아세포(fibroblast)의 형태로 접촉제어(contact inhibition)에 의해 증식이 정지되어 세포 단층(monolayer)을 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 3B 및 3C에 나타난 바와 같이, 일차 지방유래 줄기세포에 pEF321β-T 플라스미드가 도입되어 SV40 T 항원이 발현된 지방유래 줄기세포(ADSC-T)가 접촉제어 받지 않고 세포 단층 위에 세포들이 겹쳐 자라는 현상이 나타나 세포 밀도가 높은 고밀도 세포 군집(high-density focus)을 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 3D에 나타난 바와 같이, ADSC-T 는 세포의 크기가 작아지면서 방추형으로 변화되었음을 알 수 있었다. 이러한 ADSC-T 의 세포 형태 변화는 SV40 T 항원의 발현에 의한 것이라고 추정해 볼 수 있다.

[0073] **(2) ADSC-T 세포의 T 항원 발현 여부-형광항체염색법**

[0074] ADSC-T 세포 내의 T 항원의 발현을 확인하기 위하여, SV40 T 항원에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)와 FITC(Fluorescein isothiocyanate)로 표식된 항-마우스 IgG를 사용하여 형광항체염색을 시행하여 UV 하에서 T 항원의 발현을 관찰하였다. 이때 대조군으로 COS-1 세포를 사용하였으며, COS-1 세포의 경우 SV40 T 항원을 이용하여 만들어진 세포로서 ADSC-T 세포의 SV40 T 항원 발현 유무를 비교 확인할 수 있다.

[0075] 구체적으로는, ADSC-T 세포 및 COS-1 세포를 에탄올과 아세톤을 1:1로 혼합한 용액으로 18분간 고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후, SV40 T 항원에 특이적으로 결합하는 마우스의 단일클론항체와 함께 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척한 후 FITC로 표식된 토끼의 항-마우스 IgG와 함께 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포를 형광 현미경으로 관찰하였다. 상기 실험에 대한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0076] 도 4에 나타난 바와 같이, 고밀도 세포 군집(high-density focus)에서 분리된 ADSC-T 세포가 SV40 T 항원에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)로 염색되어 COS-1 세포와 마찬가지로 T 항원이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] **3. ADSC-T 세포의 웨스턴 블로팅(western blotting)을 이용한 T 항원 발현 확인**

[0078] 3개의 ADSC-T 세포로부터 각각 총 세포추출물(Total cell extract)을 제조하여 웨스턴 블로팅(western blotting)으로 세포 내에 존재하는 SV40 T 항원을 검출하였다. 구체적으로는, 동량의 단백질을 포함하는 각 세

포의 추출물을 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔로 전기영동한 후, 니트로 셀룰로오스막에 옮겼다. SV40 T 항원에 특이적으로 결합하는 마우스의 단일클론항체(IgG)를 결합시킨 후 퍼옥시다제가 접합된 항-마우스 IgG를 사용하여 발색시켰다. 상기 결과를 도 5에 나타내었다.

[0079] 도 5에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블로팅 결과 ADSC-T 의 3개의 세포(B, C, D)에서 양성 대조군인 COS-1(E) 세포처럼 T 항원이 발현됨을 확인할 수 있었으며, 음성 대조군인 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)는 T 항원이 발현되지 않음을 확인하였다(A). 상기 결과로부터, 분리된 ADSC-T 세포주는 T 항원을 안정적으로 발현하고 있었으며, T 항원에 의해 세포증식이 증가되었고, 세포의 형태가 변화되었음을 알 수 있었다.

[0080] **4. SV40 T 항원에 의해 수립된 ADSC-T 세포의 증식속도**

[0081] 시미안 바이러스 40(SV40) T 항원에 의해 확립된 ADSC-T 와 제 1차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)의 세포 증식 속도를 측정하여 비교하였다. 세포배양 시 세포의 밀도가 80%가 되었을 경우 계대배양을 시행하였고, 매 계대마다 세포를 계수하여 세포증식곡선(cell growth curve)을 작성하여 비교하였다. 상기 결과를 도 6에 나타내었다.

[0082] 도 6에 나타난 바와 같이, 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)는 약 6-7일 간격으로 한 번씩 세포분열을 하는 반면, 3개의 ADSC-T 의 세포는 모두 약 2일에 한 번씩 세포분열을 하는 것으로 나타났다. 또한 일차 지방유래 줄기세포(primary ADSC)의 경우 증식 속도가 점점 떨어져 사멸하는 현상을 나타내었지만, ADSC-T 의 경우에는 3개의 세포주간에 약간의 차이는 있었으나 전체적으로 세포의 수명이 길어지고 빠른 증식속도를 나타내었다. 이러한 증식속도 향상은 약 6개월(50 패시지)까지 계속되었고, 이후에는 세포의 증식속도가 떨어지는 양상을 나타내었다.

[0083] **5. ADSC-T 세포 배양액의 제조**

[0084] 본 발명의 세포 배양액을 제조하기 위해, DMEM에 FBS가 10% 함유된 배지로 ADSC-T 및 ADSC 세포를 배양액(Cultrued Medium : CM) 배지로 3일간 배양하였다. 실험에 이용한 배양액의 패시지(passage) 숫자는 ADSC-T는 22 패시지, 제 1차 ADSC 세포는 6 패시지에서 수득한 배양액을 이용하였다.

[0085] **[실시예 1] ADSC-T 세포 배양액의 피부재생(skin regeneration) 및 상처치료(wound healing) 효과 검증**

[0086] **1. 섬유아세포-파플레이티드 콜라겐(fibroblast-populated collagen) 격자 수축 어세이(lattice contraction assay)**

[0087] 콜라겐 용액을 만들기 위하여, 5x DMEM(-NaHCO3)과 멸균 재형성 완충액(Sterile reconstitution Buffer)(2.2g$NaHCO_3$, 0.05N NaOH, 200mM HEPES in 100ml)를 준비하였다. 콜라겐 타입(Collagen type)(Nitta Gelatin,Japan) 7 부피(volume), 5X DMEM 2 부피, Buffer 1 을 얼음 상에서 섞어주었다. 세포를 웰(well)당 1 x 10^5으로 되게 세포수를 맞춘 후 콜라겐 용액에 첨가해 기포가 최대한 적게 나게 섞는다. 6 웰(well)에 웰당 1.5ml씩 분주하여 37℃, 5% CO_2조건에서 30분 동안 배양하였다. 굳어진 콜라겐은 가장자리를 멸균된 주사기로 떼어 주고, 처리할 샘플 배지를 50% 농도로 하여 첨가하였으며, 8일간 배양하여 Image J 프로그램을 이용하여 콜라겐 면적을 구하였다.

[0088] **2. 섬유아세포-파플레이티드 콜라겐 격자(Fibroblast-populated collagen lattice; FPCL) 배양 실험에서 ADSC-T 배양액의 피부수축 효과**

[0089] **콜라겐**은 진피층의 90%를 차지하고 있으며 피부 내 콜라겐 함량은 보습, 탄력과 관련이 있다. 또한 피부에 상처가 났을 때 치유과정은 지혈, 염증, 증식, 창상수축 단계로 이루어지며 창상수축 단계에서 콜라겐의 수축정도는 매우 중요하다. 이러한 과정은 항노화와 창상에 따른 피부조직 복원 과정에서 유사하게 나타난다. 이러한 **항노화(탄력증가) 및 창상수축효과**는 *in vitro*에서 FPCL(Fibroblast-populated collagen lattice)모델을 이용한 배양액으로 확인이 가능하고 본실험에서는 FPCL을 이용하여 줄기세포 배양액을 처리하였을때 콜라겐 수축 정도를 확인하였다. 콜라겐 속에 섬유아세포(3Y1)를 혼합하여 콜라겐을 형성한 후 50% 농도의 줄기세포배

양액이 함유한 배지를 이용하여 배양하였다. 먼저 콜라겐속의 세포를 2일, 5일 및 8일 동안 배양 후 각각 현미경으로 관찰하였다. 상기 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0090] 도 7에 나타낸 바와 같이, 2일 동안의 경우에는 큰 차이점이 없었으나, 2일 후부터는 ADSC-T CM을 처리한 콜라겐 속의 세포가 네트워크를 형성하여 자라는 것을 볼 수 있다. 상기 결과를 도 7에 나타내었다.

[0091] 또한 도 8에 나타낸 바와 같이, 배양 후 8일째 콜라겐의 면적을 측정한 결과 대조군(control) 9.6㎠, ADSC-T 4.3 ㎠, ADSC 10.1㎠으로 나타났으며, 이는 처음 면적 10.4㎠에 비교해 ASDC-T가 2.4배 면적이 감소하였다.

[0092] ADSC-T의 배양액은 상처부위 수축작용이 우수함을 알 수 있었고, **피부재생 및 항노화** 기능성화장품과 상처치료의약품의 원료로 사용가능함을 알 수 있었다. 제 1차 ADSC(6 계대)의 배양액은 대조군과 비교하여 효과를 거의 보이지 않았다.

[0093] **3. 세포 이동거리 확인을 통한 ADSC-T 배양액의 상처치료 효과 분석**

[0094] (1) 상처치유과정을 확인하기 위하여 섬유아세포 3Y1의 이동거리를 확인하였다. 3Y1을 100% 밀집도(confluence)가 되게 배양한 후 멸균된 팁(tip)으로 세포를 그었으며 그 폭은 1600㎛(±100㎛)으로 맞추었다. 그 후 줄기세포 배양액을 첨가하고, 대조군으로는 혈청(serum) 보정을 위해서 줄기세포배양액과 마찬가지로 3Y1 배양액을 만든 후 이를 대조군으로 사용하였다. 24시간, 48시간 간격으로 세포이동거리를 사진으로 촬영 후 Image J 프로그램을 이용하여 그 이동거리를 측정하였다.

[0095] (2) 피부의 탄력, 주름, 상처치유에서 섬유아세포는 가장 중요한 역할을 한다. 이 세포의 이동성은 피부의 탄력증가, 빠른 상처회복 기능을 한다. 줄기세포 배양액의 상처치유효과를 확인하기 위해서 래트(rat) 섬유아세포 3Y1 세포의 이동성을 확인하였다. 3Y1을 100㎜ 플레이트(plate0에 컨플루언트(confluent)로 배양하고 멸균된 팁으로 그은 후, ADSC-T, 제 1차 ADSC 배양액을 50% 농도로 세포에 처리하였으며, 무처리 3Y1을 대조군으로 하였다. 세포의 이동거리는 24시간, 48시간으로 시간대별로 측정하였으며, 48시간의 시점에서 세포의 모습을 촬영하였다. 상기 결과를 도 9에 나타내었다.

[0096] 도 9A에 나타낸 바와 같이, 48시간 시점에서 ADSC-T 배양액을 처리한 세포가 활발히 이동하고 있는 것을 확인하였다.

[0097] 도 9B에 나타낸 바와 같이, 이동거리를 측정한 결과 ADSC-T는 24시간에서 730 ㎛㎜, 48시간에서 1123 ㎛를 이동하였으며, ADSC는 513 ㎛, 857 ㎛를 이동하였다. ADSC-T 세포의 배양액의 상처치료 효과는 제 1차 ADSC의 6 패시지 배양액보다 높게 나타났다.

[0098] 따라서, 본 발명의 ADSC-T 세포의 배양액은 상처치료 효과가 현저하다는 것을 확있했다.

[0099] **4. ADSC-T 배양액의 콜라겐 생산 촉진 효과 확인**

[0100] (1) 세포내 콜라겐 함량과 유리된 콜라겐을 측정하기 위해서, 3Y1 세포에 50%농도의 줄기세포배양액을 처리한 후 5일 동안 배양하였다. 줄기세포 배양액을 PBS로 2회 세척한 후 수거하여 1,100rpm 조건에서 3분간 원심분리하여 상등액을 제거하여 총 용해 완충액(total lysis buffer)(20mM 7.0 Hepes, 25% Glycerol, 450mM NaCl, 0.4mM EDTA, 0.5mM DTT, 프로티에이즈 억제제(protease inhibitor, 1% NP-40)로 현탁(suspension)하였다. 얼음 상에서 1시간 동안 반응시킨 후 12,000rpm, 4℃ 조건에서 15분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 분리한 상등액은 브래드포드(bradford)법을 이용해 단백질을 정량 후 웨스턴 블로팅(western blotting)을 수행하였다.

[0101] 시료 단백질을 8% SDS 폴리아크릴아마이드젤(polyacrylamide gel)에서 전기영동(75V, 2시간)을 수행한 후 Hybond ECl(Amersham) 멤브레인(membrane)에 전기이동(electrotransfer)(90V, 3시간)을 수행한 뒤, 멤브레인을 5% 스킨밀크(skin-milk)로 블로킹(blocking)하였다. 멤브레인을 COL1A2(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) 1차 항체를 이용하여 2시간 동안 상온에서 반응시키고 TBS-T(tris-buffered saline-tween: pH 7.6 Tris-HCl, 137mM NaCl, 0.1% Tween-20)용액으로 3회 세척한 후 퍼옥시데이즈-컨쥬게이트 안티-고트(peroxidase-conjugated anti-Goat) IgG 2차 항체로 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. TBS-T용액으로 3회 세척한 후 화학형광반응(ECL, Enhanced chemiluminescence)으로 발광시킨 후 엑스레이(X-ray) 필름에 감광시킨 후 이를 분석하였다.

[0102] (2) **피부상처회복과정**에서 섬유아세포의 증식 및 이에 의한 콜라겐 생성 증가는 상처회복과정 중에서 중요한 요소이다. 이에 줄기세포배양액을 3Y1세포에 처리하여 무처리군과 비교하여 세포내 콜라겐 단백질 생산 및 세포외 유리된 콜라겐 단백질양을 웨스턴 블로팅(western blotting)으로 확인하였다. 상기 결과를 도 10에 나타내었다.

[0103] 도 10에 나타낸 바와 같이, ADSC-T 배양액을 처리하였을 때 세포내 콜라겐 단백질이 증가한 것을 확인할 수 있다(도 10A). 배지 속에 유리된 콜라겐 또한 무처리군과 비교하여 증가하였음을 알 수 있었다(도 10B). 상기 결과로부터 본 발명의 ADSC-T의 배양액은 섬유아세포의 콜라겐 수축작용 뿐만 아니라 콜라겐 생산도 촉진함으로써 상처치료 및 피부재생을 유도함을 알 수 있었다.

[0104] 따라서, 본 발명의 ADSC-T 배양액은 상처치료제 및 피부재생, 항노화, 주름개선의 기능성 화장품 원료로서의 효과의 현저성을 입증하였다.

[0105] **[실시예 2] ADSC-T 세포 배양액의 미백(skin whitenig) 효과 검증**

[0106] **1. ADSC-T 배양액의 멜라닌(melanin) 생성 저해 효과 확인**

[0107] (1) 멜라닌 측정을 위해서 멜라노마(melanoma) 16F10세포를 100mm 플레이트에 배양하고 50% 농도로 줄기세포배양액을 처리한 후 24시간, 48시간, 72시간의 시간대 별로 배양하였다. 각 시간대 별로 3.5 x 10^6으로 세포수를 맞춘 후 수거하여 PBS로 세척(washing)한 후 1100 rpm의 조건으로 3분동안 원심분리하여 세포 침전물을 수득하였다. 세포 펠렛(pellet)과 배지는 1N NaOH·DMSO 용액을 첨가 후 볼텍싱(vortexing)을 한 후 이들을 80℃에서 1시간 동안 처리하였다. 그 후 492nm 흡광도에서 측정하였으며 멜라닌 함량은 무처리군에 대한 함량으로 나타내었다.

[0108] (2) 마우스 멜라노마(Mouse Melanoma) B16F10 세포에 줄기세포배양액을 처리하여 멜라닌 생성 저해 여부를 확인하였다. B16F10세포를 ADSC-T, ADSC의 배양액이 50% 함유된 배지를 이용하여 배양하였으며, 배양액이 함유되지 않은 DMEM으로 배양한 세포를 무처리 대조군으로 하여 무처리세포에서 생성되는 멜라닌양과 배양액 처리시 생산된 멜라닌양을 비교하였다. 세포와 배지속의 멜라닌양을 24시간, 48시간, 72시간의 시간대별로 측정하였으며 세포를 PBS로 세척한 후 세포를 침전시킨 다음 디지털 카메라로 세포 펠렛(pellet)의 색깔을 확인하였다. 상기 결과를 도 11에 나타내었다.

[0109] 도 11에 나타낸 바와 같이, 48시간에서부터 눈으로 확인이 될 정도로 ADSC-T의 배양액을 처리한 B16F10의 세포침전물에서 멜라닌 생성이 저해되어 세포의 펠렛색이 차이 나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 72시간 동안 배양한 세포는 멜라닌 생산의 차이가 더욱 현저하였다.

[0110] 또한, 3 x 10^5의 B16F10 세포 펠렛을 1N NaOH DMSO를 처리하여 80℃에서 세포를 녹여 그 속의 멜라닌 함량을 492nm에서 측정하였다. 상기 결과를 도 12에 나타내었다.

[0111] 도 12에 나타낸 바와 같이, ADSC-T 배양액을 처리한 후 72시간째의 멜라닌 함량이 무처리군과 비교하여 73%로 감소한 것을 확인하였다(도 12A). B16F10이 세포 밖으로 방출한 멜라닌을 측정하기 위해서, 각각의 시간대별 수거한 배지를 위와 같은 방법으로 측정한 결과 제 1차 ADSC 배양액을 처리한 배지속의 멜라닌 함량은 차이가 없었으며, ADSC-T 배양액을 처리한 배지속의 멜라닌과 비교하였을 때 각각 83.9%, 76.1% 50.5%로 시간이 지날수록 감소함을 확인하였다(도 12B).

[0112] **2. ADSC-T 배양액의 타이로시네이즈(Tyrosinase) 활성 저해 효과 검증**

[0113] (1) B16F10을 배양한 후 50% 줄기세포 배양액을 첨가한 후 48시간과 72시간 동안 배양하였다. 그 후 세포를 PBS 2회 세척하고 1100 rpm에서 8분간 원심분리하여 세포를 수득하였다. 용해 완충액(Lysis buffer)(20mM sodium phosphate, pH 6.8, 1% Trion x-100, 1mM protein inhibiton)을 800㎕ 첨가하여 10초간 5회 볼텍싱을 반복하였다. 12,000 rpm, 4℃ 조건에서 15분동안 원심분리하여 얻어진 배양 상등액을 타이로시네이즈 효소액으로서 사용하였다. 싱기 효소액은 브래드포드(bradford)법을 이용하여 단백질 정량하여 동량을 사용하였다. 타이로시네이즈 활성을 확인하기 위하여 2.5mM L-DOPA(3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine, Sigma-Aldrich), 50mM 인산

염 완충액(phosphate buffer)(pH 6.8) 및 효소액을 첨가하여 37℃에서 20분간 반응시킨 후 475nm에서 흡광도를 측정하였으며 타이로시네이즈 활성은 무처리군에 대한 활성정도로 나타내었다.

[0114] (2) 앞서 멜라닌 생산량이 ADSC-T 배양액을 처리하였을 때 저해되는 효과를 확인하였다. 타이로시네이즈는 멜라닌 생성과정 중에서 가장 중요한 핵심 효소로 멜라닌 형성 첫 번째 과정에서부터 참여하는 효소이다. 그러므로 ADSC-T 배양액의 멜라닌 생성억제작용을 한번 더 확인하기 위하여 ADSC-T배양액에 의한 타이로시네이즈의 활성억제를 검토하였다.

[0115] 타이로시네이즈 효소활성을 측정하기 위해서 B16F10세포에 50% 농도의 배양액을 처리한 후 48시간 후에 세포를 수거하여 용해 완충액을 넣어 세포 속 단백질을 수득하였다. 상기 용액을 타이로시네이즈 활성측정에 사용하였다. 브래드포드(bradford)법을 이용해 타이로시네이즈 단백질을 정량하였고, 같은 양의 단백질을 취해 L-dopa가 도파크롬(dopachrome)이 되는 정도를 흡광도 475nm에서 측정하였다. 상기 결과를 도 13에 나타내었다.

[0116] 상기 도 13에서 나타낸 바와 같이, 무처리 대조군의 타이로시네이즈 활성에 비해 ADSC-T의 배양액은 26.5%, 제 1차 ADSC 배양액은 84.9%로 나타나 ADSC-T 및 ADSC의 배양액은 타이로시네이즈를 저해함을 알 수 있었고 저해효과는 ADSC보다 ADSC-T의 배양액에서 크게 나타났다.

[0117] 따라서, 본 발명의 ADSC-T의 배양액은 타이로시네이즈 활성을 억제하여 멜라닌 합성을 감소시키므로, 미백 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0118] **[실시예 3] ADSC-T 세포 배양액의 DPPH 에세이를 이용한 항산화 효과 검증**

[0119] (1) 줄기세포 배양액의 항산화효과는 DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능으로 확인하였으며 에탄올에 0.13mM DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl,sigma-Aldrich)용액을 제조하여 0.13mM DPPH와 시료를 1:1의 중량비로 혼합시켜 암실에서 10분, 20분간 반응시킨 후 515nm에서 흡광도 감소를 확인하였다.

[0120] DPPH radical scavenging activity(%)= $\frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}}$ X 100

[0121] $Abs_{control}$: 무처리군

[0122] Abs_{sample} : 처리군

[0123] (2) 줄기세포배양액의 항산화 효과를 확인하기 위해서 DPPH 어세이(DPPH assay)를 사용하여 알아보았다. DPPH는 그 자체가 매우 안정한 자유 라디칼로서 515nm에서 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 양성자 라디칼 스캐빈저(Proton-radical scavenger)에 의해 탈색되어 노란색으로 변하여 육안으로 관찰이 가능하다. 0.13mM DPPH용액을 제조한 후 ADSC-T 세포배양액을 처리하였을 때 흡광도 감소를 알아보았다. ADSC-T배양액은 0.13mM DPPH 용액과 1:1 중량비로 섞어주어 10분, 20분간 암실에서 반응시켜 515nm에서 흡광도 감소를 확인하였다. 줄기세포배양액은 DMEM배지에서 생산하는데 DMEM 배지속에는 항산화 작용을 하는 비타민 E가 첨가되어있어 DPPH 라디칼을 소거할 것이라 예상되어 이와 비교하여 실험을 하였다. 상기 결과를 도 14에 나타내었다.

[0124] 도 14에 나타낸 바와 같이, DMEM 배지자체에 의해서도 DPPH 라디칼을 소거하나 배지첨가 후 20분후에는 소거활성이 감소하였다. 이는 배지속의 DPPH 라디칼 소거물질의 양이 미미하다고 볼 수 있다. ADSC-T 배양액의 경우에는 10분 경과 후의 반응부터 DMEM배지보다 소거능이 크며, 20분 동안 반응시켰을 때에는 소거능이 더욱 증가하였으며 DMEM과 비교하여 약 2배 정도 DPPH 라디칼을 저해하였다.

[0125] 따라서, 본 발명의 ADSC-T의 배양액은 현저한 **항산화 효과**를 보인다는 것을 확인하였다.

[0126] 이하 본 발명의 약학적 조성물, 식품 조성물 및 화장품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0127] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**

[0128] **1-1. 산제의 제조**

[0129] ADSC-T 세포의 배양액 20 mg

[0130] 유당 100 mg

[0131] 탈크 10 mg

[0132] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에충진하여산제를 제조한다.

[0133] **1-2. 정제의 제조**

[0134] ADSC-T 세포의 배양액 10 mg

[0135] 옥수수전분 100 mg

[0136] 유당 100 mg

[0137] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0138] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0139] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0140] ADSC-T 세포의 배양액 10 mg

[0141] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0142] 락토오스 14.8 mg

[0143] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0144] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0145] **1-4. 주사제의 제조**

[0146] ADSC-T 세포의 배양액 10 mg

[0147] 만니톨 180 mg

[0148] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0149] $Na_2HPO_4?2H_2O$ 26 mg

[0150] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0151] **1-5. 액제의 제조**

[0152] ADSC-T 세포의 배양액 20 mg

[0153] 이성화당 10 g

[0154] 만니톨 5 g

[0155] 정제수 적량

[0156] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에충진하여 멸균시

켜 액제를 제조한다.

[0157] **제제예 2. 식품 제제의 제조**

[0158] **2-1. 건강식품의 제조**

[0159]	ADSC-T 세포의 배양액	100 mg
[0160]	비타민 혼합물	적량
[0161]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0162]	비타민 E	1.0 mg
[0163]	비타민 B1	0.13 mg
[0164]	비타민 B2	0.15 mg
[0165]	비타민 B6	0.5 mg
[0166]	비타민 B12	0.2 μg
[0167]	비타민 C	10 mg
[0168]	비오틴	10 μg
[0169]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0170]	엽산	50 μg
[0171]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0172]	무기질 혼합물	적량
[0173]	황산제1철	1.75 mg
[0174]	산화아연	0.82 mg
[0175]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0176]	제1인산칼륨	15 mg
[0177]	제2인산칼슘	55 mg
[0178]	구연산칼륨	90 mg
[0179]	탄산칼슘	100 mg
[0180]	염화마그네슘	24.8 mg

[0181] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0182] **2-2. 건강음료의 제조**

[0183]	ADSC-T 세포의 배양액	100 mg
[0184]	비타민 C	15 g
[0185]	비타민 E(분말)	100 g
[0186]	젖산철	19.75 g
[0187]	산화아연	3.5 g

[0188] 니코틴산아미드 3.5 g

[0189] 비타민 A 0.2 g

[0190] 비타민 B1 0.25 g

[0191] 비타민 B2 0.3g

[0192] 물 정량

[0193] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0194] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0195] **제제예 3 : 화장료 제제의 제조**

[0196] **1. 유연 화장수**

[0197] ADSC-T 세포의 배양액 0.5 중량%

[0198] 글리세린 5.0 중량%

[0199] 1,3-부틸렌글리콜 3.0 중량%

[0200] 에탄올 5.0 중량%

[0201] 폴리옥시에틸렌노닐페닐에테르 0.5 중량%

[0202] 향료 적량

[0203] 방부제 적량

[0204] 정제수 잔량

[0205] **2. 수렴 화장수**

[0206] ADSC-T 세포의 배양액 0.5 중량%

[0207] 글리세린 3.0 중량%

[0208] 구연산 0.1 중량%

[0209] 에탄올 10.0 중량%

[0210] 폴리옥시에틸렌올레일에테르 1.0 중량%

[0211] 소르비톨 2.0 중량%

[0212] 향료 적량

[0213] 방부제 적량

[0214] 정제수 잔량

[0215] **3. 로션(에멀젼)**

[0216] ADSC-T 세포의 배양액 0.5 중량%

[0217] 글리세린 3.0 중량%

[0218] 1,3-부틸렌글리콜 8.0 중량%

[0219] 스쿠알란 10.0 중량%

[0220] 모노올레인산폴리옥시에틸렌소르비탄 2.0 중량%

[0221] 트리에탄올아민 1.5 중량%

[0222] 글리세릴스테아레이트 0.5 중량%

[0223] 스테아릴글리시레티네이트 0.2 중량%

[0224] 카르복시비닐폴리머 0.1 중량%

[0225] 아르기닌 0.1 중량%

[0226] 향료 적량

[0227] 방부제 적량

[0228] 정제수 잔량

[0229] **4. 크림**

[0230] ADSC-T 세포의 배양액 0.5 중량%

[0231] 글리세린 3.0 중량%

[0232] 스테아린산 8.0 중량%

[0233] 스쿠알란 5.0 중량%

[0234] 자기유화형 모노스테아린산 글리세린 2.5 중량%

[0235] 모노스테아린산 폴리옥시에틸렌 소르비탄 1.5 중량%

[0236] 프로필렌 글리콜 4.0 중량%

[0237] 스테아릴글리시레티네이트 0.2 중량%

[0238] 바셀린 2.0 중량%

[0239] 산화방지제 적량

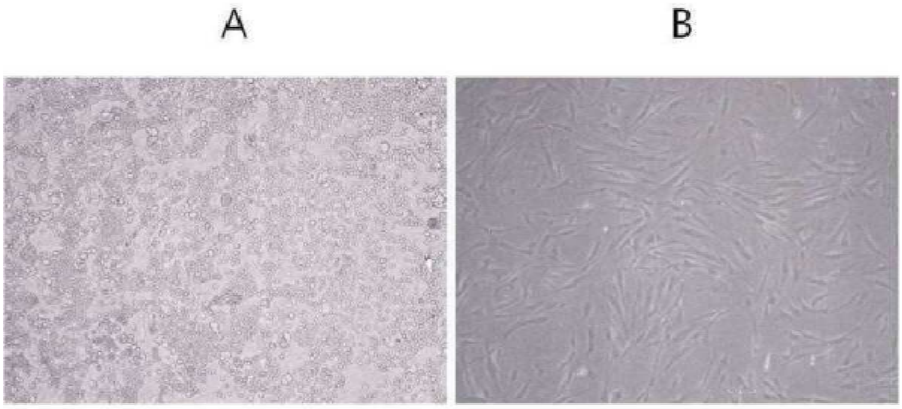
[0240] 향료 적량

[0241] 방부제 적량

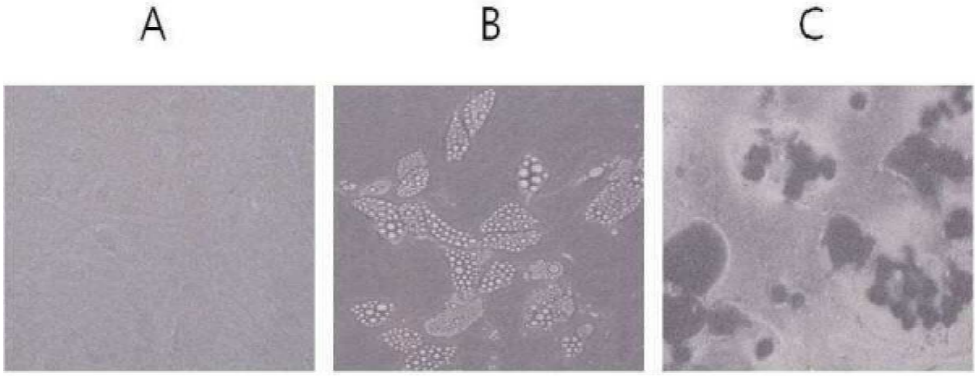
[0242] 정제수 잔량

도면

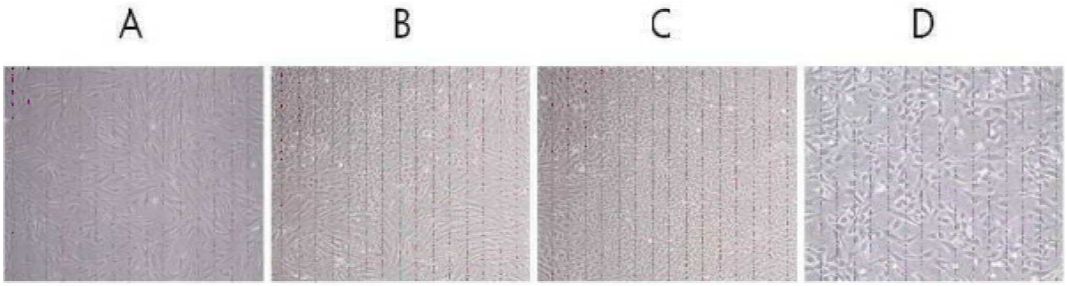
도면1



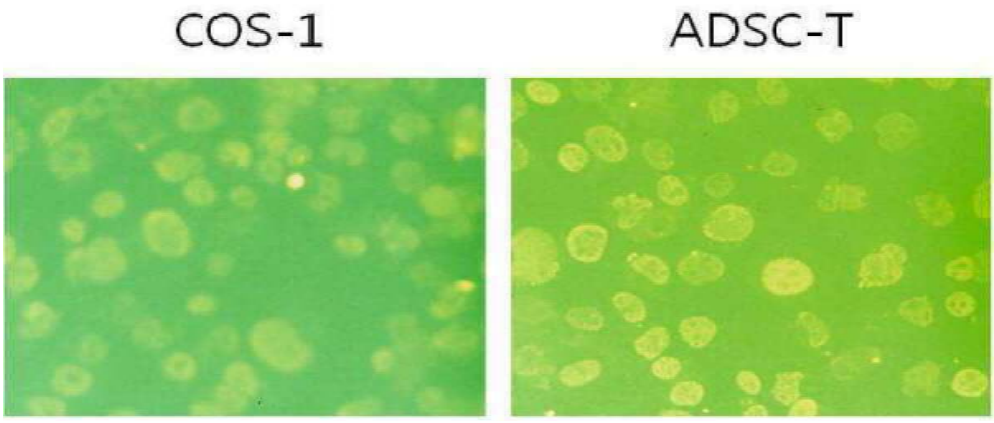
도면2



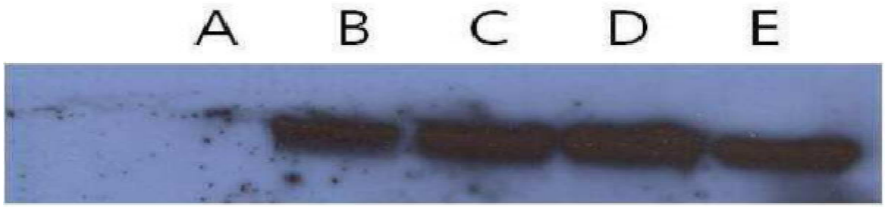
도면3



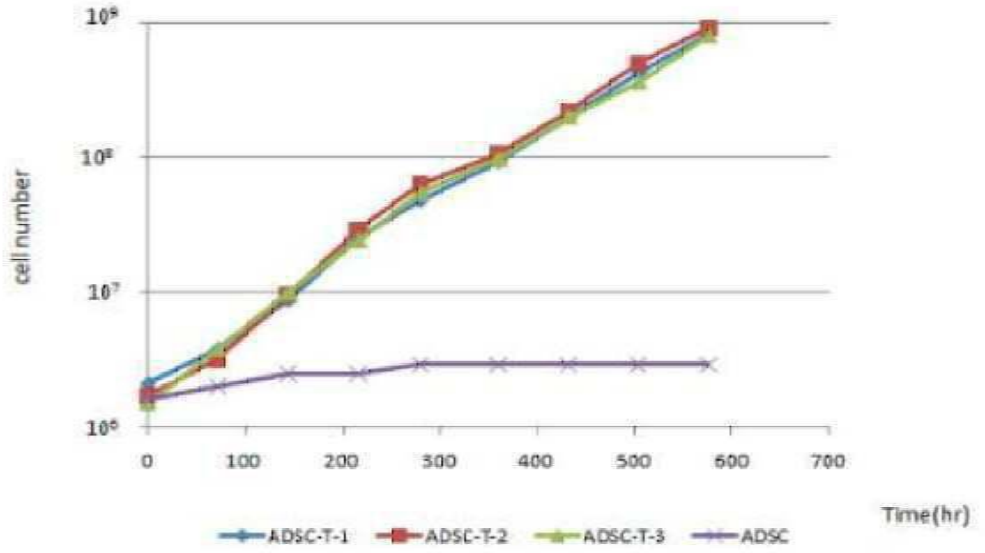
도면4


COS-1
ADSC-T

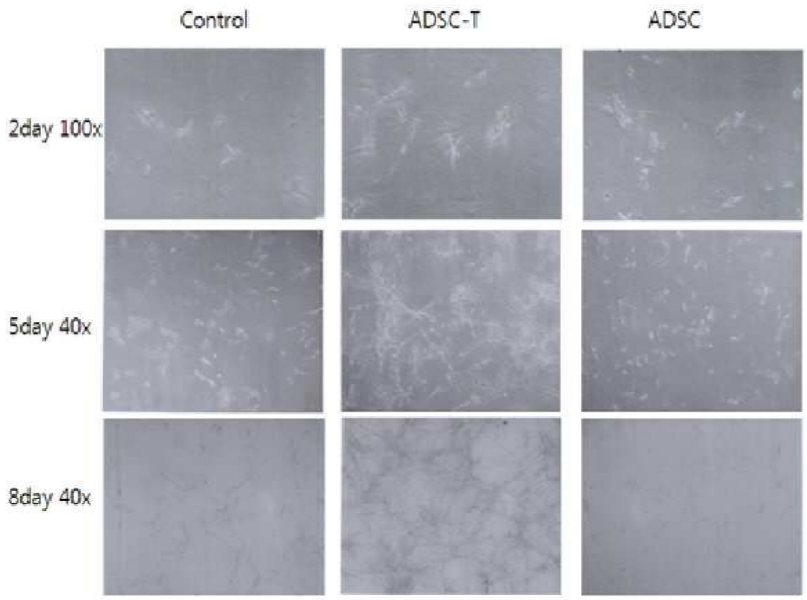
도면5


A
B
C
D
E

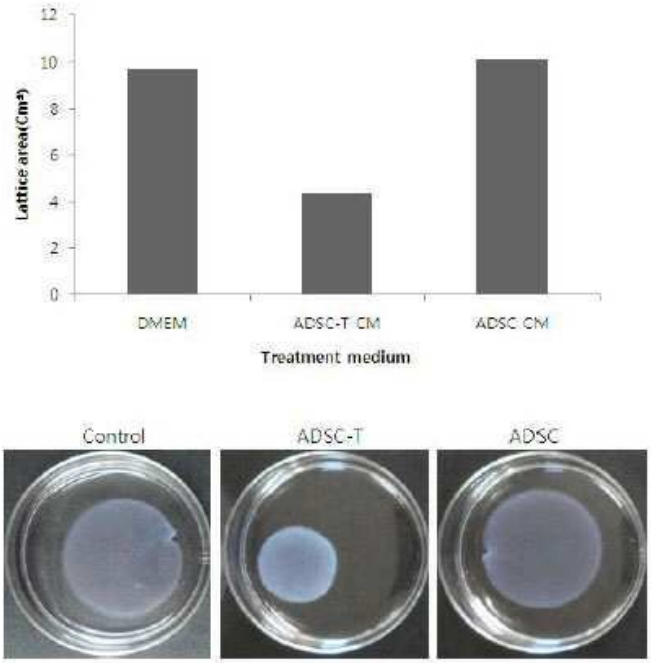
도면6


cell number
Time(hr)
ADSC-T-1
ADSC-T-2
ADSC-T-3
ADSC

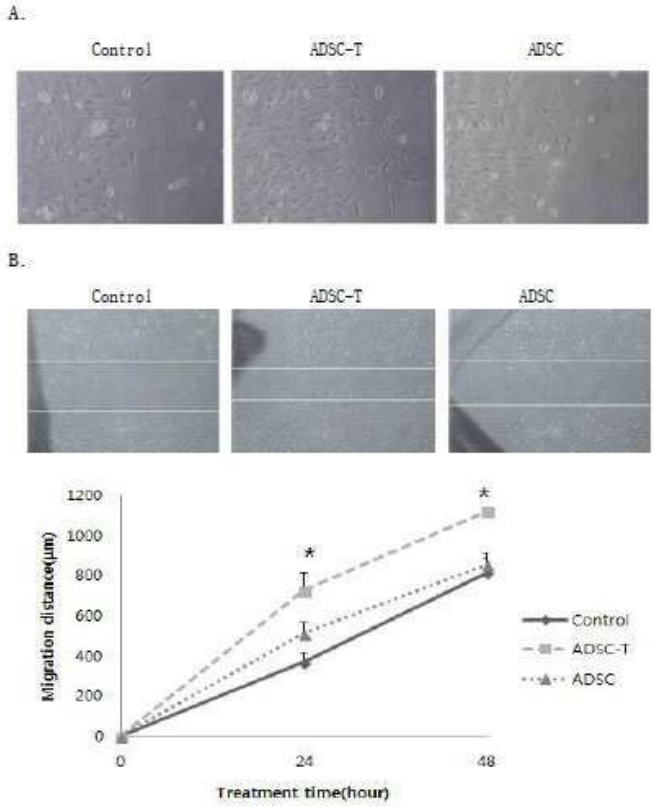
도면7


Control
ADSC-T
ADSC
2day 100x
5day 40x
8day 40x

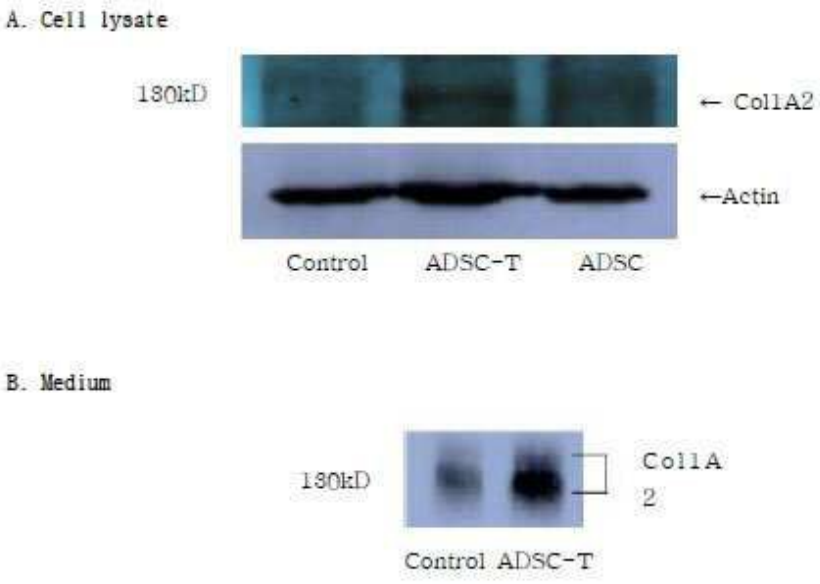
도면8


Lattice area(Cm²)
12
10
8
6
4
2
0
DMEM
ADSC-T CM
ADSC CM
Treatment medium
Control
ADSC-T
ADSC

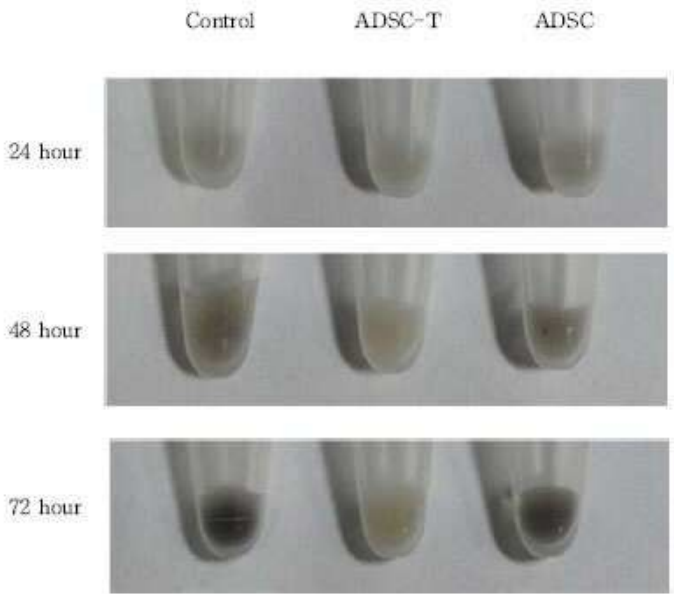
도면9


A.
Control
ADSC-T
ADSC
B.
Control
ADSC-T
ADSC
Migration distance(μm)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
24
48
Treatment time(hour)
Control
ADSC-T
ADSC
*
*

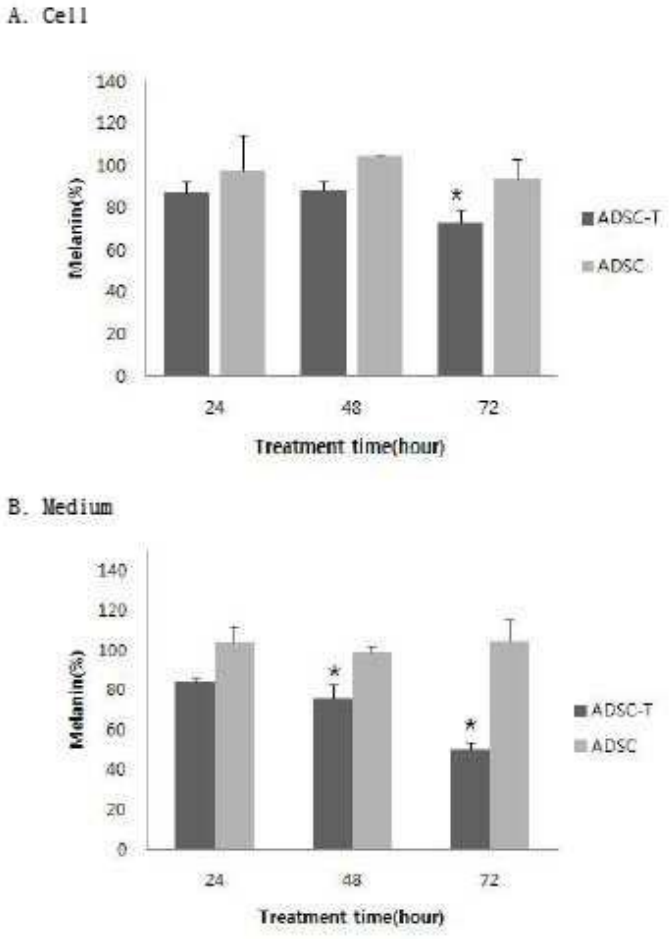
도면10


A. Cell lysate
130kD
← ColIA2
←Actin
Control
ADSC-T
ADSC
B. Medium
130kD
ColIA
2
Control ADSC-T

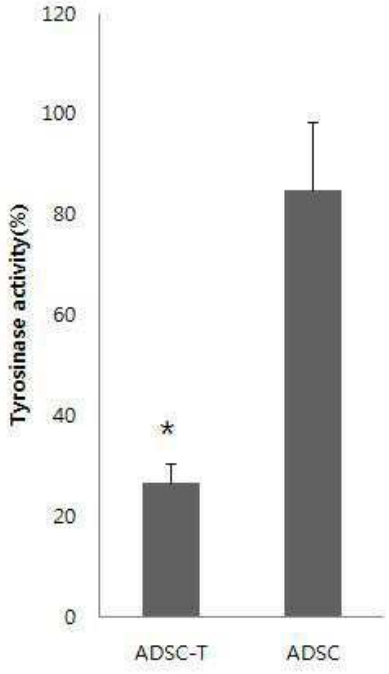
도면11


Control
ADSC-T
ADSC
24 hour
48 hour
72 hour

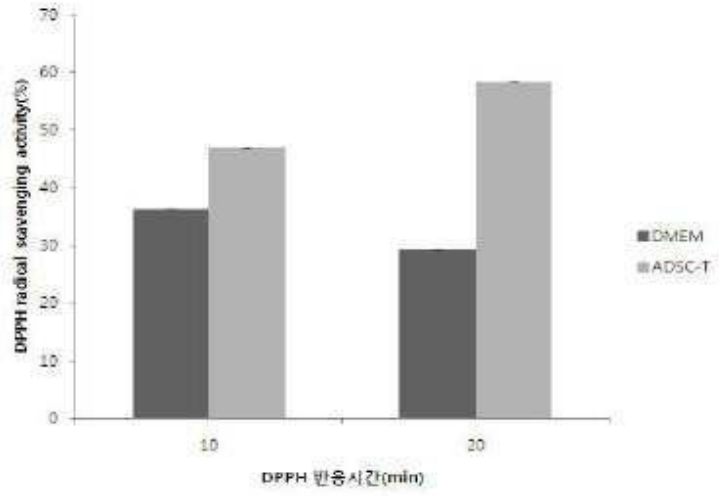
도면12


A. Cell
Melanin(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
24
48
72
Treatment time(hour)
ADSC-T
ADSC
B. Medium
Melanin(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
24
48
72
Treatment time(hour)
ADSC-T
ADSC

도면13


120
100
80
60
40
20
0
Tyrosinase activity(%)
*
ADSC-T
ADSC

도면14


70
60
50
40
30
20
10
0
DPPH radical scavenging activity(%)
10
20
DPPH 반응시간(min)
DMEM
ADSC-T